

*И.В. Майбородин, Е.И. Стрельцова, Д.В. Егоров, О.А. Зарубенков, А.И. Шевела,
С.В. Сидоров и Т.М. Родишева*

СТРОЕНИЕ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫС ПРИ ГНОЙНОМ ВОСПАЛЕНИИ В РЕГИОНЕ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А.И. Шевела) Научно-исследовательского института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск; e-mail: imai@mail.ru

Методами световой микроскопии исследовали строение регионарных к гнойной ране лимфатических узлов крыс в условиях лечения интерлейкином-2 (ИЛ-2). Было обнаружено, что в лимфатических узлах контрольных животных после введения ИЛ-2 уменьшается площадь коркового плато при одновременном расширении паракортикальной зоны. У крыс с нелеченной гнойной раной в регионарных лимфатических узлах уменьшаются относительные размеры коркового плато за счет расширения структур мозгового вещества. В лимфоидной ткани и синусах лимфатических узлов присутствуют эритроциты, увеличивается число иммуно- и плазмобластов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов. Применение ИЛ-2 на фоне гнойной воспалительной реакции способствует большей сохранности структуры данных органов и цитоархитектоники их различных зон. Однако введение данного цитокина приводит к повышению сосудистой проницаемости и увеличивает возможность развития аллергических реакций, что требует разработки и применения мер профилактики указанных побочных эффектов и осложнений.

Ключевые слова: лимфатический узел, воспаление, эозинофильные гранулоциты, интерлейкин-2.

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) может активировать В-клетки, при этом индуцируется как их пролиферация, так и дифференцировка в иммуноглобулин-синтезирующие клетки, происходит стимуляция секреции антител [7, 18, 20]. Размножение Т-клеток также регулируется ИЛ-2. Вследствие индукции ИЛ-2-рецепторов иммунологически нормальные клетки пролиферируют, это продолжается до снижения уровня ИЛ-2 [9, 13, 14]. Активация рецепторов ИЛ-2 играет центральную роль в стимуляции не только Т- и В-лимфоцитов, но и макрофагов [11].

Однако, несмотря на большой объем опубликованных данных, посвященных изучению действия ИЛ-2 на те или иные группы клеток, в литературе полностью отсутствуют результаты исследований лимфатических узлов после введения данного цитокина на фоне активного септического воспалительного процесса в регионе лимфосбора.

В этой связи целью данного исследования явилось изучение изменений структуры паховых лимфатических узлов, регионарных к гнойной ране на правом бедре, у крыс в условиях применения препарата ИЛ-2.

Материал и методы. Моделирование гнойной раны производили инъекцией 1 мл 10% раствора CaCl_2 под кожу наружной поверхности правого бедра крысам-самцам линии Вистар массой 250–300 г. Препарат человеческого рекомбинантного ИЛ-2 «Ронколейкин» (ООО Биотех, Россия) вводили по 10^4 ЕД на животное (подкожно в область спины по средней линии в проекции нижней части грудного отдела позвоночника) непосредственно после введения хлорида кальция и повторно спустя 1 нед (экспериментальная группа). Группами сравнения (контроля) являлись: 1) интактные

животные без каких-либо манипуляций; 2) крысы с гнойной раной без лечения и 3) животные после введения ИЛ-2 в той же дозе и в те же сроки, что и экспериментальным крысам. В каждой группе было 12 особей, всего использовано 48 животных. Все крысы были получены из вивария НИИ цитологии и генетики СО РАН. Экспериментальные работы и содержание животных осуществляли на базе вивария НИИ химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Контрольных животных выводили из эксперимента вместе с подопытными через 1 нед после последней инъекции ИЛ-2. Все манипуляции с животными осуществляли под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Правые (регионарные) паховые лимфатические узлы фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 ч, обезживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином — эозином и по Романовскому, изучали в световом микроскопе Triton (Seti, Бельгия) при увеличении до 1200 раз.

Для определения структурной организации лимфатических узлов применяли открытую квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. Для изучения соотношения коркового плато, паракортикальной зоны, лимфоидных узелков без герминативных центров и с таковыми, мозговых тяжей и мозговых синусов использовали объектив с увеличением 4, конечная площадь тестового квадрата была равна 3600 мкм^2 (сторона квадрата 60 мкм), при подсчете количества лимфоцитов, иммуно- и плазмобластов, нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов, макрофагов и делящихся клеток применяли объектив с увеличением $40 \times 36 \text{ мкм}^2$ (сторона квадрата 6 мкм). Полученные результаты численности клеток пересчитаны и представлены на площади 10^3 мкм^2 . Приняв общее количество клеток за 100%, определяли долю клеток каждого типа [2]. Различия между средними считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. При изучении соотношения структурных элементов лимфатических узлов контрольных животных после введения ИЛ-2 по сравнению с интактным контролем было найдено уменьшение относительной площади коркового плато, занимаемой на срезе, на 69,7% (до $14,2 \pm 1,7\%$) при одновременном возрастании площади паракортикальной зоны на 90,7% (до $37 \pm 4\%$) (рисунок, а, б).

У животных с нелеченной гнойной раной относительно интактного контроля в регионарных лимфатических узлах уменьшилась доля площади, занимаемой корковым плато, на 77,2% ($13,6 \pm 1,6\%$), но возросла площадь, занимаемая лимфоидными узелками с герминативными центрами, на 35,9% ($9,2 \pm 0,8\%$). Кроме того, при воспалении увеличилась площадь мозговых тяжей на 42,5%, она составила $30,2 \pm 2,6\%$.

При сравнении результатов изучения лимфатических узлов у животных с нелеченной гнойной раной и раной на фоне лечения ИЛ-2 были отмечены различия только в величине площади мозговых тяжей. У леченных крыс она равнялась $23,8 \pm 1,3\%$ и была на 26,9% меньше таковой у крыс с нелеченной гнойной раной (соответствовала уровню интактного контроля).

У животных после лечения раны ИЛ-2 относительно контрольных после инъекций этого цитокина площадь паракортикальной зоны была такой же, как и в группе интактного контроля (см. рис. 1, б, в), наряду с расширением площади мозговых тяжей на срезе лимфатического узла на 33,7%.

В корковом плато животных из интактного контроля и контрольных после введения ИЛ-2 значимо различались только доля и абсолютное число иммуно- и плазмобластов ($3,6 \pm 0,5\%$ и $0,34 \pm 0,06$ клеток на 10^3 мкм² площади среза зоны соответственно у интактных животных, после введения препарата этих клеток стало больше в 2,1 и 2,4 раза).

В группе животных с нелеченной гнойной раной относительно интактного контроля появились эритроциты, возросли доля и абсолютное число макрофагов ($6,5 \pm 1,1\%$ и $0,46 \pm 0,07$ клеток на единице площади среза соответственно) в 3,9 и 3,2 раза; нейтрофильных гранулоцитов ($2,7 \pm 0,7\%$ и $0,19 \pm 0,04$ соответственно) — в 10,7 и 8,3 раза; при одновременном снижении доли и численной плотности лимфоцитов ($62 \pm 3\%$ и $4,4 \pm 0,3$ лимфоцитов также соответственно) на 32,2 и 59,6%.

В качестве различий между группами животных с нелеченной гнойной раной и после лечения раны ИЛ-2 выявлена большая численная плотность лимфоцитов (на 26%) на фоне введения препарата.

У леченных ИЛ-2 животных относительно контрольных после инъекций этого же препарата в корковом плато было отмечено появление эрит-

роцитов, увеличение доли и абсолютного числа макрофагов ($6,8 \pm 1,2\%$ и $0,60 \pm 0,13$ макрофагов соответственно) в 4,6 и 4,3 раза, при одновременном снижении доли и численной плотности лимфоцитов ($63,1 \pm 2,3\%$ и $5,6 \pm 0,4$ клеток также соответственно) на 25,7 и 32,3%.

В паракортикальной зоне лимфатических узлов животных интактного контроля и контрольных после введения ИЛ-2 выявлена только значительная эозинофилия у последних, численная плотность эозинофильных гранулоцитов была выше в 4,1 раза и составила $0,27 \pm 0,07$ клеток на 10^3 мкм².

В группе нелеченных животных по сравнению с интактным контролем возросла доля делящихся клеток в 2,2 раза (до $2,7 \pm 0,5\%$), доля и абсолютное число моноцитов — в 2,6 раза (до $3,4 \pm 0,7\%$ и $0,24 \pm 0,04$ клеток соответственно), при одновременном снижении доли и численной плотности лимфоцитов на 28,2 и 47,8% (до $60 \pm 3\%$ и $4,2 \pm 0,6$ лимфоцитов также соответственно).

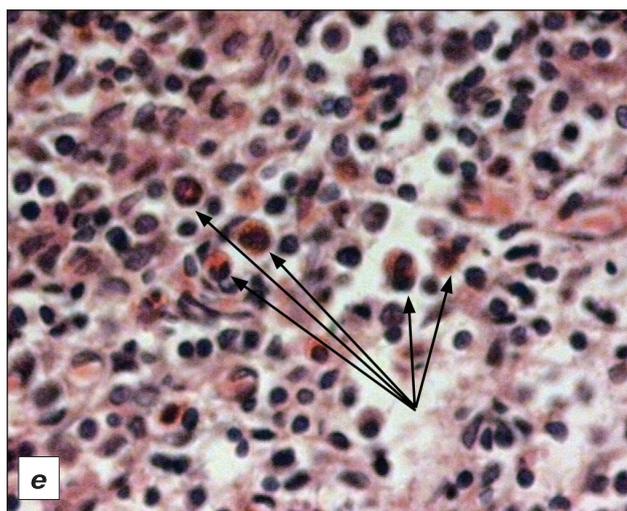
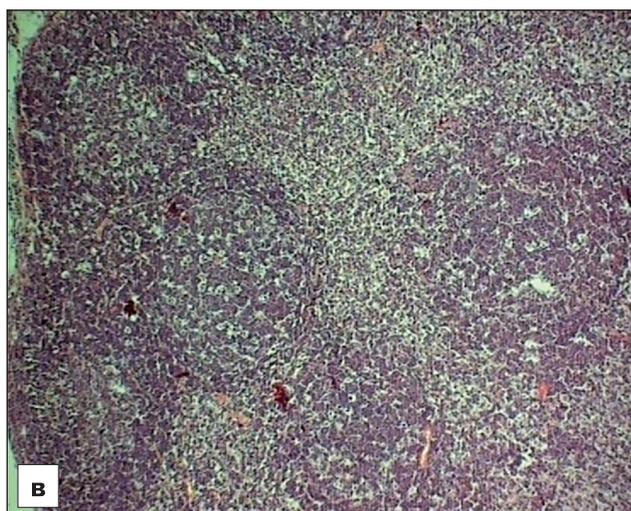
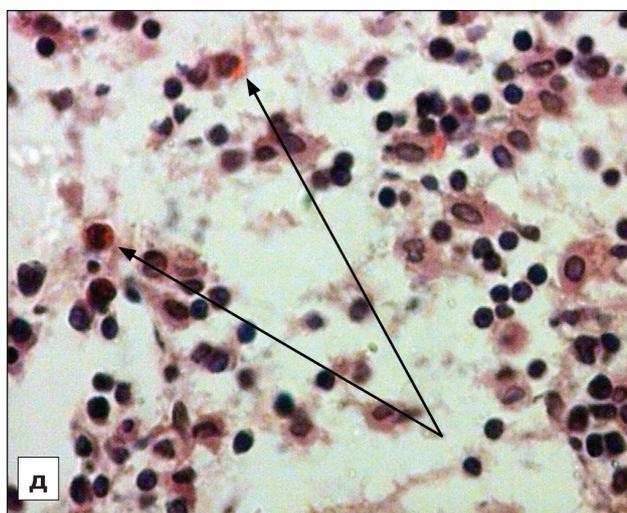
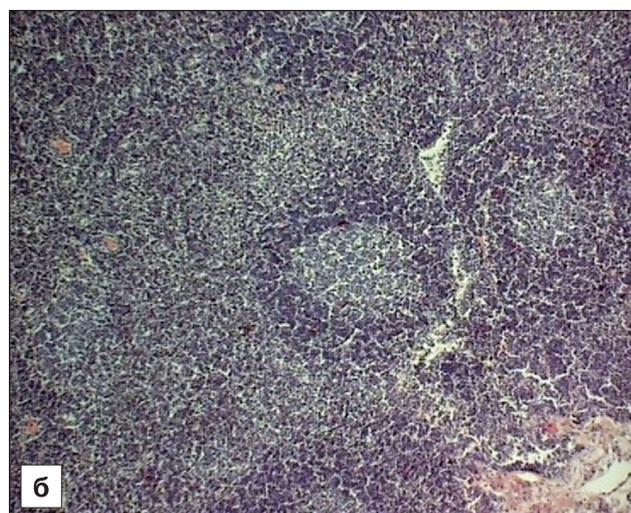
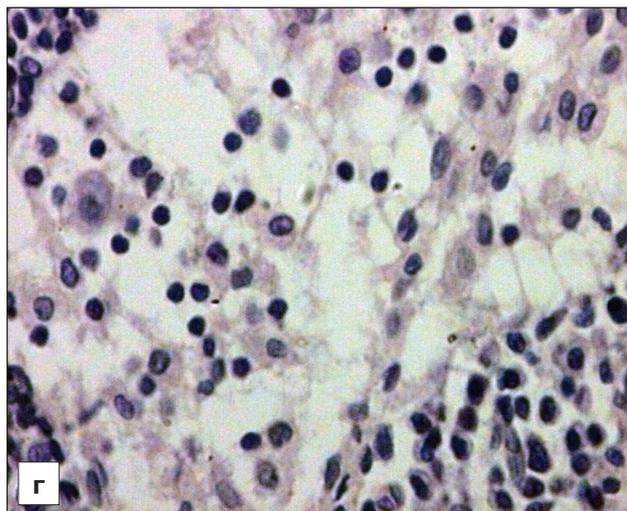
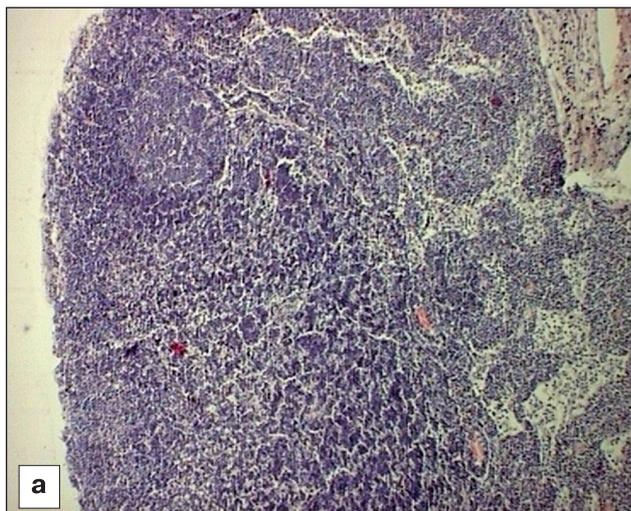
У леченных ИЛ-2 животных относительно контрольных после инъекций этого же препарата в паракортикальной зоне было найдено только уменьшение доли и абсолютного количества лимфоцитов на 23 и 39,7% (до $61 \pm 3\%$ и $4,9 \pm 0,7$ клеток на единице площади среза соответственно). Выявлено также довольно значительное число эозинофильных гранулоцитов в обеих группах.

В герминативных центрах лимфоидных узлов значимые изменения не были обнаружены при сравнении результатов между группами животных как из интактного контроля и контрольных после введения ИЛ-2, так и с нелеченной гнойной раной на бедре и после лечения данной раны этим цитокином.

По сравнению с интактным контролем в группе животных с нелеченной гнойной раной возросла доля иммуно- и плазмобластов на 36,4% (до $57,3 \pm 3,8\%$) при одновременном снижении доли лимфоцитов на 78,5% (до $25 \pm 4\%$).

У леченных ИЛ-2 животных относительно контрольных после инъекций этого же препарата в герминативных центрах отмечено возрастание доли макрофагов в 2,7 раза (до $5,0 \pm 0,7\%$) на фоне снижения доли лимфоцитов в 2,3 раза (до $18 \pm 5\%$).

В клеточном составе мозговых тяжей при сравнении полученных результатов между группами животных из интактного контроля и контрольных после введения ИЛ-2 значимые различия найдены не были. Не были обнаружены различия и при сравнении результатов между группами животных с нелеченной гнойной раной и после ее лечения ИЛ-2. Однако можно отметить резкое возрастание митотической активности клеток в мозговых тяжях лимфатических узлов крыс из последней группы (с $0,04 \pm 0,04$ до $0,09 \pm 0,04$ фигур митозов на единице площади среза).



Структурные компоненты коркового (а–в) и мозгового (г–е) вещества правых паховых лимфатических узлов крыс: intactных (а, г), контрольных после введения ИЛ-2 (б, д) и после лечения гнойной раны ИЛ-2 (в, е).

Возрастание площади, занимаемой на срезе паракортикальной зоной (б, в), увеличение размеров и числа лимфоидных узелков (в), эозинофильные гранулоциты (стрелки) в мозговом веществе (д, е). Ув.: а–в — 50; г–е — 500.

В группе нелеченых животных относительно интактного контроля появились эритроциты, возросли доля и абсолютное число иммуно- и плазмобластов на 60 и 89,7% (до $6,7 \pm 0,9\%$ и $0,49 \pm 0,09$ бластов соответственно), доля макрофагов — на 54,3% (до $7,3 \pm 0,9\%$).

У леченных ИЛ-2 животных относительно контрольных после инъекций этого же препарата в мозговых тяжах увеличилась доля макрофагов на 53,4% (до $7,7 \pm 1,1\%$) и иммуно- и плазмобластов — на 68,8% (до $6,7 \pm 1,0\%$).

В просвете мозговых синусов значимые различия не были найдены при сравнении полученных результатов между группами животных из интактного контроля и контрольных после введения ИЛ-2 и между крысами с нелеченной гнойной раной и с раной после инъекций данного препарата. Однако обращает на себя внимание резкое, хотя и незначимое, увеличение численности эозинофильных гранулоцитов после применения ИЛ-2 (с $0,011 \pm 0,009$ клеток у интактных животных до $0,05 \pm 0,03$ клеток на 10^3 мкм² площади среза просвета синусов после введения препарата) (см. рисунок, г — е), что произошло из-за значительного возрастания содержания данных лейкоцитов только у некоторых животных.

Доля лимфоцитов ($53 \pm 4\%$) и плазматических клеток ($3,8 \pm 0,7\%$) в просвете мозговых синусов у интактных животных была значимо больше на 25,5% и в 2,2 раза соответственно, чем у нелеченых животных с гнойной раной. У интактных крыс доля иммуно- и плазмобластов ($0,4 \pm 0,5\%$), моноцитов ($4,5 \pm 1,0\%$), макрофагов ($8,4 \pm 1,3\%$) и нейтрофильных гранулоцитов ($2,1 \pm 0,8\%$) была меньше в 5,4 раза, на 81,5, 58% и в 2,5 раза соответственно. Численная плотность бластов у интактных крыс ($0,007 \pm 0,009$ клеток) была ниже в 8,3 раза.

Доля моноцитов ($7,7 \pm 0,9\%$), макрофагов ($12,7 \pm 1,5\%$) и нейтрофильных гранулоцитов ($5,4 \pm 1,4\%$) у животных после лечения раны ИЛ-2 была выше на 88, 62,2% и в 3,1 раза соответственно по сравнению с таковыми у интактных крыс после инъекций данного препарата.

Обсуждение полученных данных. Обобщая полученные данные, можно отметить, что в лимфатических узлах контрольных животных после введения ИЛ-2 по сравнению с интактным контролем стала меньше площадь коркового плато при одновременном расширении паракортикальной зоны. В цитоархитектонике структурных зон не было найдено выраженных различий, за исключением высокого содержания эозинофильных гранулоцитов и эритроцитов в паракортикальной зоне и в содержимом мозговых синусов.

Изменения структуры лимфатических узлов интактных животных после введения ИЛ-2 полностью соответствуют данным о том, что приме-

нение данного цитокина приводит к расширению паракортикальной зоны [15] за счет стимуляции функциональной и митотической активности Т-лимфоцитов [1, 3, 8]. По-видимому, за счет того, что в результате возрастания площади паракортикальной зоны в лимфатических узлах сократилась доля площади коркового плато в составе лимфатического узла.

У животных с нелеченной гнойной раной относительно интактного контроля уменьшилась доля площади коркового плато, но увеличилась площадь структур мозгового вещества: и мозговых тяжей, и синусов, возросло количество лимфоидных узелков с герминативными центрами, при этом расширились и сами центры. В лимфоидной ткани и синусах узлов появились эритроциты, увеличилось содержание иммуно- и плазмобластов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов при одновременном снижении числа лимфоцитов.

Подобные изменения структуры лимфатических узлов при гнойном воспалении в регионе хорошо известны и достаточно полно описаны [6].

После введения ИЛ-2 выявлена менее выраженная реакция лимфатических узлов на воспалительный процесс в регионе (меньшее содержание моноцитов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов), чем у нелеченых крыс, что может быть связано с более быстрым завершением воспалительной реакции. Повышение иммунных показателей — пролиферации и цитолитической активности Т-лимфоцитов [1, 3, 8], деления и выработки иммуноглобулинов В-клетками [7, 18, 20], фагоцитоза у макрофагов [11] приводит к быстрому очищению раны, а значит к меньшему объему антигенных веществ, попавших в организм, и меньшей степени реакции клеток лимфоидной ткани.

Увеличение числа эозинофильных гранулоцитов в крови после применения ИЛ-2 отмечают и другие исследователи [12, 16, 17]. При введении низких доз ИЛ-2 (100 ЕД) вокруг опухоли и в область регионарных лимфатических узлов была найдена инфильтрация опухоли лимфоцитами и эозинофильными гранулоцитами [15]. L.T. Valemans и соавт. наблюдали инфильтрацию эозинофильными гранулоцитами стромы вокруг клеток экспериментальной опухоли после лечения препаратами ИЛ-2, которую авторы связывают с тумороцидным действием этих лейкоцитов [4].

Не исключено, что эозинофилия связана со стимуляцией иммунитета, гиперреактивностью иммунной системы и аллергизацией организма. В таком случае, видимо, применение препаратов ИЛ-2 необходимо проводить под прикрытием десенсибилизирующих средств.

Причиной появления эритроцитов в структурах исследуемых органов может являться повышение

проницаемости кровеносных капилляров под влиянием ИЛ-2 [19]. При этом усиливается связывание лимфоцитов с эндотелием [5], и даже возможны повреждение и лизис эндотелиоцитов [10].

Таким образом, можно заключить, что применение ИЛ-2 на фоне гнойной воспалительной реакции в эксперименте на крысах приводит к большей сохранности структуры регионарных лимфатических узлов и цитоархитектоники их различных зон по сравнению с нелечеными животными. Однако введение данного цитокина способствует повышению сосудистой проницаемости и увеличивает возможность развития аллергических реакций, что требует разработки и применения мер профилактики этих побочных эффектов и осложнений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Златник Е.Ю. и Голотина Л.Ю. Применение ронколейкина для ЛАК-терапии рака яичника. *Вопр. онкол.*, 2005, т. 51, № 6, с. 680–684.
2. Майбородин И.В., Колмакова И.А., Притчина И.А. и Чупина В.В. Изменения десны при сочетании артериальной гипертензии с периодонтитом. *Стоматология*, 2005, т. 84, № 6, с. 15–19.
3. Andre N.D., Barbosa D.S., Munhoz E. et al. Measurement of cytotoxic activity in experimental cancer. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2004, v. 18, № 1, p. 27–30.
4. Balemans L.T., Mattijssen V., Steerenberg P.A. et al. Locoregional therapy with polyethylene-glycol-modified interleukin-2 of an intradermally growing hepatocellular carcinoma in the guinea pig induces T-cell-mediated antitumor activity. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, v. 37, № 1, p. 7–14.
5. Bielawska-Pohl A., Crola C., Caignard A. et al. Human NK cells lyse organ-specific endothelial cells: analysis of adhesion and cytotoxic mechanisms. *J. Immunol.*, 2005, v. 174, № 9, p. 5573–5582.
6. Casley-Smith J.R. The lymphatic system in inflammation. In: *The inflammatory process*, 2nd ed., 1973, v. 2, p. 161–204.
7. Collins R.A. and Oldham G. Recombinant human interleukin 2 induces proliferation and immunoglobulin secretion by bovine B-cells: tissue differences and preferential enhancement of immunoglobulin A. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1993, v. 36, № 1, p. 31–43.
8. Dillman R.O. Lymphocyte therapy of renal cell carcinoma. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 2005, v. 5, № 6, p. 1041–1051.
9. D'Souza W.N. and Lefrancois L. IL-2 is not required for the initiation of CD8 T cell cycling but sustains expansion. *J. Immunol.*, 2003, v. 171, № 11, p. 5727–5735.
10. Duke S.S., King L.S., Jones M.R. et al. Human recombinant interleukin 2-activated sheep lymphocytes lyse sheep pulmonary microvascular endothelial cells. *Cell. Immunol.*, 1989, v. 122, № 1, p. 188–199.
11. Hancock W.W., Kobzik L., Colby A.J. et al. Detection of lymphokines and lymphokine receptors in pulmonary sarcoidosis. Immunohistologic evidence that inflammatory macrophages express IL-2 receptors. *Am. J. Pathol.*, 1986, v. 123, № 1, p. 1–8.
12. LeBel C.P., Langlois L., Bell D.P. et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and pharmacotoxic profiles of recombinant-methionyl human interleukin-2alanine-125. (r-metHuIL-2alanine-125.) following intravenous and subcutaneous administration in rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1995, v. 14, № 11, p. 909–915.
13. Maurer T. and Kimber I. Draining lymph node cell activation in guinea pigs: comparisons with the murine local lymph node assay. *Toxicology.*, 1991, v. 69, № 2, p. 209–218.
14. McCulloch P., Gallagher G., Walsh L.P. et al. Lymphokine-activated killer (LAK) cells modulate the effects of IL-2 on a T cell-mediated immune response. *Clin. Exp. Immunol.*, 1991, v. 85, № 3, p. 519–524.
15. Musiani P., Campora de E., Valitutti S. et al. Effect of low doses of interleukin-2 injected perilymphatically and peritumorally in patients with advanced primary head and neck squamous cell carcinoma. *J. Biol. Response Mod.*, 1989, v. 8, № 6, p. 571–578.
16. Nomura K. and Fujioka T. Study of adoptive immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma with lymphokine-activated killer (LAK) cells and interleukin-2. II. Clinical evaluation. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.*, 1993, v. 84, № 5, p. 831–840.
17. Pectasides D., Varthalitis J., Kostopoulou M. et al. An outpatient phase II study of subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha-2b in combination with intravenous vinblastine in metastatic renal cell cancer. *Oncology*, 1998, v. 55, № 1, p. 10–15.
18. Poudrier J. and Owens T. Th1 and Th2 help for B cells: differential capacity for induction of autonomous responsiveness to IL-2. *Int. Immunol.*, 1995, v. 7, № 6, p. 1021–1027.
19. Quan W. Jr., Ramirez M., Taylor C. et al. High-dose continuous infusion plus pulse interleukin-2 and famotidine in metastatic kidney cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2005, v. 20, № 1, p. 36–40.
20. Spieker-Polet H., Yam P.C., Arbieva Z. et al. In vitro induction of the expression of multiple IgA isotype genes in rabbit B cells by TGF-beta and IL-2. *J. Immunol.*, 1999, v. 162, № 9, p. 5380–5388.

Поступила в редакцию 14.02.08
Получена после доработки 27.07.08

THE STRUCTURE OF THE RAT LYMPH NODES DRAINING PURULENT INFLAMMATION REGION AFTER INTERLEUKIN-2 TREATMENT

I.V. Maiborodin, Ye.I. Strel'tsova, D.V. Yegorov, O.A. Zarubenkov, A.I. Shevela, S.V. Sidorov and Rodisheva T.M.

The structure of rat lymph nodes regional to the purulent wound under the conditions of interleukin (IL-2) treatment was investigated by the methods of light microscopy. In the lymph nodes from intact animals, the cortical plateau was found to become diminished with the simultaneous paracortical zone expansion. In the regional lymph nodes from rats with an untreated purulent wound, the relative dimensions of cortical plateau were decreased because of expansion of the medullary structures. Lymphoid parenchyma and the sinuses of lymph nodes contained erythrocytes, the numbers of immuno- and plasmoblasts, macrophages and neutrophilic granulocytes were increased. IL-2 treatment in animals with a purulent inflammatory reaction secured the greater integrity of structure of these organs and of cytoarchitecture of their various zones. However, the administration of this cytokine resulted in increased vascular permeability and enhanced the probability of allergic reaction development, which requires the development and application of prophylactic measures of the specified side effects and complications.

Key words: *lymph node, inflammation, eosinophilic granulocytes, interleukin-2.*

The Center of New Medical Technologies, Scientific Research Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS Siberian Branch, Novosibirsk.