

УДК 636.1:619:616.1/4

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕМОЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ И СЕЛЕЗЕНКИ У ЛОШАДИ

Алмазбекова Бегайым Алмазбековна (0009-0002-4049-3113)

Асанова Элиза Ишембековна (0000-0002-8595-6225)

Кыргызский национальный аграрный университет им. К.И. Скрябина, г. Бишкек,
Кыргызская Республика

Аннотация: Цель данной статьи заключается в апробации поли- и моноклональных антител для выявления Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток на парафиновых гистосрезках у лошадей. Согласно протоколу, были использованы АВС метод и моноклональное мышинное антитело VLA. 36 для выявления В-лимфоцитов, РАР метод и поликлональное кроличье антитело CD 3 для выявления Т - лимфоцитов, моноклональное мышинное антитело MAC 387 для выявления макрофагов и моноклональное мышинное антитело (клон РС10) для выявления пролиферации клеток. Апробированные поли-и моноклональные антитела следует применить для выявления соответствующих клеток на парафиновых гистосрезках у лошадей. Проведенным исследованием установлено распространение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток в гемолимфатическом узле и селезенке, а также наличие в этих органах Т-зависимых и В-зависимых зон.

Ключевые слова: Иммуногистохимия, антитела CD 3, VLA. 36, MAC 387, клон РС10, парафиновые гистосрезы, лошади

ЖЫЛКЫНЫН ГЕМОЛИМФА БЕЗДЕРИН ЖАНА КӨК БООРУН ИММУНОГИСТОХИМИЯЛЫК ИЗИЛДӨӨЛӨРҮНҮН НАТЫЙЖАЛАРЫ

Алмазбекова Бегайым Алмазбековна (0009-0002-4049-3113)

Асанова Элиза Ишембековна (0000-0002-8595-6225)

К.И. Скрябин атындагы Кыргыз улуттук агрардык университети, Бишкек ш.,
Кыргыз Республикасы

Аннотация: Бул макаланын максаты жылкылардын парафиндик гистокесиндилеринде Т-лимфоциттерди, В-лимфоциттерди, макрофагтарды жана клеткалардын пролиферациясын аныктоо үчүн поли- жана моноклоналдык антителолорду апробациялык текшерүү. Протоколго ылайык, АВС ыкмасы жана моноклоналдык чычкан антителосу VLA. 36 В-лимфоциттерди аныктоо үчүн, РАР ыкмасы жана поликлоналдык коёндун CD 3 антителосу Т-лимфоциттерди аныктоо үчүн, моноклоналдык чычкандын антителосу MAC 387

макрофагтарды аныктоо үчүн, жана чычкандын моноклоналдык антителиосу (клон PC10) клетканын пролиферациясын аныктоо үчүн колдонулган. Жогоруда көрсөтүлгөн поли- жана моноклоналдык антителиолорду жылкылардын парафиндик гистокесиндилеринде тиешелүү клеткаларды аныктоо үчүн колдонсо болот. Жүргүзүлгөн илимий иштердин негизинде гемолимфа безинде жана көк боордо Т-лимфоциттердин, В-лимфоциттердин, макрофагтардын жана клеткалардын пролиферациясынын таралышы, ошондой эле бул органдарда Т-көз каранды жана В-көз каранды зоналардын бар экендиги аныкталган.

Негизги сөздөр: Иммуногистохимия, CD 3, BLA. 36, MAC 387, клон PC10 антителиолор, парафиндик гистокесиндилер, жылкы.

RESULTS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES OF HEMOLYMPHATIC NODES AND SPLEEN IN A HORSE

Almazbekova Begaiym Almazbekovna (0009-0002-4049-3113)

Asanova Eliza Ishembekovna (0000-0002-8595-6225)

Kyrgyz National Agrarian University named after K.I. Skryabin, Bishkek, Republic of Kyrgyzstan

Abstract: *the purpose of this article is to test poly- and monoclonal antibodies to detect T-lymphocytes, B-lymphocytes, macrophages and cell proliferation on paraffin histosections in horses. According to the protocol, ABC method and the mouse monoclonal antibody BLA.36 were used for detection of B-lymphocytes, PAP method and polyclonal rabbit CD 3 antibody for detection of T-lymphocytes, mouse monoclonal antibody MAC 387 for macrophage detection and mouse monoclonal antibody (clone PC10) for detection of cell proliferation. Tested poly- and monoclonal antibodies should be used to identify the appropriate cells on paraffin histosections in horses. The study established the spread of T-lymphocytes, B-lymphocytes, macrophages and cell proliferation in the hemolymph node and spleen, as well as the presence of T-dependent and B-dependent zones in these organs.*

Key words: *Immunohistochemistry, CD 3 antibodies, BLA. 36, MAC 387, clone PC10, paraffin sections, horses*

1. Введение

Сегодня в развитых странах иммуногистохимическое исследование является обязательной частью морфологических исследований в медицине и ветеринарной медицине и используется при диагностике

онкологических заболеваний, опухолей кроветворных и лимфоидных тканей, иммунокомплексных и аутоиммунных заболеваний, в определении возбудителей инфекционных и инвазионных болезней.

Имеется ряд научных публикаций по исследованию клеточного состава органов иммунной системы, по инфекционным, опухолевым и паразитарным заболеваниям, которые были выполнены с помощью иммуногистохимических методов с применением первичных поликлональных и моноклональных антител, используемые для дифференцировки Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток у человека.

Поликлональное антитело CD 3 и моноклональные антитела CD 79 α , MIB-1 используются для дифференциации Т- лимфоцитов, В- лимфоцитов и пролиферации клеток у овец (Irgashev A.,2002,с.89;Иргашев А.Ш.,2002,с.62), а также антилизоцимное моноклональное антитело и моноклональное антитело PCNA можно использовать соответственно для выявления макрофагов и пролиферации клеток у овец (Жолойбеков А.Ж.,2019, с.62).

Поликлональное антитело CD 3 и моноклональные антитела CD 79 α , MAC 387 и PCNA используются для дифференциации Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток у собак (Иргашев А.Ш., 2006, с. 85).

Поликлональное антитело CD 3 и моноклональные антитела VLA.36, MAC 387 и PCNA используются для дифференциации Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток у яков (Асанова Э.И., 2008, с.182; Асанова Э.И.,2021, с.39) и у крупного рогатого скота (Касиева Г.К., 2015, с.13; Жолойбеков А.Ж., 2021, с.70).

Поликлональное антитело CD 3 и моноклональные антитела CD 79 α , MIB-1 и Aps 175 используются для

дифференциации Т- лимфоцитов, В-лимфоцитов, пролиферации и апоптоза клеток при лимфоме у собак (Жумаканова З.Т., 2016, с. 13).

Поликлональное антитело CD 3 и моноклональные антитела CD 79 α и PCNA используются для дифференциации Т- лимфоцитов, В-лимфоцитов и пролиферации клеток у свиней (Иргашев А.Ш., 2017, с.47; Каландарова З.К., 2016, с.55; Irgashev A.,2021, с. 173).

Моноклональное антитело VLA.36 также используются для выявления В-лимфоцитов у лошадей, а антитела CD3 и CD5 можно использовать для выявления Т-лимфоцитов у лошадей (Collins, K.L.,1997, с.187).

Поли- и моноклональные антитела CD3, VLA 36 и MAC 387 используются соответственно для выявления Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов у лошадей (Lemos K.R., 2007, с.186; Gretchen H. D., 2016, с.2), а также CD79 α (mAb HM57, Dako) для выявления В-лимфоцитов в тканях лошадей, фиксированных формалином и залитых парафином (Gretchen H. D.,2016, с.2).

Также поли- и моноклональные CD3 и CD79 α антитела используются при дифференциальной диагностике Т-клеточной и В-клеточной лимфомы, лейкоза у лошадей (Meyer J.,2006, с. 914; Rendle D.I., 2007, с. 522; De Bruijn C.M., 2007, с. 63).

Вышеуказанные данные говорят о том, что иммуногистохимические исследования успешно применяются при фенотипировании клеточного состава тканей иммунной системы, при диагностике лимфом животных, в том числе лошадей.

Целью данной статьи является апробация поликлонального и

моноклональных антител для выявления основных иммунокомпетентных клеток и пролиферации клеток на парафиновых гистосреззах у лошадей с применением иммуногистохимических методов.

2. Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили селезенка и гемолимфатические узлы лошадей. Кусочки от селезенки и гемолимфатических узлов были зафиксированы в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина в соответствии с методиками, описанными в руководстве Г.А. Меркулова по патогистологической технике (1969). Процесс обезвоживания кусочков производился в вакуумной машине согласно специальной программе по обезвоживанию кусочков. После обезвоживания кусочки были залиты парафином. Затем из парафиновых блоков готовились серийные срезы на микротоме толщиной 2-4 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

При иммуногистохимическом окрашивании гистологических срезов были использованы АВС метод для выявления В- лимфоцитов, РАР метод для выявления Т - лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток. Для выявления Т-лимфоцитов использовали поликлональное кроличье антитело на Т-клетки человека (CD 3); В-лимфоцитов -

моноклональное мышинное антитело на антиген В-лимфоцитов человека (ВLА. 36); макрофагов – моноклональное мышинное антитело на миелоидный/ гистоцитарный антиген человека (клон МАС 387); пролиферацию клеток - моноклональное мышинное антитело на пролиферативный клеточный ядерный антиген (клон РС10).

При положительной реакции Т-лимфоциты, В-лимфоциты и пролиферирующие клетки окрашивались в коричневый цвет, а макрофаги в темнокоричневый цвет, а ядра неокрашенных клеток в синий цвет. Читка гистопрепаратов производилась с помощью бинокулярных микроскопов.

3. Результаты исследования

До проведения иммуногистохимических исследований гистосрезы были окрашены гематоксилином и эозином для описания гистостроения гемолимфатического узла и селезенки.

Гистологически подкапсулярные и мозговые синусы гемолимфатических узлов заполнены кровью. В корковом веществе имеются лимфоидные фолликулы округлой формы со светлым центром и без светлого центра. Лимфоидные фолликулы представлены лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками и бластными клетками (Рис. 1а).

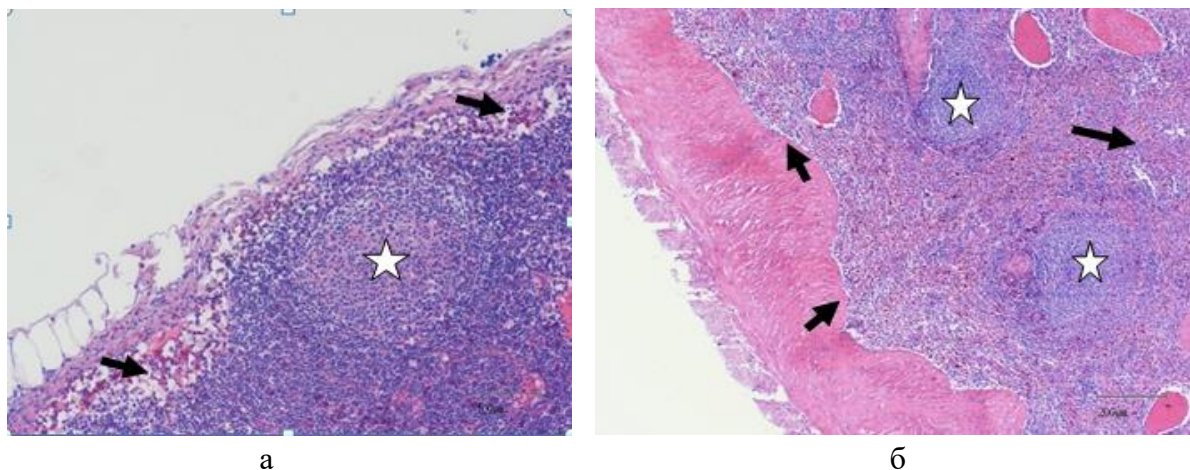


Рис.1. Парафиновые гистосрезы. а) Гемолимфатический узел лошади. Подкапсулярные синусы заполнены кровью (стрелки). Лимфоидные фолликулы в корковом веществе (звездочки). б) Селезенка лошади. Белая пульпа (звездочки) и красная пульпа (стрелки). Окраска гематоксилином и эозином.

Гистологически пульпа селезенки состоит из белой и красной пульпы. Белая пульпа сформирована из лимфоидных фолликулов и клеточных скоплений вокруг центральных артерий. Лимфоидные фолликулы могут быть со светлым центром, мантийной и маргинальной зонами, а также без светлого центра и выраженных зон. Белая пульпа имеют округлую, округло-овальную формы и состоят из лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов. Красная пульпа окружает белую пульпу селезенки и состоит из эритроцитов, лимфоцитов, плазматических клеток и макрофагов. В красной пульпе преобладают эритроциты (Рис. 1б).

При иммуногистохимическом окрашивании гистосрезов гемолимфатических узлов и селезенки с применением поликлонального кроличьего антитела на Т-клетки человека CD3 Т-лимфоциты окрашены на коричневый цвет, и они в большом количестве располагаются в паракортикальной зоне коркового вещества гемолимфатических узлов (Рис. 2а) и вокруг центральных артерий белой пульпы селезенки (рис.2б). А лимфоидные фолликулы не окрашены, но в их светлом центре имеются единичные Т-лимфоциты. Кроме этого, Т-лимфоциты также расположены в подкапсулярном синусе, в мозговых тяжах и синусах мозгового вещества.

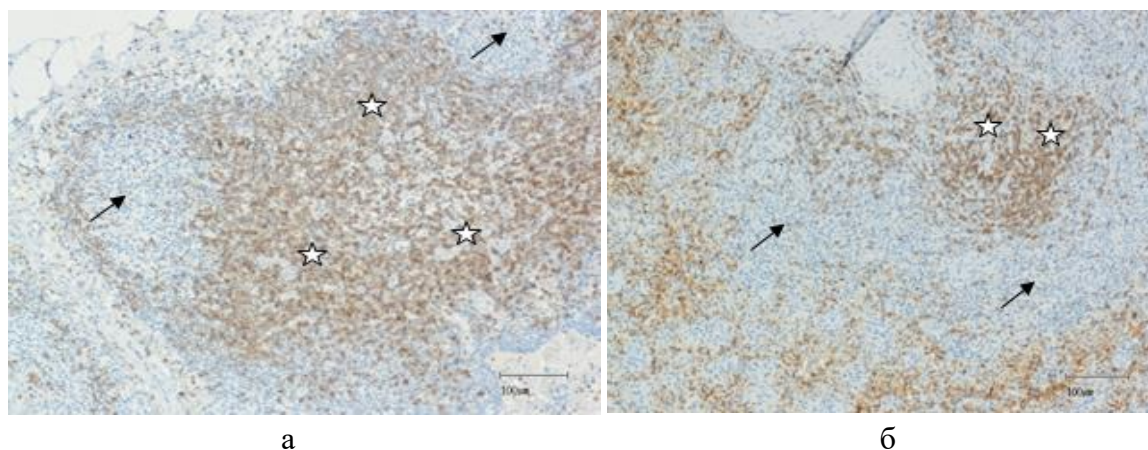


Рис. 2. Парафиновые гистосрезы гемолимфатического узла (а) и селезенки лошади (б).

В обоих гистосреззах Т-лимфоциты окрашены на коричневый цвет. Масса Т-лимфоцитов располагаются в паракортикальной зоне коркового вещества гемолимфатического узла и вокруг центральных артерий белой пульпы (звездочки), тогда как лимфоидные фолликулы гемолимфатических узлов и белой пульпы селезенки не окрашены. В светлом центре лимфоидных фолликулов гемолимфатического узла и селезенки имеются единичные Т-лимфоциты (тонкие стрелки). РАР метод (анти CD-3).

При иммуногистохимическом окрашивании гистосреззов гемолимфатических узлов с применением моноклонального мышиного антитела ВLА. 36 В-лимфоциты окрашены на коричневый цвет. На микрофотографии гемолимфатических узлов и селезенки видно, что В- лимфоциты в основном

располагаются в лимфоидных фолликулах в корковом веществе и белой пульпе селезенки (Рис.3). В-лимфоциты также в меньшем количестве расположены в синусах, в мозговых тяжах и синусах мозгового вещества гемолимфатических узлов и в красной пульпе селезенки (Рис.3).

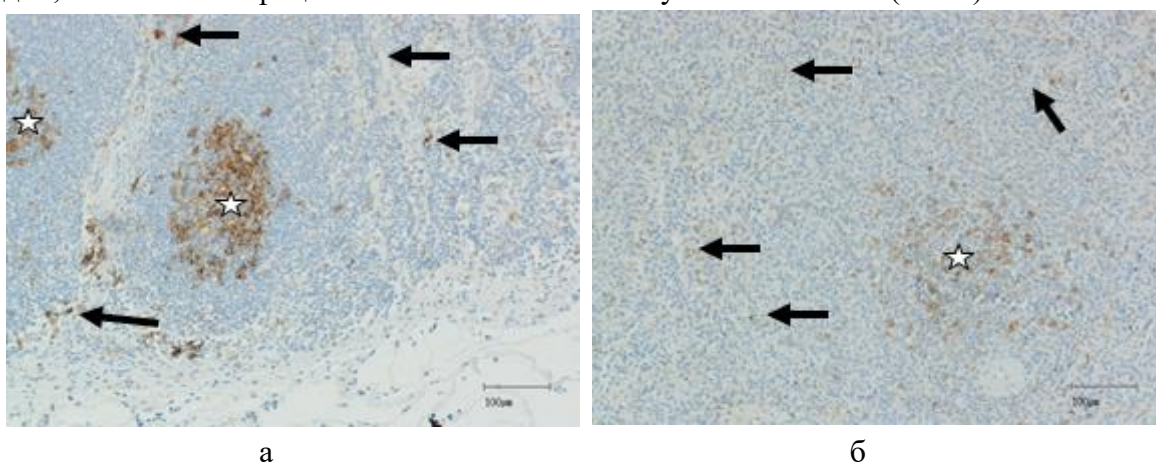


Рис. 3. Парафиновые срезы гемолимфатического узла (а) и селезенки (б) лошади. В обоих гистосреззах В-лимфоциты окрашены на коричневый цвет. Масса В-лимфоцитов в лимфоидных фолликулах (звездочки), малое количество В-лимфоцитов в мозговом веществе гемолимфатического узла и в красной пульпе селезенки (стрелки). АВС метод (анти ВLА.36).

При иммуногистохимическом окрашивании гистосреззов гемолимфатических узлов и селезенки с применением моноклонального мышиного антитела МАС 387 макрофаги окрашены на темно коричневый цвет. Как видно на микрофотографии макрофаги расположены в корковом и мозговом веществе, синусах и в светлом

центре лимфоидных фолликулов гемолимфатических узлов (Рис.4а). В селезенке макрофаги в большом количестве располагаются вокруг лимфоидных фолликулов, затем в красной пульпе (Рис.4б). Единичные макрофаги также располагаются в светлом центре лимфоидных фолликулов.

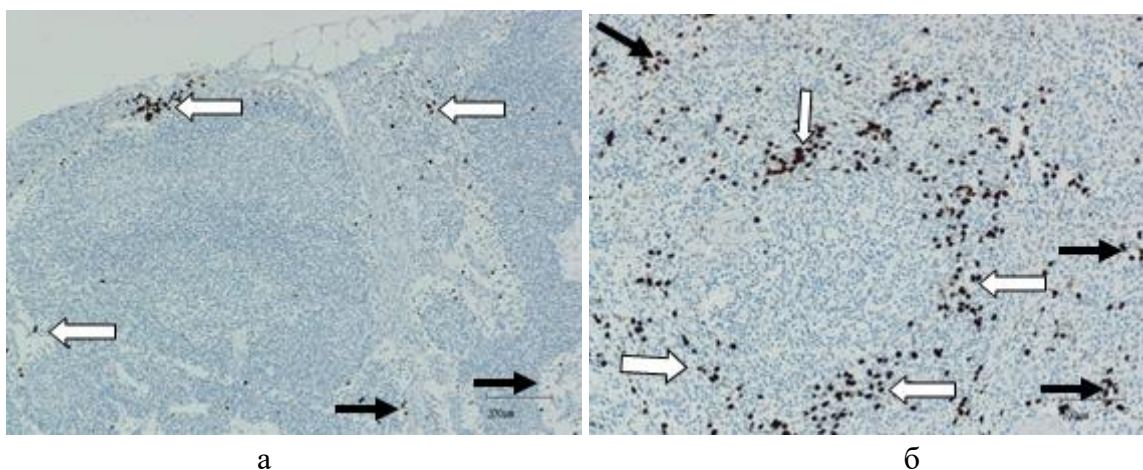


Рис. 4. Парафиновые срезы гемолимфатического узла (а) и селезенки (б) лошади. В обоих гистосрезях макрофаги окрашены на темно коричневый цвет. Разбросанные макрофаги в корковом (белые стрелки) и мозговом веществе (черные стрелки) гемолимфатического узла (а) и масса макрофагов вокруг белой пульпы (белые стрелки) и в красной пульпе (черные стрелки) селезенки (б). РАР метод (МАС-387).

При иммуногистохимическом окрашивании гистосрезей гемолимфатических узлов с применением моноклонального мышинового антитела Anti-PCNA пролиферация клеток окрашены коричневым цветом. На микрофотографии видно, что интенсивная пролиферация бластных клеток отмечается в светлом центре лимфоидных фолликулов коркового

вещества гемолимфатических узлов. Также отмечается слабая пролиферация бластных клеток в паракортикальной зоне и в мозговом веществе (Рис.5а). В селезенке пролиферирующие клетки в большом количестве располагаются в светлом центре лимфоидных фолликулов, затем вокруг центральных артерий белой пульпы и в красной пульпе (Рис.5б).

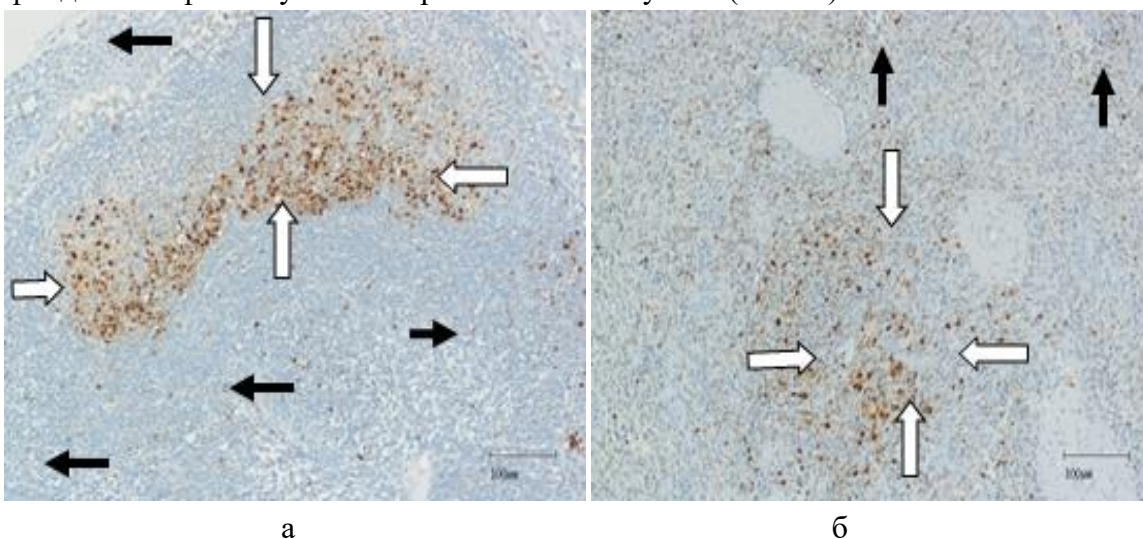


Рис. 5. Парафиновые срезы гемолимфатического узла (а) и селезенки (б) лошади. В обоих гистосрезях пролиферация клеток окрашены на коричневый цвет. (а) Интенсивная пролиферация лимфобластов в лимфоидных фолликулах (белые стрелки) и малое количество пролиферирующих клеток (черные стрелки) в корковом и мозговом веществе гемолимфатического узла. (б) Пролиферация лимфобластов в лимфоидных фолликулах (белые стрелки) белой пульпы и малое количество пролиферирующих клеток в красной пульпе (черные стрелки). РАР метод (анти PCNA).

4. Дискуссия

Поли- и моноклональные антитела, используемые для дифференцировки поверхностных маркеров лейкоцитов человека, могут применяться и в ветеринарной медицине для выявления лейкоцитов экспериментальных и домашних животных, если молекулы лейкоцитов животных и человека гомологичны (Maskay С., 1988, с.2).

Наши исследования еще раз подтверждают полученные данные K.L. Collins и др. (1997), K.R. Lemos и др. (2007), H. D. Gretchen и др. (2016), J. Meyer и др. (2006), D.I. Rendle и др. (2007), С.М. De Bruijn и др. (2007), которые исследовали ткани у лошадей, зафиксированные формалином и залитые парафином с применением вышеуказанных апробированных антител.

В заключении следует подчеркнуть, что апробированные поликлональные и моноклональные антитела рекомендуем использовать для выявления Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток в тканях лошадей, зафиксированные формалином и залитые парафином, а также для дифференциальной диагностики и исследования лимфом и опухолей у лошадей.

5. Выводы

1. Поликлональное кроличье антитело на Т-клетки человека (CD 3) выявляет Т-лимфоциты на парафиновых гистосреззах у лошадей.
2. Моноклональное мышинное антитело на антиген В-лимфоцитов человека (BLA. 36) выявляет В-лимфоциты в парафиновых гистосреззах у лошадей.

3. Моноклональное мышинное антитело на миелоидный/ гистоцитарный антиген человека (клон MAC 387) выявляет макрофагов в парафиновых гистосреззах у лошадей.

4. Моноклональное мышинное антитело на пролиферативный клеточный ядерный антиген (клон PC10) выявляет пролиферации клеток в парафиновых гистосреззах у лошадей.

5. Установлено распространение Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, макрофагов и пролиферации клеток в гемолимфатическом узле и селезенке, а также Т-зависимые и В-зависимые зоны вышеуказанных органов.

6. Рекомендуем создать в университете лабораторию иммуногистохимии по исследованию органов иммунной системы и по диагностике лимфом и опухолей.

6. Использованная литература

1. Асанова Э., Manfred Reinacher, Иргашев И.Ш. Иммуногистохимическое исследование лимфатических узлов яка// Издәністер, нәтижелер. 2008. № 1. С. 182.
2. Асанова Э.И., Иргашев А.Ш., Ишенбаева С.Н. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование бронхо-ассоциированной лимфоидной ткани у яков// Наука, новые технологии и инновации. 2021. № 1. С. 39-42.
3. Жолойбеков А., Иргашев А.Ш., Райнахер М. Ларвальный (гидатидозный, цистный) эхинококкоз овец: распространение, патоморфология и иммуноморфология// Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. 2019. № 1 (50). С. 62-70.
4. Жолойбеков А.Ж., Иргашев А.Ш., Асанова Э.И. Эхинококкоз печени крупного рогатого скота: пораженность и иммуноморфологические изменения в портальных лимфатических узлах//

- Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. 2021. № 1. С. 70-74.
5. Жумаканова, З.Т. Диагностика и дифференциация лимфомы у собак [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.01 / З.Т. Жумаканова. – Б., 2016. – 25 с.
 6. Иргашев А.Ш. Иммуноморфология и микроморфометрия тимуса овец в норме// Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. 2002. № 5. С. 62.
 7. Иргашев А.Ш., Алдаяров Н.С. Демонстрация иммунокомпетентных клеток в периферических органах иммуногенеза у клинически здоровых собак// Вестник КНАУ им. К.И. Скрябина. 2006. № 2. С. 85.
 8. Иргашев А.Ш., Каландарова З.К., Арбаев К.С., Райнахер М. Возрастные особенности гистологической структуры и клеточного состава лимфоидной ткани, ассоциированной с конъюнктивой, у свиней// Морфология. 2017. Т 152. № 6. С. 47-51.
 9. Каландарова З.К., Иргашев А.Ш., Арбаев К.С. Гистологическое строение конъюнктивно-ассоциированной лимфоидной ткани у свиней в возрастном аспекте// Вестник АПК Верхневолжья. 2016. № 1 (33). С. 55-59.
 10. Касиева Г.К. Сравнительные иммуногистохимические исследования лимфатических узлов и селезенки крупного рогатого скота//Аграрный вестник Верхневолжья. 2015. № 2-11. С. 13-18.
 11. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. -Л.: Медицина, 1969. -423 с.
 12. Collins, K.L. Detection of equine and bovine T- and B- lymphocytes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues [Text] / K.L.Collins, D.I.Bounous, D.F.Antczak // Vet.Immunol.Immunopath. – 1997. – Vol.57. – P.187-200.
 13. De Bruijn C.M., Veenman J.N., Rutten VPMG, Teske E, van Nieuwstadt RA, van den Ingh TSGAM. Clinical, histopathological and immunophenotypical findings in five horses with cutaneous malignant lymphoma. Research in Veterinary Science. 2007(Aug);83(1):63–72.
 14. [Gretchen H. Delcambre, Junjie Liu, Jenna M. Herrington, Kelsey Vallario, Maureen T. Long](#) Immunohistochemistry for the detection of neural and inflammatory cells in equine brain tissue// [PeerJ](#). 2016; 4.
 15. Irgashev A., Mitrofanov B., Gutberlet K., Rudolph R. Detection and distribution of T-and B-lymphocytes in the lungs of sheep naturally infected with sheep pulmonary adenomatosis// [Материалы научно практической конференции](#). 2002. № 2. С. 89.
 16. Irgashev A., Kalandarova Z., Ishenbaeva S., Asanova E.Tagayev, T.,Vityala Y., Vityala S. Immunohistochemical Study of Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in Piglets and Pigs(Article)// Exploratory Animal and Medical Research. V. 11, Issue 2, 2021, P. 173-178
 17. Lemos K.R., Marques L.C., Aquino L.P.C.T., Alessi A.C., Zacarias R.Z. Immunohistochemical characterization of mononuclear cells and MHC II expression in the brain of horses with experimental chronic Trypanosoma evansi infection. Revista Brasileira de Parasitology Veterinária, 2007. v. 16, n. 4, p. 186-192.
 18. Mackay C. Sheep leukocyte molecules: a review of their distribution, structure and possible function //Vet. Immunol. Immunopathol. -1988. – Vol. 19. – P. 1-20.

19. Meyer J., Delay J., Bienzle D. Clinical, laboratory and histopathologic features of equine lymphoma. *Vet Pathol.* 2006; 43:914–924
20. Rendle D.I., Durham A.E., Thompson J.C., Archer J., Mitchell M., Saunders K., Millere J., Paillot R., Smith K.C. and Kydd J.H. Clinical, immunophenotypic and functional characterisation of T-cell leukaemia in six horses. *Equine vet. J.* 2007. 39. P. 522-528.