

УДК 576.08

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ IBA-1-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ В ОТВЕТ НА ПОСТУПЛЕНИЕ СОЛИ КАЛЬЦИЯ С ПИТЬЕВОЙ ВОДОЙ

Мельникова О.В., Сергеева В.Е.

*ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, e-mail: Olga1407@bk.ru*

Исследование посвящено идентификации, морфологическому описанию и исследованию динамики количества, размеров и оптической плотности Iba-1-позитивных клеточных структур селезенки интактных крыс и на фоне длительного употребления соли кальция с питьевой водой. С помощью иммуногистохимического метода – непрямого иммуноферментного анализа с антителами к кальций-связывающему адапторному молекулам (Iba-1) – были выявлены Iba-1-позитивные клетки селезенки, имеющие моноцитарно-макрофагальное происхождение. Максимальная концентрация Iba-1-позитивных клеток обнаружена около периаартериальных макрофагальных муфт с клетками, обладающими фагоцитарной активностью. Структурная организация большинства выявленных Iba-1-позитивных клеток белой и красной пульпы селезенки крыс позволяет идентифицировать эти клетки как макрофаги. Они имеют характерные локализацию и форму, своеобразное ветвление отростков, что соответствует многочисленным описаниям и изображениям в литературе. Установлено, что происходит компенсаторная реакция органа в ответ на поступление кальция в организм, обнаруживается качественная конформация клеток в сторону активации макрофагов за счет увеличения концентрации специфического пептида Iba-1, аккумулирующего ионы кальция.

**Ключевые слова:** селезенка, препараты кальция, кальций-связывающий пептид, Iba-1-позитивные клетки

## MORPHOLOGICAL REORGANIZATION OF THE IBA-1-POSITIVE SPLEEN CELLS AFTER THE USE OF CALCIUM SALTS WITH DRINKING WATER

Melnikova O.V., Sergeeva V.E.

*Chuvash State University named I.N. Ulyanov, Cheboksary, e-mail: Olga1407@bk.ru*

The study devoted to the identification, morphological description and the dynamics of the number, size and optical density of Iba-1-positive cells in the spleen of intact rats, and prolonged use of calcium salts in drinking water. Using immunohistochemistry method with anti-calcium-binding adapter molecule (Iba-1) were identified Iba-1 positive cells of the spleen, having monocyte-macrophage origin. The maximum concentration of Iba-1 positive cells were detected around periarterial macrophage couplings with cells having phagocytic activity. Structural organization of the majority of the identified Iba-1-positive cells in white and red pulp of the rats spleen allows the identification of these cells as macrophages. Its have a characteristic location and shape, special branching processes, which corresponds to the numerous descriptions and images in the literature. So, the compensatory reaction of organ in response to the intake of calcium is found quality conformation cells towards activation of macrophages by increasing the concentration of a specific peptide Iba-1, accumulating calcium ions.

**Keywords:** spleen, calcium, calcium-binding peptide, Iba-1-positive cells

Интерес к иммуномодулирующей терапии резко возрос в последние годы ввиду снижения иммунологической реактивности населения в целом и, как следствие, повышения инфекционной, аутоиммунной, онкологической, аллергической заболеваемости. Известно большое количество различных иммуностимулирующих препаратов, однако минимальное внимание в их ряду уделяется макро- и микроэлементам. Исследования в данной области позволят по-новому подойти к селективной модуляции отдельных звеньев иммунитета с помощью таких препаратов [1, 4].

По мнению большинства исследователей влияние кальция на организм, в частности на иммунокомпетентные клетки, остается малоизученным [4, 5]. Избирательные методы регуляции иммунных процессов могут быть глубже исследованы тогда, когда станут ясны механизмы иммунологической

реактивности. Следовательно, выявление свойств и концентрации специфических маркеров антиген-презентирующих клеток лимфоидных органов и в частности селезенки после длительного воздействия препаратов кальция можно определить как попытку установления материальных основ афферентного звена модуляции иммунитета с помощью макро- и микроэлементов.

В многочисленных исследованиях, посвященных воздействию иммуотропных препаратов на организм, в основном использованы функциональные, клинические и иммунологические методы исследования [3, 4]. В научной литературе практически отсутствуют работы, в которых бы изучали структурную организацию и иммунокомпетентные клетки органов иммунной системы и, в частности, селезенки при поступлении кальция в организм. Кроме того, в условиях

клиники органы иммунной системы недоступны для морфологического изучения после иммунокорректирующих лечебных мероприятий.

Iba-1 – кальций-связывающий пептид, который является специфическим маркером всех макрофагов (дентритных, интердигитирующих). Данный белок расположен в цитоплазме и ядрах изученных клеток [3]. Белок Iba-1 кодируется геном AIF-1, который располагается в области главного комплекса гистосовместимости (класс III) [7]. Этот белок участвует в регуляции процесса фагоцитоза у макрофагов и микроглиоцитов [9]. В последние годы иммуноцитохимическую реакцию на белок Iba-1 успешно применяют для маркировки активированной микроглии в ЦНС [3, 9]. До настоящего момента изучение данного пептида было ограничено только в пределах нервной системы. Наличие данных клеток в центральных и периферических органах иммунной системы сих пор не было доказано. Настоящее исследование направлено на определение Iba-1-позитивных клеток органов иммунной системы, в частности селезенки.

**Цель исследования** – идентификация, морфологическое описание и исследование количества, размеров и оптической плотности Iba-1-позитивных клеточных структур селезенки крыс в норме и на фоне длительного употребления соли кальция с питьевой водой.

#### Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование выполнено в гистологической лаборатории ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», является частью комплексной программы «Гистохимия биогенных аминов в морфофункциональном состоянии органов и тканей в норме и в эксперименте» и входит в Координационный план РАМН (Российская Академия медицинских наук) (№ госрегистрации 0120.085.1887 от 10.09.2008 г.).

Объектом исследования служили 64 селезенки белых нелинейных лабораторных крысов-самцов одного возраста и одной массы (150–200 г). Исследуемые животные разделены на 2 группы:

Первая группа – контрольные животные ( $n = 32$ ), получавшие *ad libitum* питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02.

Вторая группа – подопытные животные ( $n = 32$ ), получавшие *ad libitum* питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02, с добавлением хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в пересчете на кальций.

Ежедневно в течение двух месяцев опытные животные получали с питьевой водой в среднем 8,1–10,2 мг/кг кальция. Выбор хлорида кальция для изменения концентрации кальция в питьевой воде обусловлен его растворимостью и опытом использования другими исследователями [1, 2].

Все действия, предусматривающие контакты с экспериментальными животными, проводились согласно «Правилам проведения работ с использова-

нием экспериментальных животных» (приказ № 742 от 13.11.84 г. МЗ СССР), требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Выведение животных из эксперимента проводилось путем декапитации. Селезенку животных фиксировали 10% нейтральным формалином, обезвоживали и заливали в парафин по стандартной методике.

Иммуногистохимический метод непрямого иммуноферментного анализа с антителами к кальций-связывающим адапторным молекулам (Iba-1) был использован для выявления Iba-1-позитивных клеток, имеющих моноцитарно-макрофагальное происхождение [10]. Срезы обрабатывались по стандартному протоколу: эндогенная пероксидазная активность подавлялась путем инкубации срезов в 3% растворе перекиси водорода в течение 30 минут с последующей трехкратной промывкой 0,1 М фосфатным буфером; блок неспецифического связывания проводился при инкубировании срезов в течение 1 часа при комнатной температуре в 10%-ной козьей сыворотке. В качестве первичных антител для выявления кальций-связывающих адапторных молекул (Iba-1) были применены антитела против белка Iba-1 (1:500; Rabbit, Wako, Japan). Инкубация с первичными антителами проводилась в течение 18 часов при температуре 4°C. В качестве вторичных антител использовались биотинилированные антитела (1:250; goat anti-rat IgG; Vector Laboratories). Для выявления биотининовой метки срезы обрабатывались авидин-пероксидазным комплексом (ABC, Vector Laboratories). Инкубация с 3,3-диаминобензидин тетрахлоридом (Sigma-Aldrich) придавала специфическое коричневое окрашивание структурам, содержащим белок Iba-1.

Морфометрический анализ включал измерение размеров Iba-1-позитивных клеточных структур (при увеличении объектива 10, 40, 100 и окуляра 18) под световым микроскопом МИКМЕД-5 с винтовым окулярным микрометром МОВ-1. Расчет площадей клеток проводился с использованием компьютерной программы «Sigma Scan Pro 5.0». О количественном распределении клеток судили по подсчету их в 12 полях зрения при увеличении объективов 40 и окуляра 18.

Замер оптической плотности вещества в клетках проводился с помощью программы «Sigma Scan Pro 5.0» в у.е. по сравнению с контрастом – плотность предметного стекла. Изучалась оптическая плотность мембранного белка Iba-1 в клеточных элементах селезенки. Исследованию подвергались 5 полей зрения микроскопа МИКМЕД-5, при увеличении в 720 раз (об. 40, ок. 18).

Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel с оценкой достоверности различия средних величин по t-критерию Стьюдента и непараметрическим критериям Вилкоксона – Мана – Уитни. В работе приведены три уровня достоверности с вероятностью погрешности  $p < 0,0002$ ,  $p < 0,38$  и  $p < 0,04$  даны для различий изучаемых показателей у крыс в сравнении с идентичными в контрольной группе [6].

#### Результаты исследования и их обсуждение

В данном исследовании пептид Iba-1 был впервые обнаружен в клетках красной пульпы, реактивной, мантийной и марги-

нальной зон лимфоидных узелков селезенки крыс в норме и после длительного поступления кальция.

В контрольной группе животных просматривается темно-коричневый фон срезов (красная пульпа селезенки), в котором хорошо контурируются лимфоидные узелки более светлого цвета. Последние имеют округлую форму, но различную величину. Внутри просматриваются центральные артериолы, расположенные эксцентрично. При увеличении микроскопа об. 40, ок. 18 определяются Iba-1-позитивные клеточные структуры однородного, интенсивно коричневого цвета, звездчатой формы, с множественными тонкими ветвящимися отростками. Они располагаются в узких межклеточных пространствах селезенки и форменных элементов крови (рис. 1, 2). Максимальная концентрация Iba-1-позитивных клеток обнаружена около периартериальной макрофагальной муфты.

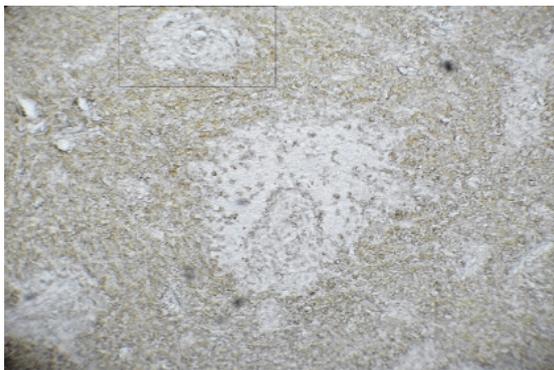


Рис. 1. Селезенка крысы. Интактная группа. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Iba-1. Микроскоп Микмед-5. Об. 10, ок. 18



Рис. 2. Лимфоидный узелок селезенки крысы. Интактная группа. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Iba-1. Микроскоп Микмед-5. Об. 40, ок. 18

Общее абсолютное число идентифицированных как Iba-1-позитивных клеток в опыт-

ной группе равно 209, в контроле – 202 клетки (в 5 полях зрения микроскопа, об. 40, ок. 18).

После длительного поступления кальция в срезах селезенки внимание акцентируется на значительно укрупненных лимфоидных узелках за счет объединения и слияния нескольких соседних. В результате этого лимфоидные узелки приобретают полиморфную форму (рис. 3). Отличительной характеристикой микроструктур селезенки опытной группы также является четко выраженная маргинальная зона, отграничивающая лимфоидные узелки от красной пульпы за счет сконцентрированных Iba-1-позитивных макрофагов. Данная группа клеток наиболее представлена в белой пульпе, выявляясь, как правило, около центральных артериол.



Рис. 3. Селезенка крысы. После поступления кальция с питьевой водой в течение 60 суток. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Iba-1. Микроскоп Микмед-5. Об. 10, ок. 18

После двухмесячного поступления с питьевой водой кальция в гистологических срезах селезенки наблюдается тенденция к стабилизации размеров Iba-1-позитивных клеток, а значительные численные отличия не обнаруживаются между разными популяциями клеток в сравниваемых группах (табл. 1). В обеих группах обнаруживается преобладание крупных размеров клеток (вероятно, за счет длинных ветвящихся отростков). Однако абсолютное число очень крупных клеток в опытной группе превосходит на 40,7%, что может свидетельствовать о склонности к укрупнению позитивных макрофагов.

Результат морфометрии свидетельствуют о том, что объем тех же клеточных структур обнаруживается преобладание малых популяций в обеих группах (табл. 2). После воздействия кальция происходит снижение числа клеток большого объема и рост числа средних размеров, что в общей картине дает представление о незначительном уменьшении объема исследуемых клеток.

Таблица 1

Морфометрические показатели площади Iba-1-позитивных клеток селезенки интактных крыс и после длительного употребления кальция

Популяции Iba-1-позитивных клеток селезенки крыс	Площадь клеток, мкм <sup>2</sup>	Количество Iba-1-позитивных клеток в контрольной группе, ед. (%)	Количество Iba-1-позитивных клеток в опытной группе, ед. (%)	Степень и направленность изменений
Малые	13–95,9	32 (15,8%)	18 (8,6%)*	–7,2%
Средние	96–197,9	62 (30,6%)	78 (37,3%)*	+6,7%
Крупные	198–388,9	89 (44,0%)	81 (38,7%)*	–5,3%
Очень крупные	> 389	19 (9,6%)	32 (15,4%)*	+5,8%
Количество Iba-1-позитивных клеток в пяти полях зрения микроскопа		202	209	+3,4%

Примечание. \* – достоверность ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными данными.

Таблица 2

Морфометрические показатели объема Iba-1-позитивных клеток селезенки интактных крыс и после длительного употребления кальция

Популяции Iba-1-позитивных клеток селезенки крыс	Объем клеток, мкм <sup>3</sup>	Количество Iba-1-позитивных клеток в контрольной группе, ед. (%)	Количество Iba-1-позитивных клеток в опытной группе, ед. (%)	Степень и направленность изменений
Малые	33–629,9	103 (50,9%)	111 (53,1%)*	+2,2%
Средние	630–1944,9	61 (30,1%)	80 (38,2%)*	+8,1%
Крупные	1945–4141,9	33 (16,3%)	16 (7,6%)*	–8,7%
Очень крупные	> 4142	5 (2,7%)	2 (1,1%)*	–1,6%
Количество Iba-1-позитивных клеток в пяти полях зрения микроскопа		202	209	+3,4%

Примечание. \* – достоверность ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными данными.

В контрольной группе оптическая плотность кальций-связывающего белка (Iba-1) равна 0,78 у.е. (при стандартном отклонении 0,04). В опытной группе крыс, употреблявших питьевую воду с кальцием, наблюдается достоверное увеличение плотности этого мембранного белка до 0,91 (при стандартном отклонении 0,1). Расчет критерия Стьюдента, который равен 0,009, показал высокую достоверность результатов.

#### Заключение

В нашем исследовании пептид Iba-1 был впервые обнаружен в клетках белой и красной пульпы селезенки крыс в норме и после длительного поступления кальция. Максимальная концентрация Iba-1-позитивных клеток обнаружена около периартериальных макрофагальных муфт с клетками, обладающими фагоцитарной активностью. Сравнение полученных данных с результатами других исследований позволяет предположить, что не все используемые в на-

стоящее время антитела к белку Iba-1/AIF-1 выявляют один и тот же продукт [3, 7, 9].

Iba-1-позитивные клетки в большом количестве представлены в белой пульпе, выходясь, как правило, около центральных артериол (T-зависимая зона). Это дает нам повод предположить преобладание интердигитирующих макрофагов в данной зоне. В обеих группах обнаруживается преобладание малых размеров клеток.

Структурная организация большинства выявленных Iba-1-позитивных клеток белой и красной пульпы селезенки крыс позволяет идентифицировать эти клетки как макрофаги. Они имеют характерные локализацию и форму, своеобразное ветвление отростков, что соответствует многочисленным описаниям и изображениям в литературе [3, 8, 9].

Как показывают литературные источники, к макрофагам относят моноциты крови, гистиоциты соединительной ткани, эндотелиальные клетки капилляров селезенки.

Типичные макрофаги селезенки располагаются внутри и снаружи синусов, среди адвентициальных или паренхиматозных клеток. Они имеют неровную поверхность с многочисленными гребнями [8, 9]. В лимфоидных узелках селезенки, богатых В-лимфоцитами, преобладают дендритные ретикулярные клетки. Эти клетки, по данным Wen L. (2005), не фагоцитируют, имеют тонкий ободок цитоплазмы и соединены друг с другом десмосомами. В областях, богатых Т-лимфоцитами (периартериальные лимфатические муфты селезенки), клетки стромы имеют полиморфное ядро и отростки особой формы, напоминающие переплетающиеся пальцы. Это интердигетирующие макрофаги – крупные клетки, в цитоплазму которых глубоко выпячивается либо часть лимфоцита, либо весь лимфоцит. В то же время Wen L. расценивает их вместе с дендритными как ретикулярные клетки [11]. McCuskey L. (2000) установил, что Т-лимфоциты вновь возвращаются к указанным макрофагам и располагаются в тесном контакте с ними [8]. Интердигетирующие макрофаги, по-видимому, влияют на дифференцировку Т-лимфоцитов.

Данное исследование показывает, что применение антител к белку Iba-1 позволяет маркировать фагоцитирующие клетки не только в органах центральной нервной системы, но и в селезенке.

*Экспериментальные исследования поддержаны научными грантами Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере «Исследование морфофункциональных изменений биоаминсодержащих структур селезенки при водном воздействии кальция» (государственный контракт № 6975р/9584 от 04.09.2009); «Разработка оптимального состава хлеба, обогащенного кальцием, и исследование влияния продукта на показатели состояния здоровья обследуемых групп населения» (государственный контракт № 11306р/20545 от 14.01.2013).*

#### Список литературы

1. Воронкова О.В., Дьячкова И.М., Сергеева В.Е. Иммунологическая роль кальция в выявлении МНС II класса макрофагов селезенки и тимуса // Международный журнал экспериментального образования: материалы V Общероссийской научной конференции «Современные проблемы науки и образования». – 2010. – № 3. – С. 30–31.
2. Дьячкова И.М. Изучение каспаз-9 позитивных клеток в тимусе лабораторных крыс при поступлении в организм хлорида кальция и метасиликата натрия с питьевой водой / И.М. Дьячкова, А.Т. Смородченко // Морфология в теории и практике: сб. материалов и тезисов (к 90-летию со дня рождения Д.С. Гордон). – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2012. – С. 185–186.
3. Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Коржевский Д.Э. Оригинальные исследования кальций-связывающего белка Iba-1/AIF-1 в клетках головного мозга крысы // Морфология. – 2010. – Т. 137. – № 2. – С. 5–8.
4. Кудрин А.В., Громова О.А. Микроэлементы в иммунологии и онкологии. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 544 с.

5. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. – СПб.: Наука, 2008. – 273 с.
6. Платонова А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, логика, компьютерные методы. – М.: Изд-во РАМН, 2000. – 52 с.
7. Kohler C. Allograft inflammatory factor-1/ionized calcium-binding adapter molecule-1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis // Cell Tissue Res. – 2007. – Vol. 33, № 2. – P. 291–302.
8. McCuskey L. Morphology and distribution lymphocytes in the normal murine spleen // Cell and Exp. – 2000. – Vol. 57, № 3. – P. 532–542.
9. Platten M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas // Ann. Neurol. – 2003. – P. 54–92.
10. Smorodchenko A. CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology // Eur. J Neurosci. – 2007. – Vol. 26, № 6. – P. 1387–1398.
11. Wen L. Association of B-cells with follicular dendritic cells in spleen // J. Immunol. – 2005. – Vol. 174. – P. 6918–6926.

#### References

1. Voronkova O.V., D'yachkova I.M., Sergeeva V.E. Immunologicheskaya rol' kal'ciya v vyavlenii MNS II klassa makrofagov selezenki i timusa // Mezhdunarodnyj zhurnal e'ksperimental'nogo obrazovaniya: Materialy V Obshherossijskoj nauchnoj konferencii «Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya». no. 3. 2010. pp. 30–31.
2. D'yachkova I.M. Izuchenie kaspaz-9 pozitivnykh kletok v timuse laboratornykh kryis pri postuplenii v organizm xlorida kal'ciya i metasilikata natriya s pit'evoy vodoj / I.M. D'yachkova, A.T. Smorodchenko // Morfologiya v teorii i praktike: sb. materialov i tezisov (k 90-letiyu so dnya rozhdeniya D. S. Gordon). Cheboksary: Izd-vo Chuvash. un-ta, 2012. pp. 185–186.
3. Kirik O.V., Suxorukova E.G., Korzhevskij D.E'. Original'nye issledovaniya kal'cij-svyazyvayushhego belka Iba-1/AIF-1 v kletkax golovnogogo mozga krysy // Morfologiya. 2010. T. 137. no. 2. pp. 5–8.
4. Kudrin A.V., Gromova O.A. Mikro'e'lementy v immunologii i onkologii. M.: GE'OTAR Media, 2007. 544 p.
5. Oberlis D., Xarland B., Skal'nyj A. Biologicheskaya rol' makro- i mikro'e'lementov u cheloveka i zhivotnyx. SPb.: Nauka, 2008. 273 p.
6. Platonova A.E. Statisticheskij analiz v medicine i biologii: zadachi, logika, komp'yuternye metody. M.: Izdatel'stvo RAMN, 2000. 52 p.
7. Kohler C. Allograft inflammatory factor-1/ionized calcium-binding adapter molecule-1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis // Cell Tissue Res. 2007, Vol. 33, no. 2, pp. 291–302.
8. McCuskey L. Morphology and distribution lymphocytes in the normal murine spleen // Cell and Exp. 2000, Vol. 57, no. 3, pp. 532–542.
9. Platten M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas // Ann. Neurol. 2003, pp. 54–92.
10. Smorodchenko A. CNS-irrelevant T-cells enter the brain, cause blood-brain barrier disruption but no glial pathology // Eur. J Neurosci. 2007, Vol. 26, no. 6, pp. 1387–1398.
11. Wen L. Association of B-cells with follicular dendritic cells in spleen // J. Immunol. 2005, Vol. 174, pp. 6918–6926.

#### Рецензенты:

Воронов Л.Н., д.б.н., профессор кафедры биологии и основ медицинских знаний, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный педагогический университет им. И.Я. Яковлева», г. Чебоксары;

Кириллов Н.А., д.б.н., профессор кафедры биотехнологии и переработки сельскохозяйственной продукции, ФГБОУ ВПО «Чувашская государственная сельскохозяйственная академия», г. Чебоксары.

Работа поступила в редакцию 01.10.2014.