

**Т-КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ СЕЛЕЗЕНКИ У КРЫС ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ
«КОНФИДОРОМ ЭКСТРА»**

M.N. Gonokhova, V.I. Gerunov

**T-CELL COMPOSITION OF SPLEEN IN RATS UNDER ACUTE POISONING WITH
“EXTRA CONFIDOR”**

Гонохова М.Н. – канд. ветеринар. наук, доц. каф. анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, г. Омск.

E-mail: gonochova@mail.ru

Герунов В.И. – д-р ветеринар. наук, проф. каф. анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии Омского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, г. Омск.

E-mail: vi.gerunov@omgau.org

Gonokhova M.N. – Cand. Veterinary Sci., Assoc. Prof., Chair of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy, Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk.

E-mail: gonochova@mail.ru

Gerunov V.I. – Dr. Veterinary Sci., Prof., Chair of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy, Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk.

E-mail: vi.gerunov@omgau.org

Представлены результаты исследования Т-клеточного состава селезенки при экспериментальном остром отравлении крыс пестицидом из группы неоникотиноидов. Исследование проводили на базе кафедры анатомии, гистологии, физиологии и патологической анатомии Омского ГАУ. Острую интоксикацию воспроизводили путем однократного введения животным опытной группы ($n = 10$) через зонд в желудок «Конфидора Экстра» в дозе 53,6 мг/кг (имдаклоприд, 1/10 ЛД₅₀). Для определения качественного состава клеточных и неклеточных структур селезенки использовали как традиционные методы гистологических исследований, так и иммуногистохимическое типирование клеток с помощью моноклональных антител (Daco, США) для выявления общей популяции Т-лимфоцитов (CD3), идентификации Т-хелперов (CD4), Т-супрессоров и/или цитотоксических клеток (CD8). Визуально в баллах оценивали характер иммуногистохимических реакций с учетом интенсивности окраски и процента окрашенных клеток. Подсчеты проводили в 20–23 полях зрения среза при различных увеличениях. Через 7 сут после острого отравления крыс в селезенке наблюдали общую тенденцию к повышению

содержания иммунокомпетентных клеток. CD3+ лимфоциты преимущественно локализовались вокруг центральных артерий в виде периартериальных муфт, их количество превышало аналогичное распределение клеток в органе крыс контрольной группы. Установлено увеличение площади периартериальных лимфоидных влагалищ, являющихся Т-зоной белой пульпы органа, а также маргинальной зоны, где происходит контакт токсикантов с иммунокомпетентными клетками. Иммуногистохимическое типирование показало увеличение общей популяции Т-лимфоцитов. Повышение количества хелперных CD4+ Т-клеток свидетельствует об усилении аутоиммунных реакций в органе, усугубляющих токсическое действие неоникотиноидов на организм животных.

Ключевые слова: иммуногистохимия, селезенка, пестициды, имдаклоприд, «Конфидор Экстра», Т-лимфоциты, моноклональные антитела.

The results of the study of the spleen T-cell composition in experimental acute poisoning of rats by the pesticide from the group of neonicotinoids were presented. The studies were carried out at the

Department of Anatomy, Histology, Physiology and Pathological Anatomy of Omsk State Agrarian University. Acute intoxication was performed in animals of experimental group (n = 10) gastrically by means of single administration of a Confidor probe at a dose of 53.6 mg / kg (imidacloprid, 1/10 LD₅₀). To determine qualitative composition of cellular and non-cellular spleen structures, both traditional histological studies and immunohistochemical cell typing with monoclonal antibodies (Daco, USA) were used for revealing the total population of T-lymphocytes (CD3), identifying T-helper cells (CD4), T-suppressors and / or cytotoxic cells (CD8). The nature of immunohistochemical reactions was evaluated visually at points, taking into account staining intensity and the percentage of stained cells. The calculations were carried out in 20–23 slice view fields at different magnifications. In 7 days after acute poisoning of rats in the spleen, general tendency of the increase in the content of immunocompetent cells was observed. CD3 + lymphocytes were predominantly localized around the central arteries in the form of periarterial clutches, with their number exceeding the similar distribution of cells in the organ of rats of the control group. It has been established the increase in the area of periarterial lymphoid sheaths, which are the T-zone of white pulp of the organ, as well as marginal zone, where toxic substances come into contact with immunocompetent cells. Immunohistochemical typing showed the increase in the total population of T-lymphocytes. The increase in the number of CD4 + T-cells indicates the increase in autoimmune reactions in the body that aggravates toxic effect of neonicotinoids on animal organism.

Keywords: *immune histochemistry, spleen, pesticides, imidacloprid, "Extra Confidor", T-lymphocytes, monoclonal antibodies.*

Введение. Инсектициды класса неоникотиноидов появились в России относительно недавно, они были зарегистрированы в нашей стране в 1999 г. Снижение токсичности пестицидов для организма животных и человека – главная цель производства данной группы химикатов. Общим в химической структуре неоникотиноидов является наличие пиридинового кольца, имеющего в шестом положении один

атом хлора. Кольцо метиленовым мостиком связывается с конечной (терминальной) группой, которая и обуславливает действие препаратов. Неоникотиноиды ингибируют активность ацетилхолинэстеразы, являются агонистами никотиновых ацетилхолиновых рецепторов постсинаптической мембраны, пролонгируют открытие натриевых каналов. При этом у насекомых блокируется передача нервного импульса и наступает гибель в результате паралича [1].

Одним из представителей класса хлорникотинилов является имидаклоприд, который относится к системным инсектицидам контактно-кишечного действия [2, 3]. В России на основе имидаклоприда зарегистрирован препарат «Конфидор Экстра» в форме водно-диспергируемых гранул («Байер КропСайенс АГ», Германия), применяемый против вредителей зерновых и овощных культур («Конфидор Экстра»). Регламенты применения в сельском хозяйстве. (URL: http://www.pesticidy.ru/pesticide/konfidor_jekstra/regulations_of_using).

Не вызывает сомнений, что применение пестицидов значительно снижает потери урожая, а также способствует повышению продуктивности животных. Однако особенностью их действия является высокая биологическая активность при низких нормах расхода, что указывает на потенциальную опасность для нецелевых организмов. В связи с этим актуальной задачей токсикологии является комплексное изучение токсикодинамики пестицидов в организме теплокровных животных [1].

В настоящее время достаточно широко изучено влияние неоникотиноидов на органы детоксикации животных [3]. При этом в отечественной литературе отсутствуют данные о действии пестицидов этой группы на органы иммунной системы, обеспечивающие защиту организма от воздействия различных факторов, в том числе и токсикантов [4]. Крупным периферическим лимфоидным органом является селезенка. Она расположена по ходу кровеносных сосудов и выполняет депонирующую, кроветворную, иммунную, фильтрационную функции. В связи с этим ее можно использовать в качестве органа-индикатора, позволяющего оценить характер влияния токсиканта на иммунную систему в целом. Несмотря на то, что селезенка не

является жизненно важным органом, нарушение ее структуры может привести к дисбалансу работы всей иммунной системы [5]. Диагностически значимыми маркерами иммунодефицитов являются CD3, CD4 и CD8 Т-клетки, а динамика изменения абсолютного или относительного их количества может представлять ценность для контроля эффекта терапии и прогноза течения отравления [6]. Отсутствие данных о реакции селезенки на воздействие имидаклоприда и определило актуальность проведенного исследования.

Цель исследования: установить Т-клеточный состав селезенки при остром отравлении крыс «Конфидором Экстра».

Объекты и методы исследования. Объекты исследования – пестицидный препарат «Конфидор Экстра» (д.в. имидаклоприд, водно-диспергируемые гранулы), («Байер КропСайенс АГ», Германия), белые беспородные крысы, селезенка.

Эксперимент проведен на половозрелых беспородных белых крысах. Все животные содержались в стандартных условиях вивария с учетом рекомендаций, изложенных в Руководстве по содержанию и уходу за лабораторными животными [7]. Работа с крысами проводилась в соответствии с международными рекомендациями по использованию животных в биологических и медицинских исследованиях (1986).

Острую интоксикацию воспроизводили путем однократного введения животным опытной группы (n=10) через зонд в желудок «Конфидора Экстра» в дозе 53,6 мг/кг (имидаклоприд, 1/10 ЛД50). Интактным крысам (n=10) в том же объеме внутрижелудочно вводили воду очищенную. В течение 7 сут после введения пестицида оценивали клинический статус животных. В дальнейшем, после предварительной седации препаратом «Золетил», по истечении указанного периода проводили эвтаназию животных. Для гистологического и иммуногистохимического исследований брали кусочки селезенки, фиксировали в 4 % нейтральном растворе формальдегида на фосфатном буфере фирмы ООО «Биовитрум» (Санкт-Петербург). Материал заливали в парафин по общепринятой методике (Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996; Семченко

В.В. и др., 2006). На ротационном микротоме LaboCut 4055 (фирма Slee, Германия) с помощью одноразовых микротомных лезвий A35 (фирма Feather, Япония) готовили фронтальные срезы селезенки толщиной 4–5 мкм. Срезы размещали на стандартных по толщине предметных стеклах фирмы Menzel-Glaster (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином для оценки общей морфологической картины. После окраски срезы заключали в БиоМаунт-среду и покрывали стандартными покровными стеклами. Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Альтами БИО 1» с использованием цифровой окулярной USB камеры USMOSO3100KPA.

При проведении иммуногистохимического типирования Т-клеток селезенки использовали моноклональные антитела (Daco, США) для выявления общей популяции Т-лимфоцитов (CD3), идентификации Т-хелперов (CD4), Т-супрессоров и/или цитотоксических клеток (CD8). Визуализацию результатов проводили с использованием системы детекции Ultra Vision ONE Detection System HRP Polymer. Инкубировали с хромогеном – DAV Plus Substrate System. Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в БиоМаунт-среду. Для оценки качества реакции использовали стекла с позитивным контролем для каждого из антигенов (фирма Labvision, США). Положительным результатом иммуногистохимической реакции являлось специфическое окрашивание цитоплазмы клеток при выявлении антигена CD3, плазматической мембраны при выявлении антигенов – CD4, CD8.

Визуально в баллах оценивали характер иммуногистохимических реакций с учетом интенсивности окраски и процента окрашенных клеток. Подсчеты проводили в 20–23 полях зрения среза при различных увеличениях (Mitselou A. et al., 2003).

Результаты исследования. При гистологической оценке препаратов селезенки крыс опытной группы отмечали следующую картину. От соединительнотканной капсулы органа отходили проникающие в пульпу трабекулы. В паренхиме органа четко определялись два компартмента: белая и красная пульпа, имеющие разное строение. Белая пульпа представляла

собой скопление Т- и В-лимфоцитов, локализованных вокруг центральных артерий. Было установлено резкое увеличение площади периартериальных лимфоидных влагалищ (П), которые, как известно, являются зоной расположения Т-лимфоцитов вокруг центральных артериол, здесь же присутствовали макрофаги и интердигитирующие дендритные клетки. По периферии к П плотно прилегали лимфоидные узелки, служащие местом скоплением В-клеток и находящиеся в сети фолликулярных дендритных клеток.

Наряду с этим замечено расширение и маргинальной зоны (МЗ), локализованной на грани-

це белой и красной пульпы. Эта область усиленного кровоснабжения, в которой происходит поглощение из периферической крови антигенов (токсинов) вследствие взаимодействия макрофагов и В-клеток, а также сортировка поступающих из крови лимфоцитов в Т и В зоны, задержка и фагоцитоз поврежденных эритроцитов, депонирование тромбоцитов (рис. 1). Красная пульпа состояла из синусоидных сосудов и расположенных между ними пульпарных тяжей, представленных ретикулярной тканью и содержащих скопления эритроцитов, лейкоцитов, макрофагов.

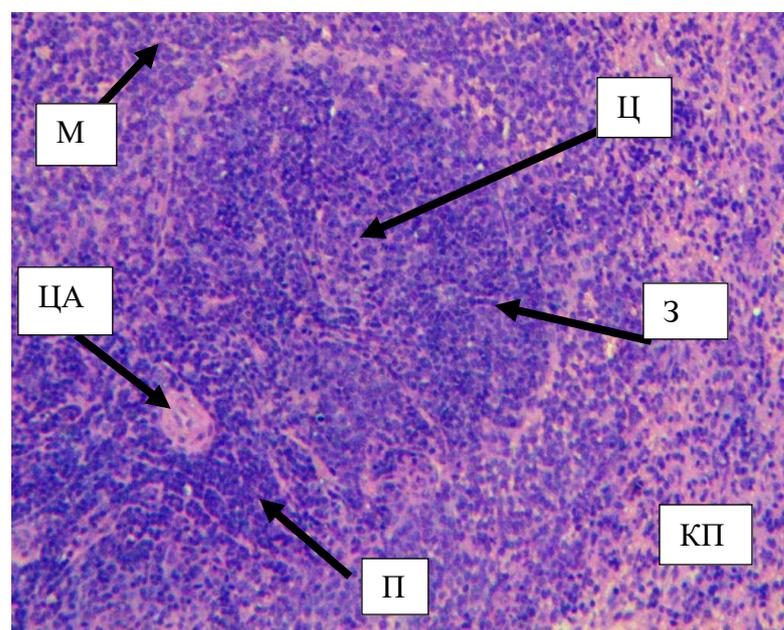


Рис. 1. Структурные составляющие белой пульпы селезенки крыс опытной группы: периартериальные лимфоидные влагалища (П), локализованные вокруг центральной артерии (ЦА). Реактивный центр (Ц), зона мантлии (ЗМ), маргинальная зона (МЗ) и красная пульпа (КП). Гематоксилин и эозин, ув. $\times 300$

При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено, что после острого отравления животных «Конфидором Экстра» через 7 сут резко увеличилось количество общей популяции (CD3+) Т-лимфоцитов. Интенсивно окрашенные клетки располагались вокруг центральной артерии, формируя вокруг нее периартериальные муфты, окружая сосуд в виде кольца, а также выявлялись в маргинальной зоне и красной пульпе. Их количество превышало распределение клеток в органе крыс контрольной

группы (рис. 2). По процентному содержанию отмечено увеличение популяции Т-лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует об усилении процессов активации Т-клеточного звена иммунитета.

Увеличение количества CD3+ экспрессирующих клеток сопровождалось повышением числа CD4+ Т-хелперных лимфоцитов в селезенке крыс, подвергшихся острой интоксикации, по сравнению с контрольными животными. Дан-

ные клетки локализовались преимущественно по периферии периартериальных лимфоидных фолликулов, а также в красной пульпе, где были сосредоточены вокруг синусоидных сосудов (рис. 3). Единичные CD4+ клетки располагались в области реактивных центров белой пульпы.

Регуляторные CD4+ Т-лимфоциты отвечают за аутоиммунные реакции, активация данной субпопуляции под воздействием имидаклоприда приводит к выделению ими цитотоксинов, способных усугублять токсическое действие неоникотиноидов на организм животных.

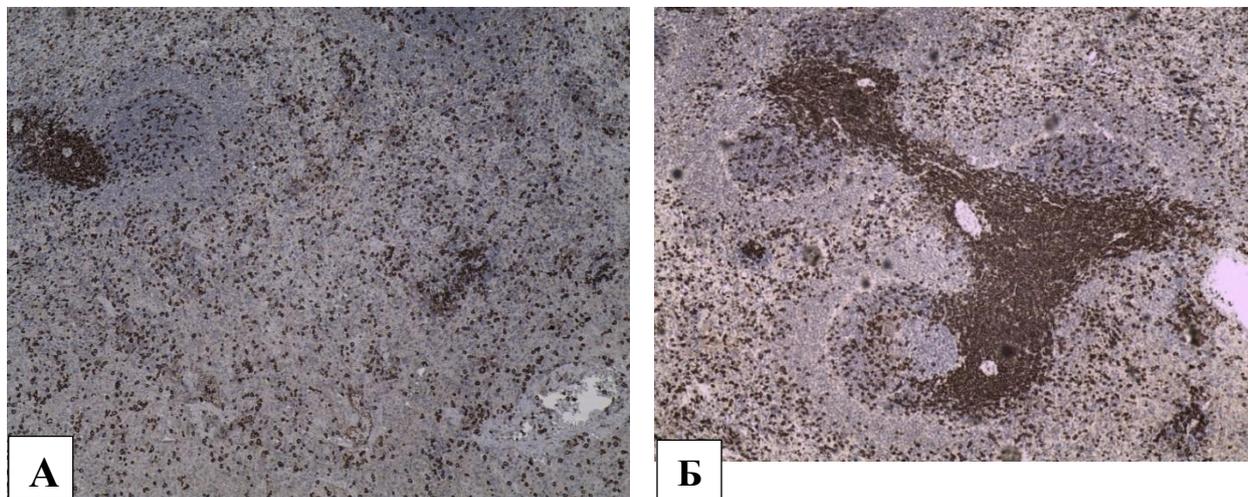


Рис. 2. Распределение CD3+ лимфоцитов в селезенке крыс контрольной и опытной групп: А – распределение CD3+ лимфоцитов в селезенке крыс контрольной группы (ув. × 200); Б – увеличение количества CD3+ лимфоцитов вокруг центральной артерии, в маргинальной зоне и красной пульпе селезенки крыс опытной группы (ув. × 200)

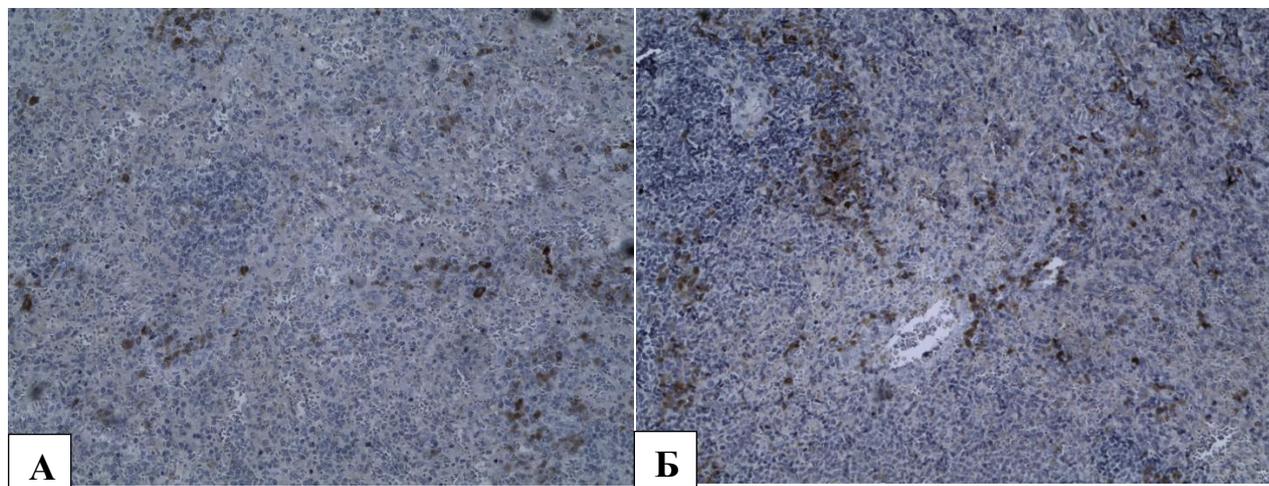


Рис. 3. Распределение CD4+ лимфоцитов в селезенке крыс контрольной и опытной групп: А – распределение CD4+ лимфоцитов в селезенке крыс контрольной группы (ув. × 200); Б – увеличение количества CD4+ лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы (ув. × 200)

Клетки, экспрессирующие CD8+, преимущественно локализовались в красной пульпе селезенки у животных опытной группы (рис. 4). Наряду с этим не было установлено изменений

количества Т-супрессоров у крыс, подвергшихся острой интоксикации, по сравнению с животными группы контроля.

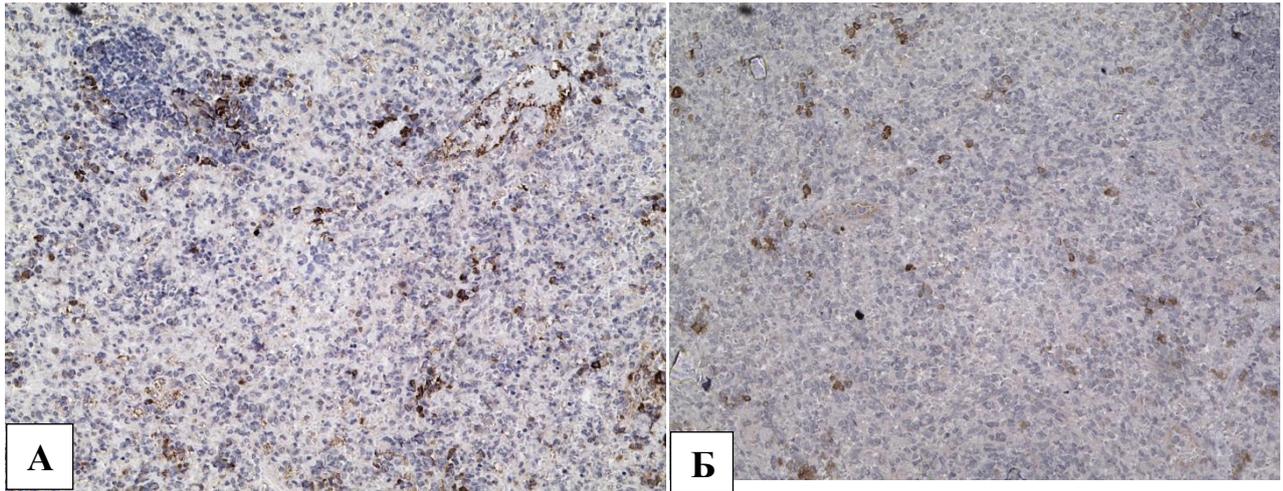


Рис. 4. Распределение CD8+ лимфоцитов в селезенке крыс контрольной и опытной групп: А – распределение CD8+ лимфоцитов в селезенке крыс контрольной группы (ув. × 200); Б – распределение CD8+ лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы (ув. × 200)

Выводы. При экспериментальном остром отравлении животных неоникотиноидным препаратом «Конфидор Экстра» в дозе 53,6 мг/кг через 7 суток в селезенке наблюдается увеличение площади периартериальных лимфоидных влагалищ, являющихся Т-зоной белой пульпы органа, а также маргинальной зоны, где происходит контакт токсикантов с иммунокомпетентными клетками. Иммуногистохимическое типирование показало увеличение общей популяции Т-лимфоцитов. Повышение количества хелперных CD4+ Т-клеток свидетельствует об усилении аутоиммунных реакций в органе, усугубляющих токсическое действие неоникотиноидов на организм животных.

Литература

1. Шабунин С.В., Беляев В.И., Бузлама С.В. Экоотоксиканты, распространение, профилактика и лечение // Ветеринария. – 2014. – № 75. – С. 3–8.
2. Патоморфологические исследования при отравлении овец пестицидом из группы неоникотиноидов на фоне применения лечебных средств / В.И. Егоров, К.Ф. Халикова, Г.Р. Ямалова [и др.] // Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики: мат-лы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию Краснодар. науч.-исслед. ветеринар. ин-та. – Краснодар, 2016. – С. 30–33.
3. Бойко Т.В., Герунов Т.В., Гонохова М.Н. Диагностика отравлений животных неоникотиноидами и синтетическими пиретроидами // Вестн. Омского ГАУ. – 2013. – № 1 (9). – С. 63–65.
4. Макашиш Т.П. Морфофункциональные особенности селезенки при воздействии на организм факторов различного генеза // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16, № 1 (61). – Ч. 1. – С. 265–269.
5. Волков В.П. Функциональная иммуноморфология селезенки в возрастном аспекте // Инновации в науке: сб. ст. по мат-лам XLVI Междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: Изд-во СибАК, 2015. – № 6(43). – С. 121–124.
6. Гонохова М.Н., Бойко Т.В., Ельцова А.А. Сравнительная цитоморфологическая характеристика селезенки крыс при воздействии пестицидов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – URL: www.science-education.ru/113-11074 (дата обращения: 10.12.2013).
7. Красильщикова М.С., Белозерцева И.В. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными [Электронный ресурс]. – URL: <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads.pdf>.

Literatura

1. *Shabunin S.V., Beljaev V.I., Buzlama S.V.* Jekotoksikanty, rasprostranenie, profilaktika i lechenie // *Veterinarija*. – 2014. – № 75. – S. 3–8.
2. Patomorfologicheskie issledovanija pri otravlenii ovec pesticidom iz gruppy neonikotinoidov na fone primeneniya lechebnyh sredstv / *V.I. Egorov, K.F. Halikova, G.R. Jamalova* [i dr.] // Aktual'nye problemy sovremennoj veterinarnoj nauki i praktiki: matly mezhdunar. nauch.-prakt. konf., posvjashh. 70-letiju Krasnodar. nauch.-issled. veterinar. in-ta. – Krasnodar, 2016. – S. 30–33.
3. *Bojko T.V., Gerunov T.V., Gonohova M.N.* Diagnostika otravlenij zhivotnyh neonikotinoidami i sinteticheskimi piretroidami // *Vestn. Omskogo GAU*. – 2013. – № 1 (9). – S. 63–65.
4. *Makalish T.P.* Morfofunkcional'nye osobennosti selezenki pri vozdeystvii na organizm faktorov razlichnogo geneza // *Tavricheskij mediko-biologicheskij vestnik*. – 2013. – T. 16, № 1 (61). – Ch. 1. – S. 265–269.
5. *Volkov V.P.* Funkcional'naja immunomorfologija selezenki v vozrastnom aspekte // *Innovacii v nauke: sb. st. po matlam XLVI Mezhdunar. nauch.-prakt. konf.* – Novosibirsk: Izd-vo SibAK, 2015. – № 6(43). – S. 121–124.
6. *Gonohova M.N., Bojko T.V., El'cova A.A.* Sravnitel'naja citomorfologicheskaja karakteristika selezenki krysa pri vozdeystvii pesticidov // *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. – 2013. – № 6. – URL: www.science-education.ru/113-11074 (data obrashhenija: 10.12.2013).
7. *Krasil'shhikova M.S., Belozerceva I.V.* Rukovodstvo po sodержaniju i uhodu za laboratornymi zhivotnymi [Elektronnyj resurs]. – URL: <http://ruslasa.ru/wp-content/uploads.pdf>.

