

С.С. Попко

Запорізький державний медичний університет
Запоріжжя, Україна


Надійшла: 27.05.2022

Прийнята: 15.06.2022

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.2.38-43>

УДК 611.24.018.1:611.428]:547.962.3]-092.9:599.324.7

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛІТИННОГО СКЛАДУ ЛІМФОЇДНИХ ВУЗЛИКІВ ЛЕГЕНЬ МОРСЬКИХ СВИНОК, СЕНСИБІЛІЗОВАНИХ ОВАЛЬБУМІНОМ

Popko S.S.   Morphological features of the cellular composition of lymphoid nodules in the lungs of ovalbumin sensitized guinea pigs.

Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Until now, the attention of scientists is attracted by the problems of the reactivity of the local immune system of the respiratory system under the influence of adverse environmental factors, including allergenic ones due to the growth of airways allergic diseases. **Objective.** To study morphological features of the cellular composition of lymphoid nodules in the lungs of ovalbumin sensitized guinea pigs. **Methods.** We have studied the lung of 48 guinea pigs, using histological, morphometric, statistical methods, under conditions of experimental ovalbumin-induced allergic inflammation, assessed the average number of lymphocytes, macrophages and plasma cells in the lymphoid nodules. **Results.** The use of morphometric analysis made it possible to reveal the general regularity of reactivity of a local specific link of the lung immune system to the action of the allergen, which consists in an increase in the average number of immunocompetent cells of lymphoid nodules of the lungs, starting from the 30th to the 44th day after the start of the experiment. The maximal coefficient of increase 5.8 times was observed in counting of plasma cells among all types of immunocompetent cells of lungs' lymphoid nodules during the experiment. **Conclusion.** It has been statistically proven that the implementation of the ovalbumin-induced allergic inflammatory process in the lungs proceeds according to the humoral type and the duration of its course is not limited by the direct influence of the allergen, but also continues after the end of its action, which is a manifestation of a violation of the recovery and adaptation processes in the local immune system of the lungs with ovalbumin-induced allergic inflammation.


Key words: lymphoid nodule, lungs, ovalbumin, allergic inflammation, guinea pig.

Citation:

Popko SS. [Morphological features of the cellular composition of lymphoid nodules in the lungs of ovalbumin sensitized guinea pigs]. Morphologia. 2022;16(2):38-43. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2022.2.38-43>

 Popko S.S. 0000-0002-5533-4556

 kluchkosv@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Дотепер і на сьогоднішній день увагу науковців привертають проблеми реактивності локальної імунної системи органів дихання під впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища, в тому числі алергенного характеру [2, 3, 4]. Вченими-морфологами накопичений великий обсяг наукових даних, присвячених дослідженню структури та функцій лімфоїдної тканини, асоційованої з бронхами та периваскулярних лімфоїдних вузликів легень в нормі та після антигенного впливу в експерименті [7, 8]. Не дивлячись на це, натеper існують суперечливі дані про роль лімфоїдних скупчень легень в розвитку алергічного запалення дихальних шляхів. Одні автори стверджують, що очевидного зв'язку між лімфоїдними вузликами легень та розвитком

алергічного запалення не існує, що підтверджують даними досліджень [2]. Інші дослідження припускають, що хоч і присутність лімфоїдних вузликів в легенях не корелює з алергічним процесом, їх реактивність підвищується у пацієнтів з бронхіальною астмою [4]. Враховуючи те, що морфологічні зміни локальної імунної системи легень у відповідь на сенсibiliзацію аероалергенами вивчені недостатньо, дослідження реактивних змін клітинного складу лімфоїдних вузликів легень є актуальною проблемою експериментальної морфології.

Тому метою нашої роботи є вивчення морфологічних особливостей клітинного складу лімфоїдних вузликів бронхів і легень морських свинок, сенсibiliзованих овальбуміном.

Матеріали та методи

Об'єктом експериментального дослідження були легені, котрі вилучені від 48 статевозрілих самців морської свинки масою 450 – 600 г, які утримувались у стандартних умовах віварію Запорізького державного медичного університету. Досліди на тваринах виконувались з дотриманням ухвали Першого національного конгресу з біоетики про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей, у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин (Страсбург, 1986).

Індукція алергічного запалення дихальних шляхів здійснювалась шляхом підшкірної сенсibilізації та наступної аероалергізації овальбуміном (ОВА) [6]. На 1, 7, 14 день експерименту морським свинкам проводилась сенсibilізація – підшкірне введення в міжлопаткову ділянку 0,5 мг овальбуміна (Sigma Chemical Co., США) разом з ад'ювантом - гідроокисом алюмінію, 10 мг (AlumVax Hydroxide vaccine adjuvant, OZ Biosciences Франція), розведених в 1 мл фізіологічного розчину. З 21 по 28 день експерименту тварини були аероалергізовані ОВА в дозі 10 мг/мл фізіологічного розчину протягом 15 хв/добу за допомогою компресорного інгалятора LD-211C (Little Doctor International, Сингапур) в інгаляційній камері. Для проведення дослідження тварини були розподілені на 6 груп (по 8 тварин у кожній групі). Перші чотири групи це тварини, сенсibilізовані та аероалергізовані ОВА, виведені з експерименту відповідно на 23-у, 30-у, 36-у і 44-у добу після його початку; 5 - контрольна група, тваринам якої вводили підшкірно 1 мл фізіологічного розчину та проводили інгаляцію фізіологічним розчином; 6 – інтактна група. Експеримент відповідав вимогам Закону України №3447-І від 21.02.06 р. „Про захист тварин від жорстокого поводження”. З метою раціональної подачі одержаних даних і їх інтерпретації умовно виділяємо ранній (23-тя, 30-а доби експерименту) та пізній (36-а і 44-а доби після початку експерименту) періоди розвитку алергічного запального процесу в легенях.

Тварин виводили з експерименту шляхом передозування тіопенталового наркозу згідно встановлених термінів (23-ю, 30-у, 36-у і 44-у доби експерименту). Гістологічні зрізи забарвлювали гематоксилін-еозином. Морфологічне дослідження отриманих зрізів проводили за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (Zeiss, Німеччина) із системою фотодокументування [1]. Підраховували середню кількість малих лімфоцитів, макрофагів та дендритних клітин, плазмоцитів у складі перибронхіальних та периваскулярних лімфоїдних вузликів легень у полі зору площею 15000 мкм² при імерсійному зображенні (об. 100).

Результати досліджень оброблені сучасними статистичними методами аналізу на персональ-

ному комп'ютері з використанням стандартного пакета програм Microsoft Office 2010 (Microsoft Excel) та «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США, ліцензія 46 № AXXR712D833214FAN5) на базі операційної системи Windows 10, а також за допомогою бібліотек NumPy (BSD License), SciPy (BSD License), pandas (BSD License), pandas-profiling (MIT License), для візуалізації оброблених даних використовували бібліотеку matplotlib (BSD License) для мови програмування Python [5]. Гіпотезу про нормальність розподілу досліджуваних показників перевіряли з використанням критерію узгодженості Колмогорова – Смирнова. Для перевірки гіпотези про приналежність двох незалежних вибірок одному закону розподілу використано критерій однорідності Колмогорова – Смирнова. Розраховували середні арифметичні (M) та стандартні похибки середньої ($\pm m$). Статистичну значимість міжгрупових відмінностей за отриманими даними встановлювали за допомогою непараметричного U-критерію Уїтні-Манна. Статистично значущими вважали відмінності між порівнюваними значеннями на рівні 95% ($p < 0.05$). Отримані показники порівнювались між медіаною і міжквартильним розмахом Me (Q1; Q3).

Результати та їх обговорення

Лімфоїдна тканина у легенях морської свинки представлена дифузною лімфоїдною тканиною в легеновому інтерстиції та лімфоїдними вузликами в адвентиційній оболонці внутрішньолегеневих бронхів і кровоносних судин, а також субплеврально. Лімфоїдні вузлики мають овальну або круглу форму і розміри, які варіюють від 100 до 350 мкм. Деякі лімфоїдні утворення мають чітко визначену сполучнотканинну капсулу (рис. 1). Між лімфоїдними клітинами у складі вузликів зустрічаються кровоносні судини і фібробласти. Серед імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів визначались малі та середні лімфоцити, плазмоцити, макрофаги та дендритні клітини.

При морфометричному дослідженні легень морської свинки інтактної групи середня кількість імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів була наступною: лімфоцити 12.62 ± 0.36 , макрофаги 16.25 ± 0.2 , плазмоцити 4.38 ± 0.14 у полі зору. В контрольній групі при аналізі вмісту імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів в легенях морської свинки виявлено, що статистично значуща різниця між показниками у тварин інтактної та контрольної груп була відсутня ($p^{***} > 0.05$), що свідчить про те, що сама процедура проведення експерименту не впливає на зміни вмісту імунокомпетентних клітин у складі лімфоїдних вузликів. При аналізі середньої кількості лімфоцитів в ранньому періоді розвитку алергічного запального процесу в легенях виявлено, що їх вміст статистично

значимо збільшувався ($p^{***}<0.05$) порівняно з контролем починаючи з 30-ої доби після початку експерименту (рис. 2). У тварин 2-ої експериментальної групи середня кількість лімфоцитів у складі лімфоїдних вузликів складала 29.75 ± 0.53

у полі зору, що у 3 рази більше показника контрольної групи і в 2,5 рази ($p^{***}<0.05$) більше аналогічного показника попереднього терміну спостереження.

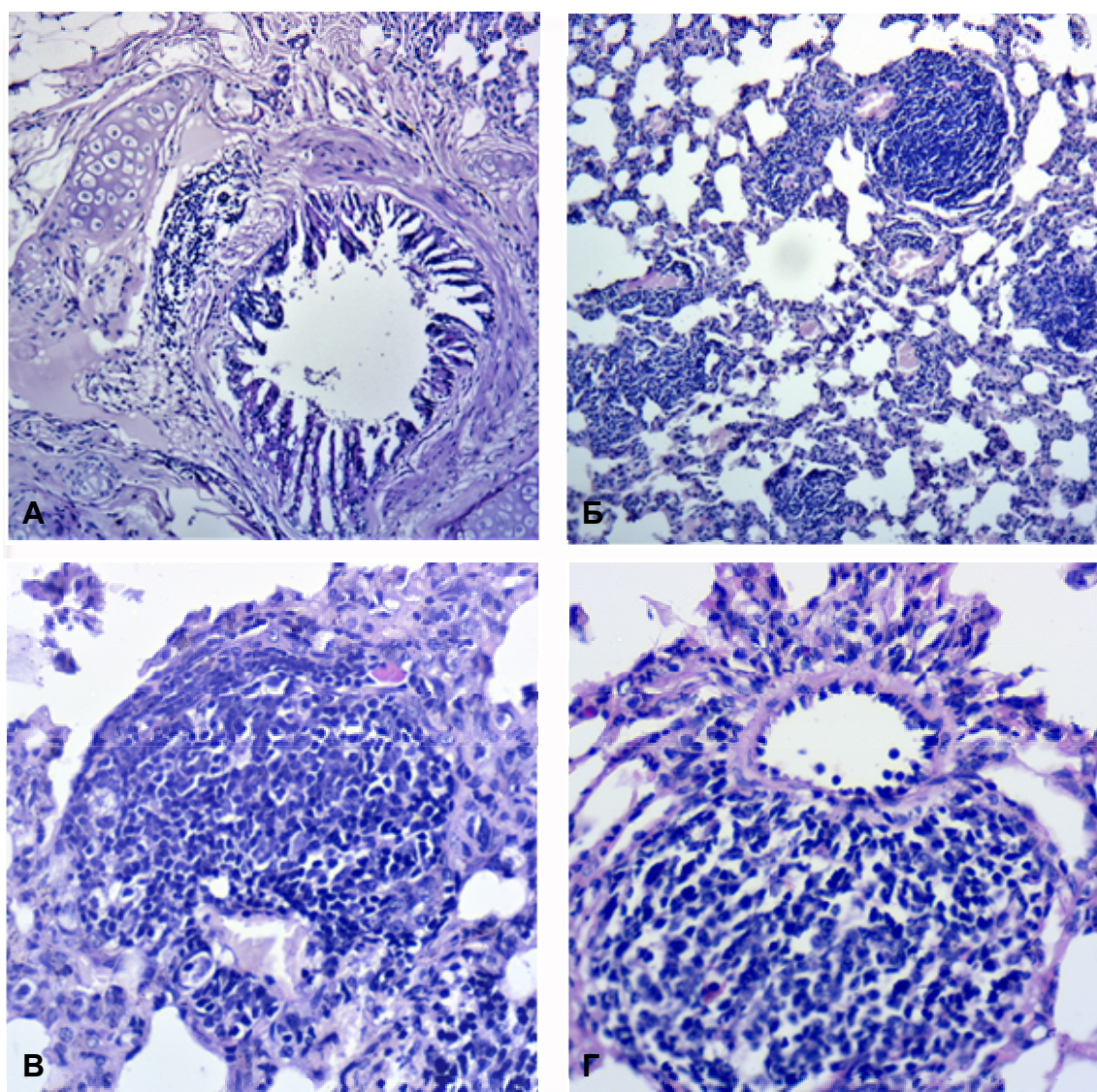


Рис. 1. Лімфоїдні вузлики в легенях морської свинки. Забарвлення гематоксилін-еозин. А – контрольна група. Лімфоїдний вузлик у стінці бронха середнього калібра. Б – 2-а експериментальна група. Периваскулярні лімфоїдні вузлики. $\times 100$. В - 3-тя експериментальна група. Периваскулярний лімфоїдний вузлик. Г – 4-та експериментальна група. Лімфоїдний вузлик у стінці бронха малого калібра. $\times 400$.

Також статистично значуща різниця між показниками середньої кількості лімфоцитів лімфоїдних вузликів у тварин контрольної групи та після сенсibiliзації овалбуміном, спостерігалася у пізньому періоді розвитку алергічного запального процесу в легенях (36-та і 44-та доби після початку експерименту) у тварин 3-ої та 4-ої експериментальних груп. На 36-ту добу експерименту середня кількість лімфоцитів у складі лімфоїдних вузликів складала 42.12 ± 0.79 у полі зору, що статистично значимо більше в 4,3 рази

($p^{***}<0.05$) за аналогічний показник в контрольній групі і в 1,4 рази ($p^{***}<0.05$) більше у порівнянні з попереднім терміном спостереження.

Середня кількість плазмоцитів в лімфоїдних вузликах легень після дії овалбуміна статистично значимо ($p^{***}<0.05$) збільшилася, порівняно з контролем, починаючи з 30-ої доби після початку експерименту (рис. 3). У тварин 2-ої експериментальної групи даний показник становить 18.62 ± 0.74 у полі зору. Коефіцієнт збільшення становить 5,5 порівняно з інтактною групою та

контролем, 6,5 ($p^{***}<0.05$) – порівняно с попереднім терміном спостереження.

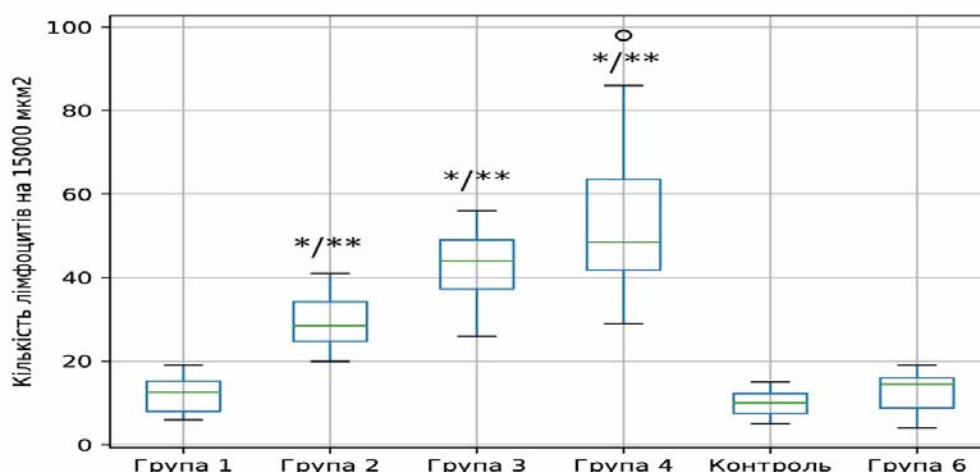


Рис. 2. Динаміка змін середньої кількості малих лімфоцитів в лімфоїдних вузликах легень морської свинки. $p<0.05$. * – $p<0,05$ (t-критерій Стьюдента); ** – $p<0,05$ (U-критерій Уїтні-Манна) по відношенню до контролю. Ме (Q1; Q3).

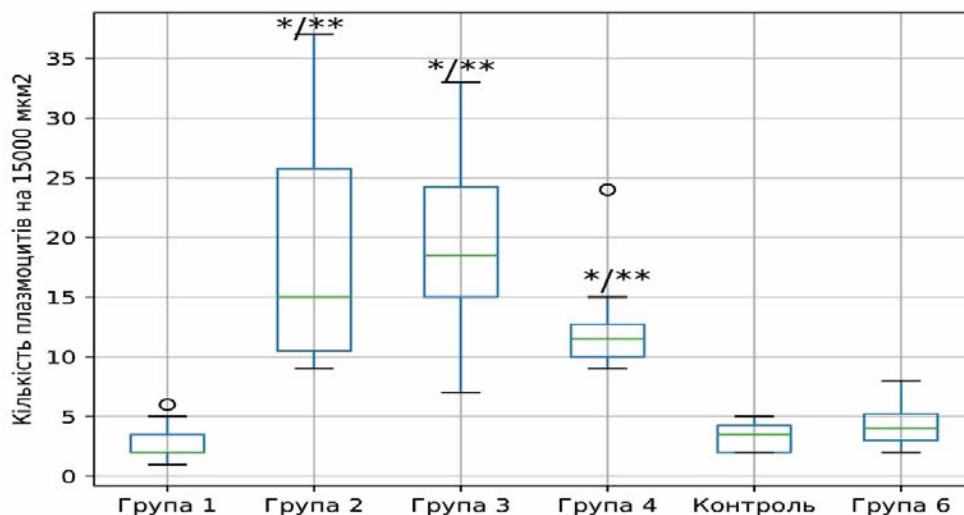


Рис. 3. Динаміка змін середньої кількості плазмоцитів в лімфоїдних вузликах легень морської свинки. $p<0.05$. * – $p<0,05$ (t-критерій Стьюдента); ** – $p<0,05$ (U-критерій Уїтні-Манна) по відношенню до контролю. Ме (Q1; Q3).

Максимальну середню кількість плазмоцитів в лімфоїдних вузликах легень після дії овалбуміна в експериментальних групах ми зафіксували на 36-ту добу після початку експерименту, яка становила 19.75 ± 0.63 у полі зору Коефіцієнт збільшення при цьому 5,8 у порівнянні з контролем. Послаблення реакції гуморальної реакції адаптивної ланки місцевої імунної системи легень у порівнянні з 36-ю добою ($p^{**}<0.05$) ми спостерігали на 44-у добу після початку експерименту.

При аналізі кількості макрофагів у складі лімфоїдних вузликів легень морської свинки в ранньому періоді розвитку алергічного запального процесу в легенях виявлено, що їх вміст статистично значимо збільшувався в 1,3 рази

($p^{*}<0.05$) починаючи з 23-ої доби після початку експерименту (23.88 ± 0.39 у полі зору), у порівнянні з аналогічними показниками у тварин інтактної та контрольної груп (рис. 4). Максимальний коефіцієнт збільшення середньої кількості макрофагів лімфоїдних вузликів легень морської свинки у порівнянні з контролем, спостерігався на 30-ту добу спостереження у 2 експериментальній групі і склав 1,8 ($p^{***}<0.05$), а порівняно з попереднім терміном спостереження – 1,4 ($p^{**}<0.05$).

Також статистично значуща різниця ($p^{**}<0.05$) у порівнянні з аналогічними показниками у тварин інтактної та контрольної груп вмісту макрофагів лімфоїдних вузликів ми спостерігали у пізньому періоді розвитку алергічного

запального процесу в легенях (36-а і 44-а доби після початку експерименту) у тварин 3-ої та 4-ої експериментальних груп. Вміст макрофагів лімфоїдних вузликів на 36-ту добу спостереження складав 29.38 ± 0.55 у полі зору, що більше в 1,6 рази порівняно з аналогічним показником в кон-

трольній групі. У тварин 4-ої експериментальної групи середня кількість макрофагів лімфоїдних вузликів зменшується у порівнянні з попереднім терміном спостереження, але залишається статистично значимо більшою в 1,5 рази ($p^{***} < 0.05$) порівняно з контролем.

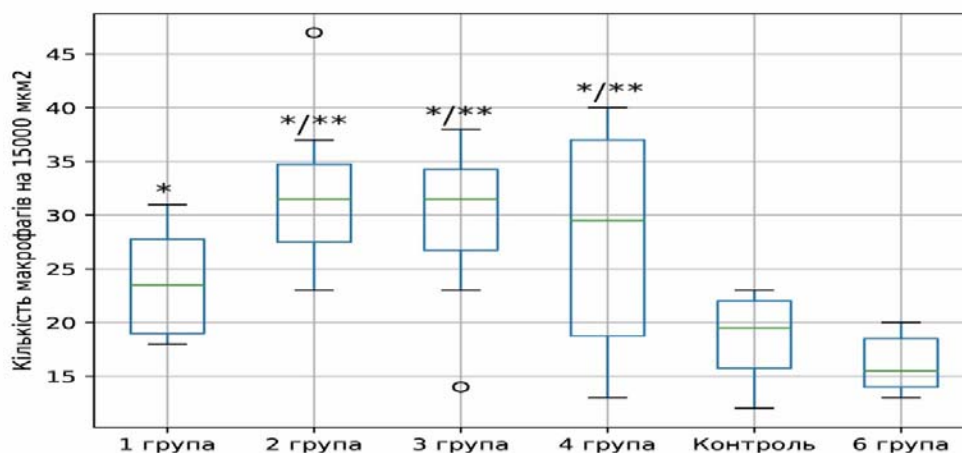


Рис. 4. Морфометричні зміни середньої кількості макрофагів у складі лімфоїдних вузликів легень морської свинки. * – $p < 0.05$ (t-критерій Стюдента); ** – $p < 0.05$ (U-критерій Уїтні-Манна) по відношенню до контролю. Ме (Q1; Q3).

Отже, середня кількість малих лімфоцитів збільшувалася з 30-ої доби спостереження і трималася на високому рівні до кінця експеримента, а максимальною була на 44-ту добу спостереження і коефіцієнт їх збільшення становив 5,6. Середня кількість плазмочитів максимального збільшення набувала на 36-ту добу спостереження і коефіцієнт збільшення становив 5,8. Середня кількість макрофагів максимальною була на 30-ту добу спостереження і коефіцієнт збільшення становив 1,8. Серед всіх видів імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень під час експерименту максимального збільшення у 5,8 разів зазнавали плазмочити. Такі кількісні зміни показників свідчать про те, що реалізація овальбумін-індукованого алергічного запального процесу в легенях проходить за гуморальним типом і тривалість його перебігу не обмежується безпосереднім впливом антигена, але і продовжується після закінчення його дії. Виявлені нами морфологічні зміни у лімфоїдних вузликах легень при алергічному запальному процесі підтверджуються даними інших наукових досліджень [3, 7]. В результаті сенсibiliзації та аероалергізації овальбуміном у легенях морських свинок розвивається алергічне запалення. Механізм запалення являє собою каскад процесів за участю великої різноманітності клітин, цитокінів і медіаторів, взаємодія яких і формує характерний запальний процес і викликане ним ремоделювання бронхів [4]. Одним із головних доказів розвитку алергічного процесу в легенях морської свинки в експерименті окрім еозинофільного запалення, як результату реакції вродженої ланки імунітету на

дію алергену, є зростання кількості лімфоїдних вузликів та зміни в їх клітинному складі [6, 7]. Після реакції вродженого імунітету розвивається каскад реакцій гуморальної ланки набутого імунітету, в результаті яких плазмочитами синтезуються специфічні антитіла до овальбуміна ОВА-IgE.

Висновки

1. В ході дослідження виявлена загальна закономірність реактивності місцевої специфічної ланки імунної системи легень на дію алергена, що полягає у збільшенні середньої кількості імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень на 30-ту - 44-ту доби спостереження ($p < 0.05$).

2. У пізній період розвитку експериментального овальбумін-індукованого алергічного запалення (36-та та 44-а доба експерименту) переважають прояви специфічної резистентності дихальної системи у вигляді активації локальних ланок клітинного та гуморального адаптивного імунітету, про що свідчить динаміка змін середньої кількості малих лімфоцитів (максимальний коефіцієнт збільшення 5,6 в 4-ій експериментальній групі) та плазмочитів (максимальний коефіцієнт збільшення 5,8 в 3-ій експериментальній групі) в лімфоїдних вузликах легень морської свинки.

Перспективи подальших досліджень

Нами планується імуногістохімічне дослідження клітин лімфоїдної тканини, асоційованої з бронхами морських свинок при експериментальному овальбумін-індукованому алергічному запаленні.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Імуноморфологічні особливості внутрішніх органів при дії ендо- та екзогенних чинників на організм» (номер державної реєстрації 0118U004250).

Літературні джерела References

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer Singapore; 2018. 275 p. doi: <https://www.springer.com/gp/book/9789811082511>
2. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Frontiers in Immunology*. 2016;7:258. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00258>.
3. Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, et al. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. *Nature Immunology*. 2015;17(1):76–86. doi: <https://doi.org/10.1038/ni.3309>.
4. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nature Immunology*. 2014;16(1):45–56. doi: <https://doi.org/10.1038/ni.3049>.
5. Petrie A., Sabin C. *Medical Statistics at a Glance*. 4th ed. Wiley-Blackwell; 2019. 208 p.
6. Popko SS, Evtushenko VM, Syrsov VK. Influence of pulmonary neuroendocrine cells on lung homeostasis. *Zaporozhye medical journal*. 2020;22(4(121)):568–75. doi: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.4.208411>.
7. Baluk P, Adams A, Phillips K, Feng J, Hong Y-K, Brown MB. Preferential Lymphatic Growth in Bronchus-Associated Lymphoid Tissue in Sustained Lung Inflammation. *The American Journal of Pathology*. 2014;184(5):1577–92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.01.021>.
8. Klose CSN, Mahlaköiv T, Moeller JB, Rankin LC, Flamar A-L, Kabata H. The neuropeptide neuromedin U stimulates innate lymphoid cells and type 2 inflammation. *Nature*. 2017;549(7671):282–6. doi: <https://doi.org/10.1038/nature23676>.

Попко С. С. Морфологічні особливості клітинного складу лімфоїдних вузликів легких морських свинок, сенсibilізованих овальбуміном.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Дотепер і на сьогоднішній день увагу науковців привертають проблеми реактивності локальної імунної системи органів дихання під впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища, в тому числі алергенного характеру у зв'язку зі зростанням алергічних захворювань дихальної системи. **Мета.** Визначення морфологічних змін клітинного складу лімфоїдних вузликів бронхів і легень морських свинок, сенсibilізованих овальбуміном. **Методи.** Гістологічним, морфометричним, статистичним методами досліджували середню кількість лімфоцитів, макрофагів та плазмоцитів у складі лімфоїдних вузликів бронхів і легень самців 48 морських свинок після індукції експериментального овальбумін-індукованого алергічного запалення дихальних шляхів. **Результати.** Застосування морфометричного аналізу дозволило виявити загальну закономірність реактивності місцевої специфічної ланки імунної системи легень на дію алергену, яка полягає у збільшенні середньої кількості імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень, починаючи з 30-ої по 44-ту добу після початку експерименту. Серед усіх видів імунокомпетентних клітин лімфоїдних вузликів легень під час експерименту максимальний коефіцієнт збільшення у 5,8 разів ми спостерігали серед плазмоцитів. **Висновки.** Статистично доведено, що реалізація овальбумін-індукованого алергічного запального процесу в легенях проходить за гуморальним типом і тривалість його перебігу не обмежується безпосереднім впливом алергену, але й продовжується після закінчення його дії, що є проявом порушення відновлювально-адаптаційних процесів у локальній імунній системі при індукції алергічного запалення.

Ключові слова: лімфоїдний вузлик, легень, овальбумін, алергічне запалення, морська свинка.