

УДК 636.22/28:611.4

РЕЗУЛЬТАТЫ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Г. К. Касиева, соискатель
Кыргызский национальный аграрный университет
им. К. И. Скрябина
E-mail: kasieva70@mail.ru

Ключевые слова: лимфатический узел, крупный рогатый скот, гистоструктура, иммуногистохимия, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги, пролиферация клеток

Реферат. *Приводятся результаты исследования гистологической структуры и клеточного состава лимфатических узлов крупного рогатого скота на основе гистологических и иммуногистохимических методов с применением поли- и моноклональных антител. Исследованию были подвергнуты средостенные, портальные и брыжеечные лимфатические узлы от 12 голов крупного рогатого скота алатауской породы в возрасте от 1,5 до 7 лет. Результаты исследования показывают, что примененные антисыворотки: Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD3 (PAP), Monoclonal Mouse Anti-Human B-Lymphocyte Antigen (BLA. 36) (ABC), Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387 (PAP), Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10 (PAP) можно использовать при иммуногистохимической дифференциации соответственно Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток в парафиновых срезах образцов органов крупного рогатого скота. По результатам исследований описана структура лимфатических узлов и определены места локализации и распространения Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферация клеток в Т- и В- зависимых зонах коркового вещества и в мозговом веществе лимфатических узлов. Полученные данные можно применить как базовые при морфологическом исследовании патологий лимфатических узлов крупного рогатого скота.*

В научных журналах имеются ряд научных сообщений по изучению морфологии, клеточного состава и иммуноморфологии лимфатических узлов крупного рогатого скота с применением морфологических и иммуногистохимических методов исследований [1–6].

Исследована возрастная морфология лимфатических узлов у молодняка крупного рогатого скота черно-пестрой породы за период от новорожденности до 9-месячного возраста, описана их топография, цвет, консистенция, коэффициент роста в зависимости от двигательной активности [1].

Проведенные иммуногистохимические исследования показали, что Anti-CD3, Anti-CD5, Anti-mb-1, Anti-B29 антитела можно применять для обнаружения Т- и В-лимфоцитов как в замороженных, так и фиксированных в жидкости Карнуа и заключенных в парафине тканях крупного рогатого скота [2].

Гистологические срезы лимфатических узлов крупного рогатого скота, фиксированные в формалине и заключенные в парафине, были инкубированы с моноклональными антителами к маркерам BLA.36, B29 и mb-1 В-лимфоцитов

и маркерам CD3 и CD5 Т-лимфоцитов. Результаты иммуногистохимических исследований показали, что моноклональное антитело анти BLA.36 реагировало с 80–90% лимфоцитов в зародышевых центрах и мантийной зоне фолликулов в лимфатических узлах и определенным количеством лимфоцитов мозговых тяжей лимфатических узлов. Антитела к B29 и mb-1 дали такие же результаты, как и моноклональное антитело анти BLA.36, но с меньшим количеством позитивных клеток в зародышевом центре и мозговых тяжях. Моноклональные антитела анти CD3 и CD5 реагировали с 90% лимфоцитов паракортикальной и парафолликулярных зон лимфатических узлов, с 40–50% лимфоцитов мозговых тяжей лимфатических узлов и определенным количеством клеток фолликулов [3].

Были проведены также иммуногистохимические исследования гистосрезов лимфатических узлов 8-месячного молодняка крупного рогатого скота, фиксированных в формалдихромате и 10%-м формалине и заключенных в парафине, для выявления CD2+, CD4+, CD8+ и WC1+ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов. Все

лейкоциты исследованных популяций (CD2+, CD4+, CD8+, WC1+ Т-лимфоцитов, В-лимфоциты и макрофаги) были специфически обнаружены при соответствующей комбинации моноклональных антител, антигенвосстанавливающего метода и сигналу усиливающей системы [4].

С помощью иммуногистохимических исследований изучена клеточная пролиферация, апоптоз, В- и Т-лимфоциты в лимфатических узлах у недоношенных и полноценно рожденных телят при рождении и на 5-й день жизни [5]. В исследуемых лимфатических узлах количество пролиферирующих клеток и В-лимфоцитов в фолликулах и паракортикальной зоне было больше в группе полноценно рожденных телят, чем в группе недоношенных. Количество апоптотических клеток было выше в группе полноценно рожденных телят, чем в группе недоношенных [5].

Аналогичные гистологические и иммуногистохимические исследования на парафиновых срезах лимфоидных органов и тканей были проведены у овец [6, 7], собак [8, 9] и яков [10].

Таким образом, результаты проведенных исследований показывают, что иммуногистохимические исследования с использованием поли- и моноклональных антител успешно применяются в морфологических исследованиях, в частности при дифференциации клеточного состава лимфоидных органов и тканей у животных.

Цель исследований – описание структуры и клеточного состава лимфатических узлов крупного рогатого скота и дифференциация в них Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась на кафедре ветеринарно-санитарной экспертизы, гистологии и патологии факультета ветеринарной медицины и биотехнологии КНАУ им. К.И. Скрябина Кыргызской Республики и в лаборатории иммуногистохимии и гематологии института ветеринарной патологии факультета ветеринарной медицины Гиссенского университета (Германия).

После забоя 12 голов крупного рогатого скота алатауской породы в возрасте от 1,5 до 7 лет в убойных пунктах г. Бишкека Кыргызской Республики средостенные, портальные и брыжечные лимфатические узлы забитых животных были подвергнуты детальному осмотру для исключения в них каких-либо патологий. Кусочки

от лимфатических узлов после детального осмотра были зафиксированы в 10%-м водном растворе нейтрального формалина. После фиксации дальнейшая гистологическая процедура (обезживание и заключение в парафин кусочков) производилась в обычных лабораторных условиях (вручную) и в специальной машине в вакууме (автоматически). Из парафиновых блоков готовились серийные срезы на санном микротоме толщиной 4–6 мкм и на микротоме новой модификации толщиной 2–3 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином для анализа общей гистокартины и клеток лимфатических узлов.

При иммуногистохимическом исследовании были использованы ABC (avidin-biotin complex) метод для выявления В-лимфоцитов, PAP (peroxidase-antiperoxidase complex) метод для выявления Т-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток. Для демонстрации в гистосрезах лимфоузлов Т-лимфоцитов использовали антисыворотку Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD3. Code No. A. 0452 (PAP); В-лимфоцитов – антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Human B-Lymphocyte Antigen (BLA.36) (ABC); макрофагов – антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC387. Code Nr. M0747 (PAP); пролиферации клеток – антисыворотку Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10. Code-Nr. M 0879 (PAP).

При положительной реакции CD3 положительные клетки (Т- лимфоциты), BLA.36 положительные клетки (В- лимфоциты), клетки в состоянии пролиферации окрашивались в коричневый цвет, а MAC387 положительные клетки (макрофаги) – в темно-коричневый цвет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При гистологическом исследовании лимфатических узлов мы обратили основное внимание на клетки коркового и мозгового вещества паренхимы органа, которая представлена лимфоидной и ретикулярной тканью. Гистологически паренхима органа состоит преимущественно из лимфоцитов различных размеров (рис. 1). Из-за рыхлого расположения иммунокомпетентных клеток в синусах и тяжах мозгового вещества органа можно показать клеточный состав лимфатических узлов. В мозговом веществе видны ретикулярные клетки, лимфоциты различных размеров, макрофаги, плазматические клетки, эозинофилы (рис. 2).

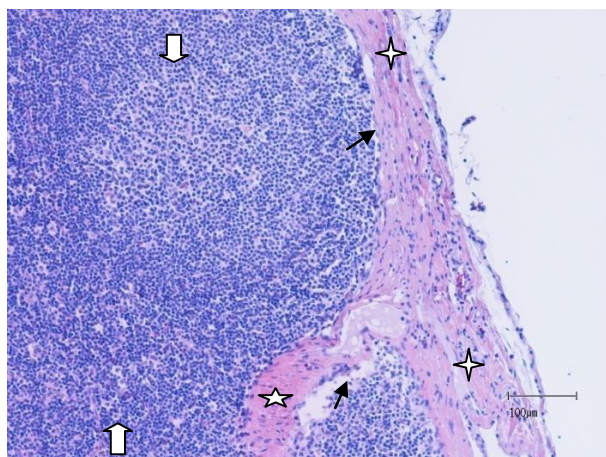


Рис. 1. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

Нормальная гистоструктура лимфатического узла. Видны капсула (4-конечная звезда), трабекулы (5-конечная звезда), синусы (черные стрелки), паренхима и лимфоидная фолликула (белые стрелки). Паренхима преимущественно состоит из лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\text{bar}=100\text{ мкм}$

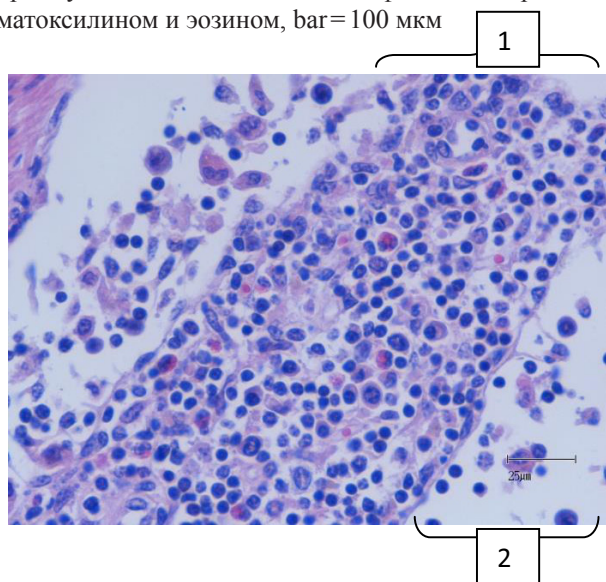


Рис. 2. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

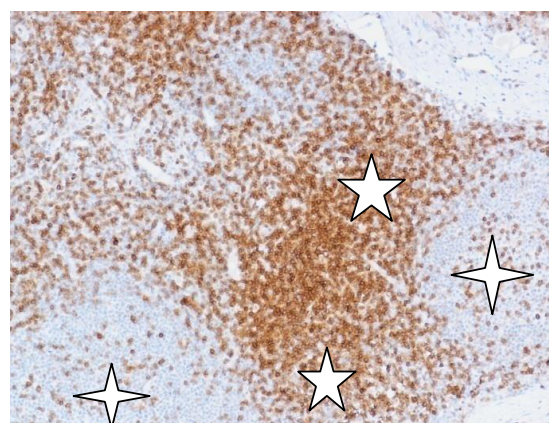
Видны мозговой тяж (1), мозговой синус (2), а также ретикулярные клетки, лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги, эозинофилы. Окраска гематоксилином и эозином, $\text{bar}=25\text{ мкм}$

Иммуногистохимические исследования лимфатических узлов с применением вышеуказанных моно- и поликлональных антисывороток позволили нам дифференцировать Т-лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги и пролиферации лимфоидных клеток, а также определить места их расположения.

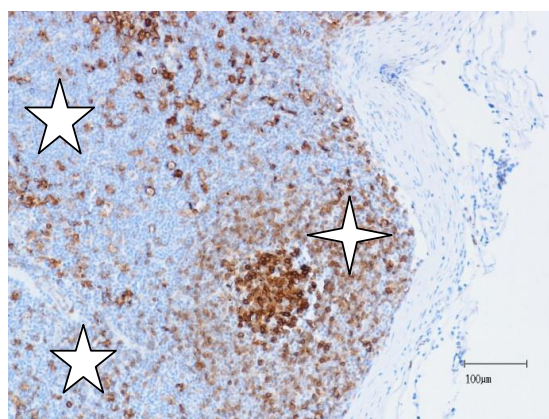
Т-лимфоциты в большом количестве расположены в Т-зависимой зоне, т.е. в паракортикальной

и межфолликулярных зонах коркового вещества (рис. 3, а), менее – в мозговом веществе и в виде единичных клеток в фолликулах, особенно в герминативном центре.

В-лимфоциты в большом количестве расположены в лимфоидных фолликулах (см. рис. 3, б). В зависимости от функционального состояния лимфоидных фолликулов количество в них В-лимфоцитов варьирует. В-лимфоциты встречаются в мозговом веществе и в виде единичных клеток в Т-зависимой зоне лимфатического узла.



а



б

Рис. 3. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота:

Т-зависимая зона лимфатического узла – 5-конечная звезда; В-зависимая зона лимфатического узла – 4-конечная звезда; а – иммуногистохимическое выявление Т-лимфоцитов с помощью поликлональной антисыворотки Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD3. Масса Т-лимфоцитов в Т-зависимой зоне и в малом количестве в В-зависимой зоне. РАР метод, $\text{bar}=100\text{ мкм}$; б – иммуногистохимическое выявление В-лимфоцитов с помощью моноклональной антисыворотки Monoclonal Mouse Anti-Human B-Lymphocyte Antigen (BLA. 36). Масса В-лимфоцитов в В-зависимой (фолликулярной) зоне и в малом количестве в Т-зависимой зоне. АВС метод, $\text{bar}=100\text{ мкм}$

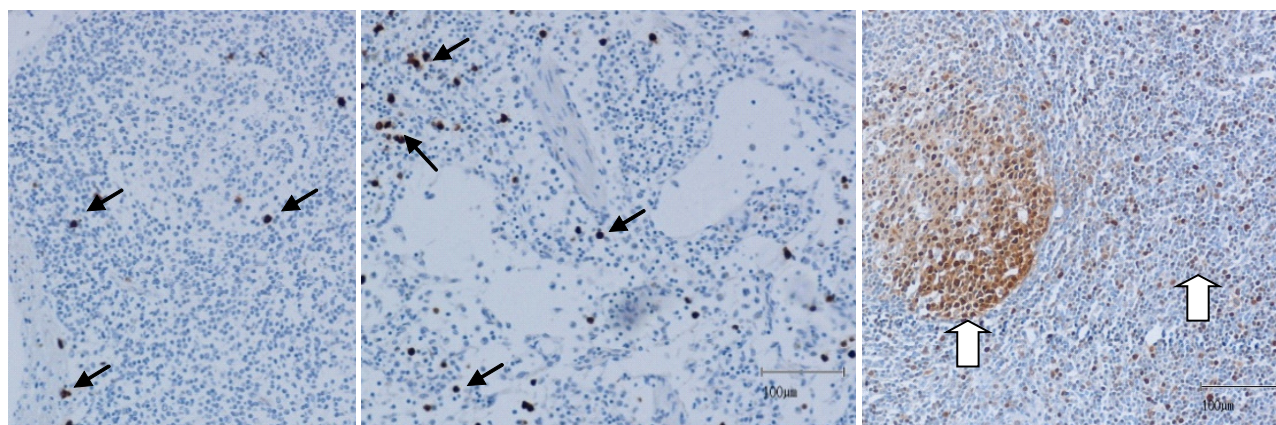


Рис. 4. Парафиновые срезы лимфатического узла крупного рогатого скота.

Иммуногистохимическое выявление макрофагов с помощью моноклональной антисыворотки Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387; а – макрофаги в корковом веществе лимфатического узла (черные стрелки). РАР метод, bar = 100 мкм; б – макрофаги в мозговом веществе лимфатического узла (черные стрелки). РАР метод, bar = 100 мкм; в – иммуногистохимическое выявление пролиферации лимфобластов с помощью моноклональной антисыворотки Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10. Пролiferация лимфобластов в В-зависимой и Т-зависимой зонах лимфатического узла. РАР метод, bar = 100 мкм

Макрофаги выявлены как в корковом, так и в мозговом веществе лимфатического узла. В корковом веществе они обнаруживаются в основном в виде единичных клеток и расположены в фолликулах и межфолликулярных зонах (рис. 4, а). В мозговом веществе количество макрофагов больше, чем в корковом. В основном они расположены в мозговых тяжах и синусах (см. рис. 4, б).

Пролiferация лимфоидных клеток отмечена как в корковом, так и в мозговом веществе лимфатического узла. В лимфоидных фолликулах или В-зависимых зонах, особенно активных, количество пролиферирующих клеток в несколько раз выше по сравнению с пролиферацией клеток в корковом и мозговом веществе (см. рис. 4, в).

ВЫВОДЫ

1. Описана структура и клеточный состав лимфатического узла клинически здорового крупного рогатого скота.
2. Благодаря иммуногистохимическим методам исследований в парафиновых гистосрезах лимфатических узлов дифференцированы Т-лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги и пролиферация клеток. Определены места локализации вышеуказанных клеток в Т- и В-зависимых зонах и в мозговом веществе лимфатических узлов.
3. Полученные данные по иммуноморфологии лимфатического узла можно применить как базовые морфологические данные при морфологическом исследовании патологий лимфатических узлов крупного рогатого скота.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Селезнев С. Б., Фомина Н. М. Возрастная морфология органов иммунной системы у крупного рогатого скота // Вопросы интенсификации производства сельскохозяйственных продуктов: материалы науч.-теор. конф. – М.: Изд-во Ун-та дружбы народов, 1989. – С. 105–106.
2. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies / M. Jones, L. J. Cordell, A. D. Beyers [et al.] // J. Immunol. – 1993. – Vol. 150. – P. 5429–5435.
3. Detection of equine and bovine T-and B-lymphocytes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues / L. Collins, E. A. Mahaffey, D. I. Bounous [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 1997. – Vol. 57. – P. 187–200.
4. The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques /

- M. Gutierrez, F.I. Forster, S.A. McConnell [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 1999. – Vol. 71. – P. 321–334.
5. *Cell Proliferation, Apoptosis, and B- and T-Lymphocytes in Peyer's Patches of the Ileum, in Thymus and in Lymph nodes of Preterm Calves, and in Full-Term Calves at Birth and on Day 5 of Life* / C.W. David, J. Norrman, H.M. Hammon [et al.] // *J. Dairy Sci.* – 2003. – Vol. 86. – P. 3321–3329.
6. *Иргашев А. Ш. Иммуноморфология и микроморфометрия тимуса овец в норме* // *Вестн. с.-х. науки Казахстана.* – Алматы, РНИ «Бастау», – 2002. – № 5. – С. 62–63.
7. *Иргашев А. Ш. Локализация Т- и В-лимфоцитов в органах иммунной системы при легочном аденоматозе овец* // *Научные исследования в области животноводства Кыргызской Республики: сб. науч. тр. КыргНИИЖ.* – Бишкек, 1999. – С. 152–156.
8. *Иргашев А. Ш., Алдаяров Н. С., Manfred R. Морфофункциональное состояние интрамуральной лимфоидной ткани у собак в норме* // *Вестн. КАУ.* – Бишкек, 2007. – № 1 (7). – С. 150–153.
9. *Алдаяров Н. С. Функциональная иммуноморфология лимфатических узлов в норме у собак* // *Вестн. КАУ.* – Бишкек, 2007. – № 1 (7). – С. 153–157.
10. *Асанова Э., Иргашев И. Ш., Manfred R. Иммуногистохимическое исследование лимфатических узлов яка* // *Исследования, результаты.* – Алматы, 2008. – № 1. – С. 182–185.
1. Seleznev S.B., Fomina N.M. *Vozrastnaya morfologiya organov immunnoj sistemy u krupnogo rogatogo skota* [Voprosy intensivatsii proizvodstva s.-kh. produktov: materialy nauch.-teor. konf.]. Moscow: Izd-vo Un-ta druzhby narodov, 1989. pp 105–106.
2. Jones M., Cordell L.J., Beyers A.D., Tse A.G.D., Mason D.Y. Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. *J. Immunol.* Vol. 150 (1993): 5429–5435.
3. Collins L., Mahaffey E.A., Bounous D.I., Antczak D.F., Brooks R.L. Detection of equine and bovine T-and B-lymphocytes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.* Vol. 57 (1997): 187–200.
4. Gutierrez M., Forster F.I., McConnell S.A., Cassidy J.P., Pollock J.M., Bryson D.G. The detection of CD2+, CD4+, CD8+, and WC1+ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. *Vet. Immunol. Immunopathol.* Vol. 71 (1999): 321–334.
5. David C.W., Norrman J., Hammon H.M., Davis W.C., Blum J.W. Cell Proliferation, Apoptosis, and B- and T-Lymphocytes in Peyer's Patches of the Ileum, in Thymus and in Lymph nodes of Preterm Calves, and in Full-Term Calves at Birth and on Day 5 of Life. *J. Dairy Sci.* Vol. 86 (2003): 3321–3329.
6. Irgashev A.SH. *Immunomorfologiya i mikromorfometriya timusa ovets v norme* [Vestnik sel'skokhozyajstvennoj nauki Kazakhstana]. Almaty, RNI «Bastau». no. 5 (2002): 62–63.
7. Irgashev A.SH. *Lokalizatsiya T- i V- limfotsitov v organakh immunnoj sistemy pri legochnom adenomatoze ovets* [Nauchnye issledovaniya v oblasti zhivotnovodstva Kyrgyzskoj Respubliki: sb. nauch. tr. KyrgNIIZH]. Bishkek, 1999. pp. 152–156.
8. Irgashev A.SH., Aldayarov N.S., Manfred R. *Morfofunktsional'noe sostoyanie intramural'noj limfoidnoj tkani u sobak v norme* [Vestnik KAU]. Bishkek, no. 1 (7) (2007): 150–153.
9. Aldayarov N.S. *Funktsional'naya immunomorfologiya limfateskikh uzlov v norme u sobak* [Vestnik KAU]. Bishkek, no. 1 (7) (2007): 153–157.
10. Asanova E.H., Irgashev I.SH., Manfred R. *Immunogistokhimicheskoe issledovanie limfateskikh uzlov yaka* [Issledovaniya, rezul'taty]. Almaty, no. 1 (2008): 182–185.

HISTOLOGICAL RESEARCH AND IMMUNE HISTOCHEMICAL TEST OF THE CATTLE LYMPH NODES

Kasieva G.K.

Key words: lymph node, cattle, histological structure, immune histochemistry, T-lymphocytes, B-lymphocytes, macrophages, cell growth

Abstract. The article reveals the results on the cattle lymph nodes' histological structure and cell composition by means of carrying out histological methods, immune histochemical tests and applying polyclonal antibodies

and monoclonal antibodies. The author tests mediastinal lymph node, hepatportal lymph nodes and mesenteric lymph nodes belonging to 12 animals of the cattle aged from 1.5 to 7. The researcher applies Polyclonal Rabbit Anti-Human T cell, CD3, (PAP), Monoclonal Mouse Anti-Human B-Lymphocyte Antigen (BLA. 36) (ABC), Monoclonal Mouse Anti-Human Myeloid/Histocyte Antigen, Clone MAC 387 (PAP), Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, Clone PC10 (PAP) sera and makes conclusion they can be applied in immune histochemical test when dividing T-lymphocytes, B- lymphocytes, macrophages and cell growth in the cattle paraffin sections. The article describes the lymphocytes structure and defines location, intensity and spreading of T-lymphocytes, B-lymphocytes, macrophages and cell growth in T-zone and B-zone of lymph nodes' cortex and medullary substance. The publication declares the data received can be applied as fundamental data when carrying out morphological research on the cattle lymph node pathology.

УДК 591.414:591.436.2:636.597.85

ОСОБЕННОСТИ ВЕТВЛЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНЫХ ВЕН У УТКИ ПЕКИНСКОЙ

Л. В. Красникова, аспирант

Л. В. Фоменко, доктор ветеринарных наук
Омский государственный аграрный университет
им. П. А. Столыпина
E-mail: lw1987@yandex.ru

Ключевые слова: печень, утка пекинская, печеночные вены, каудальная полая вена

Реферат. Изучены особенности венозного оттока из печени утки пекинской. Для исследования печеночных вен использовался комплекс морфологических методов, включающих изготовление коррозионных препаратов. Установлено, что в каудальную полую вену под острым углом впадают правая и левая печёночные вены и множество мелких дополнительных вен, входящих самостоятельно по всей их поверхности. Выявлено, что каудальная полая вена состоит из интраорганной и экстраорганной частей и впадает в правое предсердие сердца. Правая печеночная вена формируется краниальной, краниолатеральной, медиальной и каудальной печеночными венами. Левая печеночная вена образуется краниальной, краниолатеральной, латеральной, медиальной, краниовентральной и каудовентральной печеночными венами. Отмечено много общего в топографии ветвления и особенностях оттока венозной крови от печени по правой и левой печеночным венам, что напрямую зависит от особенностей строения органа и его функционального значения. Выявлена общая закономерность разветвления интраорганных печеночных вен, через которые проходит кровь, обогащенная продуктами обмена веществ в результате функциональной деятельности печени. Проведённые исследования позволяют детализировать и уточнить особенности ветвления печёночных вен в печени утки пекинской.

Все венозные сосуды печени представляют единую гемодинамическую систему, разделяемую топографически на экстраорганные и интраорганные вены [1]. При изучении венозных сосудов печени у птиц выделяется приносящая система кровоснабжения, через которую венозная кровь поступает в орган, и выносящая, через которую кровь, обогащенная продуктами обмена веществ в результате функциональной деятельности печени, выходит из нее. Эту систему вен можно рассматривать как закономерный компонент сосудистого русла, служащий для выравнивания кровяного давления внутри печени [2].

Интерес к строению венозной системы печени со стороны морфологов, занимающихся про-

блемами гепатологии и болезнями печени птиц, сохраняется до настоящего времени. Особое внимание уделяется патологии печени птиц при кормлении высоко- и низкокалорийными кормами с примесью биологически активных добавок [3].

Для диагностики, лечения и профилактики заболеваний печени необходимы знания, которые, в свою очередь, должны базироваться на знании внутриорганного строения и функционального значения венозной системы печени птиц [3].

В доступной отечественной и зарубежной литературе имеются одиночные сведения по топографии экстраорганных венозных сосудов [2, 5–10], а по интраорганному разветвлению венозных сосудов данные вообще отсутствуют.