

МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНЬЕВ ИММУННОГО ОТВЕТА СЕЛЕЗЕНКИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРКАЛЬЦИЕМИИ

Мельникова О.В., Сергеева В.Е.

MORPHOLOGICAL STUDY OF COMPONENTS OF CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN RAT SPLEEN WITH EXPERIMENTAL HYPERCALCEMIA

MELNIKOVA O.V. , SERGEEVA V.E.

Кафедра медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии (зав. кафедрой – профессор С.П. Сапожников) ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары.

Данное исследование посвящено комплексной морфологической оценке компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунитета селезенки лабораторных крыс в ответ на повышение уровня кальция в периферической крови. Цель исследования – изучение морфологических характеристик CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки лабораторных крыс при экспериментальной гиперкальциемии на фоне длительного употребления соединения кальция с питьевой водой. Доказано, что экспериментальная гиперкальциемия вызывает перераспределение компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа селезенки: повышением количества CD4+ клеток белой пульпы, CD8+ клеток красной пульпы на фоне сокращения количества CD20+ клеток во всех морфо-функциональных зонах, кроме герминативных центров. Выявленный морфологический комплекс изменений селезенки при гиперкальциемии свидетельствует о ее избирательном характере воздействия на различные звенья иммунного ответа. Происходит повышение активности Т-хелперных и Т-цитотоксических лимфоцитов с компенсаторным снижением показателей В-лимфоцитарного звена, что отражает проявление адаптации и ауторегуляции иммунного ответа.

Ключевые слова: CD4+, CD8+, CD20+, селезенка, гиперкальциемия, хлорид кальция

This research is devoted to a complex morphological assessment of components of cellular and humoral immunity rat spleen in response to the increase in calcium levels in the peripheral blood. The purpose of research – the study of the morphological characteristics of CD4-, CD8-, CD20-positive spleen cells of laboratory rats with experimental hypercalcemia on the background of long-term

use of calcium from drinking water connection. It is proved that the experimental hypercalcemia accompanied by a redistribution of components of cellular and humoral immune response of the spleen: an increase in CD4+ cell of white pulp, CD8+ cells of red pulp by a decline in the number of CD20+ cells in all morpho-functional areas, except for the germinal centers. The revealed morphological changes in the spleen complex hypercalcemia indicates its selective nature of the impact on different parts of the immune response. There is increased activity of T-helper and T-cytotoxic lymphocytes with a compensatory decrease in indicators B-lymphocyte level that reflects a manifestation of adaptation and autoregulation of the immune response.

Key words: CD4+, CD8+, CD20+, spleen, hypercalcemia, calcium chloride

Введение. Известно, что функцию адаптивного иммунитета, определяющую клеточный и гуморальный гомеостаз организма, осуществляют органы иммунной системы. Ее морфологическую основу составляет лимфоидная ткань, организованная в функциональные образования, самым крупным из которых является селезенка [1]. Исследование структурно-функциональных особенностей селезенки является актуальной проблемой, поскольку иммунный аппарат селезенки, по мнению многих исследователей, имеет более сложное строение, чем другие периферические органы иммунной системы [2]. Она отличается множественной зональностью и высокой специфичностью каждой зоны, определяющейся уникальным взаимодействием лимфоидных клеток и клеток стромы, создающих особое микроокружение каждой зоны селезенки и обеспечивающих формирование адекватного иммунного ответа [3].

Кальций является самым распространенным и эссенциальным макроэлементом в организме человека с ключевой ролью в поддержании нормальной жизнедеятельности всего организма, интеграции функций его систем, является кофактором активации многих ферментов, гормонов, витаминов и других биологически активных ве-

ществ [4]. Отмечена иммунологическая активность кальция, которая заслуживает внимание с позиций иммунофизиологии и морфологии [5]. Кальций принимает участие в активации иммунной системы, контролирует антителообразование, обладает антагонистическим действием на процессы клеточной пролиферации и дифференциации [4].

CD4 идентифицирован на мембранах Т-лимфоцитов с помощью моноклональных антител как маркер Т-хелперов. CD4 локализуется на поверхности кортикальных тимоцитов, части зрелых периферических Т-лимфоцитов (40–50% из них – Т-хелперы), моноцитов, макрофагов, эозинофилов, мегакариоцитов, дендритных клеток [6, 7]. Функция CD4 обусловлена, в первую очередь, способностью связываться с молекулами МНС класса II и участвовать в распознавании антигенных комплексов на поверхности антигенпрезентирующих клеток [7, 8].

CD8 идентифицирован как маркер субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, а также на части натуральных киллеров. На зрелых Т-клетках экспрессируется либо CD8, либо CD4, на незрелых иммунокомпетентных клетках они коэкспрессируются. Роль CD8 при распознавании антигена состоит в обеспечении клеточной адгезии, повышении сродства комплекса CD3-TcR-CD8 к антигену, ассоциированному с антигеном МНС класса I, и передаче сигнала в клетку [6, 7, 8].

CD20 экспрессирован у человека, мышей и крыс на В-лимфоцитах. Он встречается как на покоящихся, так и на активированных В-лимфоцитах, но отсутствует на плазматических клетках [6]. CD20 начинает синтезироваться на ранних стадиях дифференцировки В-клеток – в пре-В-клетках – до появления тяжёлых цепей иммуноглобулинов в цитоплазме. CD20 принимает участие в В-клеточной активации и пролиферации, в обеспечении оптимального В-лимфоцитарного иммунного ответа, в частности против Т-независимых антигенов [7].

Таким образом, комплексная морфологическая оценка компонентов клеточного и гуморального звеньев иммунитета селезенки необходима для избирательного, целенаправленного воздействия на нарушенные гистофизиологические процессы органа, что является обязательным условием успешной иммуномодуляции.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 72 нелинейных лабораторных крысах-самцах в возрасте 3–4 месяцев, массой 150–200 г, содержащихся в обычных условиях вивария при естественном освещении и сбалансированном рационе питания. Уход за ними осуществлялся согласно правилам и нормам обращения с лабо-

раторными животными («Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 06.04.1973 г.) [9]. Исследование проведено согласно государственному плану по теме «Нейроиммуногистохимия органов и тканей в норме и в эксперименте» (№ госрегистрации 115041410191 от 14.04.2015 г.) и одобрено локальным этическим комитетом медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» (протокол № 3/1 от 30.11.2015 г.).

Животные разделены на 2 группы: 1-я (контрольная) группа (n = 36) – крысы, получавшие по требованию чистую питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 51309-99, ГОСТ Р 52109-2003, СанПиН 2.1.4.1116-02; 2-я (опытная) группа (n = 36) – крысы, получавшие по требованию питьевую воду, соответствующую требованиям ГОСТ Р 51309-99, 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.

Объектом исследования являлись 72 селезенки, которые забирались в зимнее время с 16 до 18 часов. Выведение животных из эксперимента проводилось на 60 сутки путем декапитации с соблюдением требований гуманности согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных «О порядке проведения эвтаназии животного» (Приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.).

Иммуногистохимические реакции методом трехэтапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител к антигенным маркерам CD4 (клон 1F6), CD8 (клон 4B11), CD20 (клон 7D1) (Novocastra Laboratories Ltd, Великобритания) использовались для идентификации CD4, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки лабораторных крыс [10, 11]. После депарафинирования и регитратации в этаноле нисходящей концентрации срезы селезенки погружали в восстанавливающий цитратный буфер (pH 6,0). Затем проводили высокотемпературную обработку прогреванием на водяной бане при 90–95°C в течение 30 минут с целью демаскировки искомым антигенов в тканях. После ингибирования эндогенной пероксидазы 3%-ным раствором перекиси водорода на метаноле в течение 30 минут с последующей промывкой 0,1М фосфатным буфером проводили иммуногистохимическую реакцию методом трехэтапного непрямого иммуноферментного анализа с использованием первичных моноклональных антител к антигенным маркерам CD4, CD8, CD20 в разведении 1:100 согласно рекомендации фир-

мы-изготовителя (Dako, Дания). Визуализацию первичных моноклональных антител, связавшихся с антигенами, проводили стандартным биотин-стрептавидин-пероксидазным методом с использованием набора LSAB-2 (Labeled Streptavidin Biotin System Peroxidase Dako, Дания). Для блока неспецифического связывания срезы инкубировались в течение 1 часа в 10% козьей сыворотке, после чего к ним были добавлены первичные антитела к белкам CD4, CD8, CD20 на 18 часов при температуре 4°C. В качестве вторичных антител были использованы антивидовые антииммуноглобулиновые биотилированные антитела. С целью выявления биотиновой метки срезы обрабатывались авидин-пероксидазным комплексом. Пероксидазную активность проявляли в инкубационной среде с диаминобензидином. В результате ферментативной реакции субстрат превращался в нерастворимый продукт коричневого цвета, совпадающий по локализации с местонахождением белков. На заключительном этапе срезы докрашивались гематоксилином и эозином. В каждой серии иммуногистохимических реакций выполнялось контрольное исследование с инкубированием нескольких срезов в отсутствие первичных антител. Специфичность экспрессии искомого антигена в опытных срезах селезенки подтверждалась отсутствием ее в контрольных срезах, не обработанных первичными антителами.

Морфометрический анализ включал измерение количества CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки после фотографирования препаратов при увеличении объектива 40 или 90 и окуляра 10 светового микроскопа МИКМЕД-5 (ОАО Ломо, Россия) с применением компьютерной программы «Sigma Scan Pro 5.0» [12].

Для количественного определения содержания общего кальция в сыворотке крови контрольных и опытных животных использовался колориметрический метод с о-крезолфалеин-комплексом [13]. Определение концентрации общего кальция в сыворотке крови проводился у лабораторных крыс контрольной и опытной групп до начала и по окончании сроков эксперимента на 60 сутки. Количественный анализ проводился с использованием набора «Кальций-Витал» (ООО «Витал Диагностика», Россия) на анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом АБХФк-02–«НПП-ТМ» («БиАн», Россия). Метод основан на том, что кальций в щелочной среде образует красно-фиолетовый комплекс с о-крезолфалеинкомплексом. В реакционную смесь добавляют 8-оксихинолин, который связывает металлы, мешающие определению, но образует с кальцием менее прочный комплекс, чем крезолфалеинкомплекс. Интенсивность окраски раствора при длине волны 540–590 нм прямо про-

порциональна концентрации кальция в сыворотке.

Статистический анализ полученных цифровых данных проводился с использованием пакета программ Microsoft Office® Excel 2010 и STATISTICA 10.0 (2008). Для оценки различий качественных признаков использовался доверительный интервал по t-критерию Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при значениях $p \leq 0,05$. В случае, когда гипотеза о нормальности распределения отвергалась, использовали непараметрические критерии Вилкоксона-Манна-Уитни [14].

Цель исследования – изучение морфологических характеристик CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки лабораторных крыс при экспериментальной гиперкальциемии на фоне длительного употребления соединения кальция с питьевой водой.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате иммуногистохимической реакции CD4-позитивные клетки принимают неоднородную коричневую окраску на фоне голубой лимфоидной ткани селезенки лабораторных крыс и выявляются во всех морфо-функциональных зонах как белой, так и красной пульпы органа (рис. 1).

Количество CD4-позитивных клеток в различных морфо-функциональных зонах селезенки варьирует: от полного отсутствия в герминативных центрах лимфоидных узелков контрольных животных до $189,45 \pm 7,35$ клеток/мм² в красной пульпе этой же группы ($p < 0,05$) (рис. 2). Более половины изучаемых клеток зафиксировано в красной пульпе органа обеих групп животных: контрольная группа – 54,6%, опытная группа – 37,4% ($p < 0,02$). Значительное количество клеток с Т-хелперной активностью выявляется в области периаартериальной лимфоидной муфты (16,2%), которая функционально относится в Т-зависимой зоне, и вдоль маргинальных синусов (19,0%) селезенки контрольных животных.

На фоне экспериментальной гиперкальциемии наблюдается увеличение количества CD4-позитивных клеток в белой пульпе селезенки: вокруг центральной артериолы – на 6,5%, в маргинальной зоне – на 5,9% ($p < 0,05$). Отличительной особенностью срезов селезенки опытных крыс является наличие клеток с экспрессией CD4 в герминативных центрах (7,8%) ($p < 0,005$) при их отсутствии в контрольной группе. В красной пульпе органа опытных животных происходит уменьшение количества CD4-реактивных клеток на 17,2% ($p < 0,02$) (рис. 1, 2).

CD8-позитивные клетки селезенки приобретают коричневую окраску продукта иммуногистохимической реакции и хорошо контрастируются на голубом негативном фоне. Обращает на себя

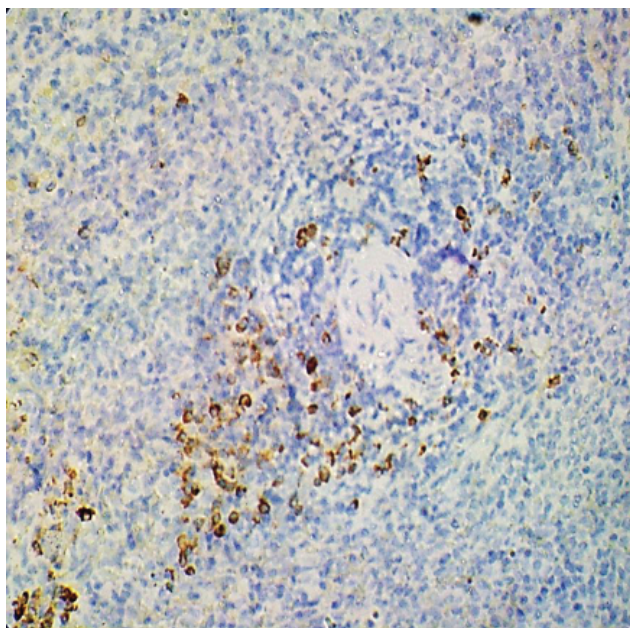


Рис. 1А.

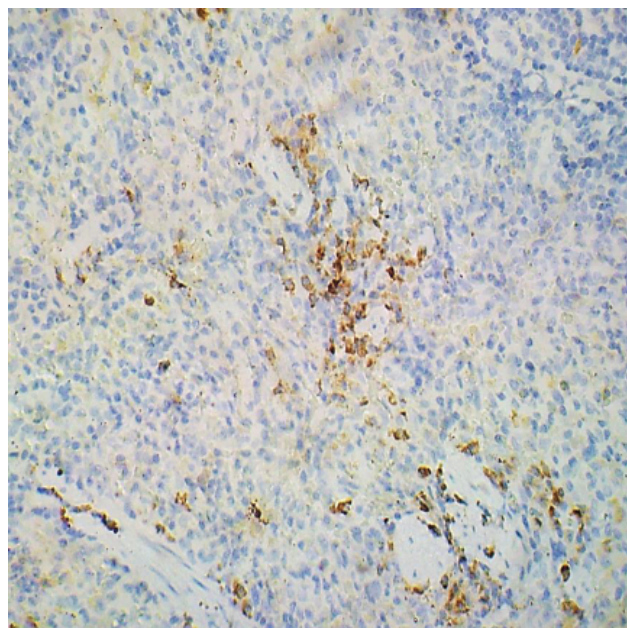


Рис. 1Б.

Рис. 1. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD4. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа. 1 – CD4-позитивные клетки.

внимание, что клетки селезенки крыс, экспрессирующие CD8, имеют различную морфологию. При большом увеличении микроскопа выявляется неоднородное расположение продукта иммуногистохимической реакции в иммунокомпетентных клетках от светло до темно-коричневого цвета. CD8-положительные клетки селезенки лабораторных крыс располагаются большими группами по 20–40 штук, концентрируясь вокруг пульпарных артерий, маргинальных синусов и соединительнотканых трабекул с одноименными сосудами. Обобщая локализацию цитотоксических Т-лимфоцитов обеих экспериментальных групп, можно определить ее, как сопровождающую всю богатую сосудистую сеть органа. Внутри компонентов белой пульпы CD8+ клетки встречаются единично, однако в маргинальной зоне исследуемые клетки плотно располагаются вдоль маргинального синуса (рис. 3).

Количество цитотоксических Т-лимфоцитов находится в пределах от $20,0 \pm 1,52$ клеток/мм² до $136,95 \pm 4,0$ клеток/мм² в зависимости от их локализации в морфо-функциональных зонах селезенки обеих групп животных ($p < 0,05$) (рис. 2). В результате морфометрического анализа выявлена основная локализация CD8-положительных клеток в красной пульпе селезенки крыс. Так, практически половина всех выявленных цитотоксических Т-лимфоцитов располагается в данной функциональной зоне: в контрольной группе

– 41,3%, в опытной группе – 45,9% ($p < 0,004$). Т-лимфоциты с цитотоксической активностью часто располагаются в маргинальной зоне лимфоидных узелков, вдоль одноименных синусов селезенки: в контрольной группе – 31,7%, в опытной группе – 30,6% от всех выявленных клеток с CD8 на поверхности ($p < 0,04$). При экспериментальной гиперкальциемии наблюдаются незначительные количественные вариации в морфо-функциональных зонах селезенки с преимущественным увеличением количества изучаемых клеток в красной пульпе (на 4,6%) и сокращением их числа в мантийной зоне (на 2,6%) ($p < 0,05$).

В-лимфоциты располагаются крупными скоплениями по 20–50 клеток и обнаруживаются во всех морфо-функциональных зонах селезенки крыс. При морфологическом анализе CD20-положительных клеток выявляется гетерогенность популяции. Максимальная экспрессия CD20 наблюдается на мембранах клеток красной пульпы селезенки – вдоль пульпарных артерий и эллипсоидных капилляров, а также в белой пульпе вдоль маргинальных синусов. В отличие от CD4- и CD8-положительных клеток, В-лимфоциты часто обнаруживаются в герминативных центрах лимфоидных узелков обеих групп животных. Маркер CD20 экспрессируют клетки центра размножения, находящиеся как на периферии, на границе с мантийной зоной, так и с диффузным расположением внутри данной структуры. В первичных лимфоид-

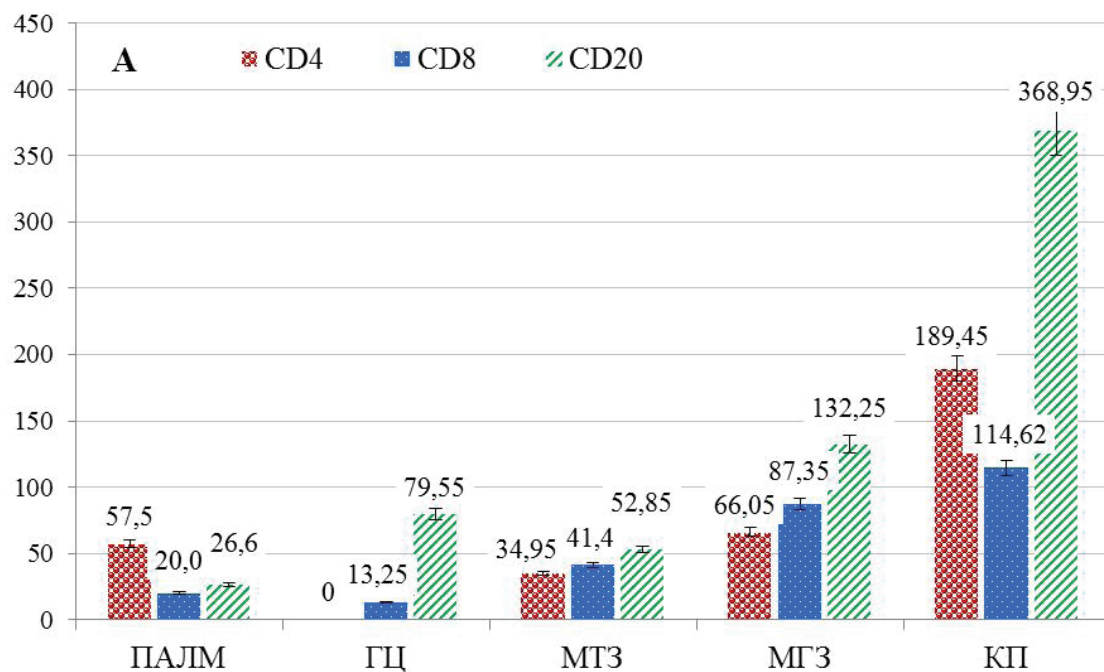


Рис. 2А.

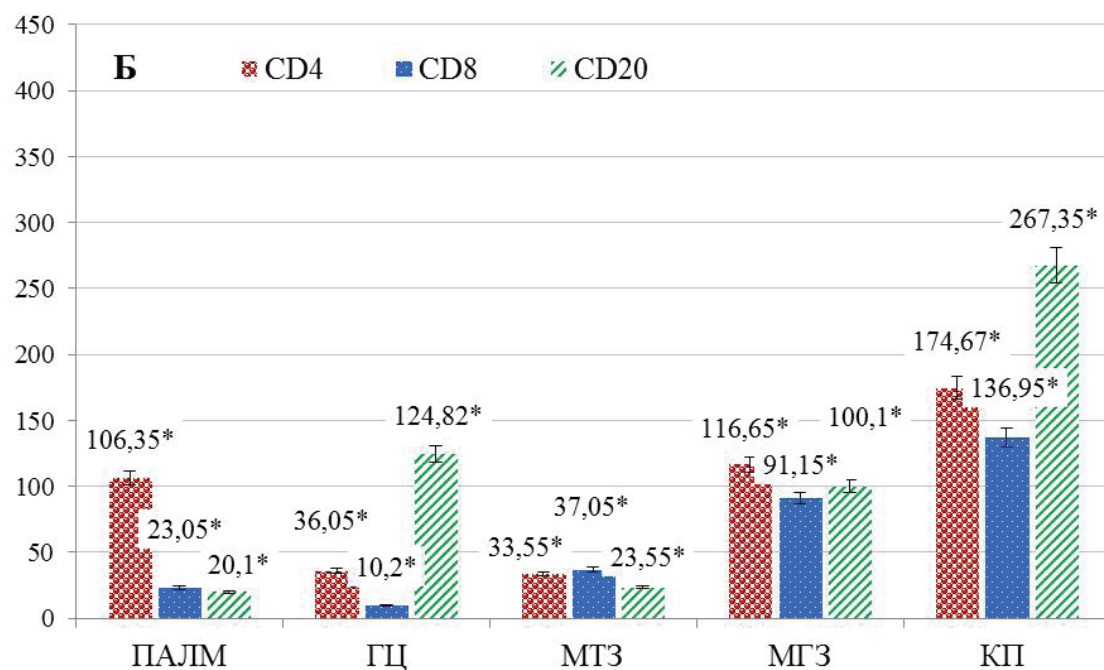


Рис. 2Б.

Рис. 2. Соотношение среднего количества CD4-, CD8-, CD20-позитивных клеток селезенки в морфо-функциональных зонах селезенки лабораторных крыс на единицу площади, шт./мм². А – контрольная группа. Б – опытная группа.

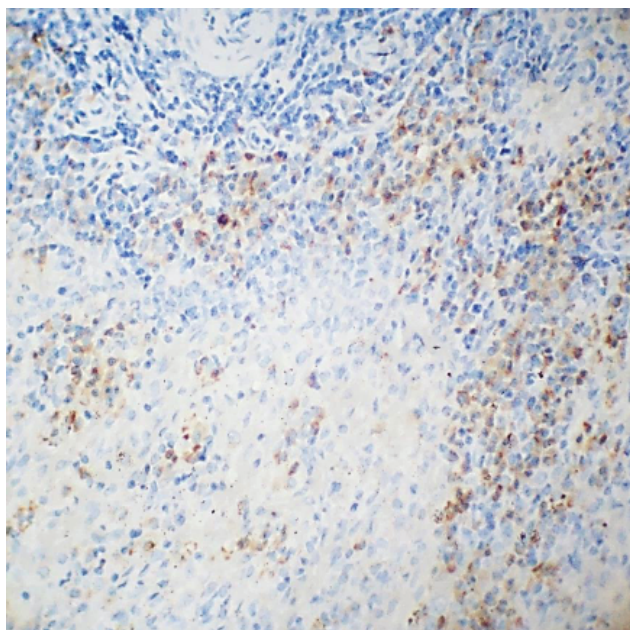


Рис. 3А.

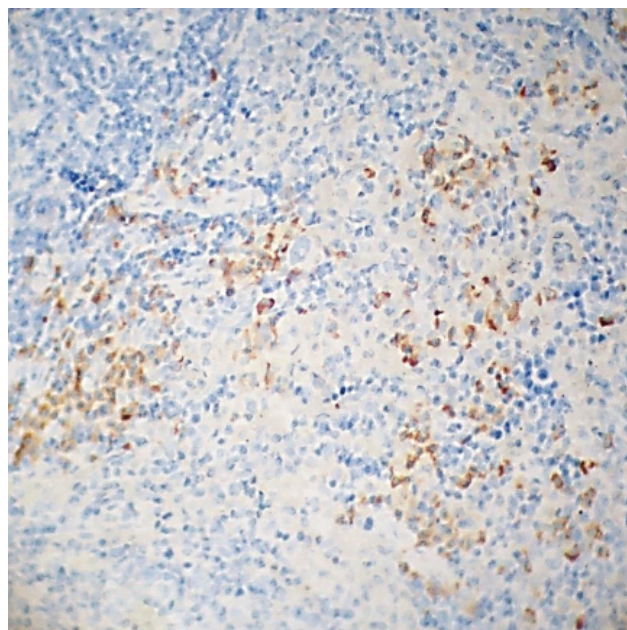


Рис. 3Б.

Рис. 3. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD8. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа. 1 – CD8-позитивные клетки.

Таблица.

Уровни экспрессии CD4, CD8, CD20 и иммунорегуляторный индекс (ИРИ) в клетках селезенки лабораторных крыс контрольной группы и при экспериментальной гиперкальциемии ($M \pm m$)

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа	Степень и направленность изменений	Достоверность
Уровень экспрессии CD4	$12,53 \pm 0,57\%$	$15,93 \pm 0,36\%$	$+ 4,69 \pm 1,11\%$	$p < 0,04$
Уровень экспрессии CD8	$10,44 \pm 0,48\%$	$11,4 \pm 0,22\%$	$+ 1,63 \pm 0,57\%$	$p < 0,007$
ИРИ (CD4/CD8)	$1,28 \pm 0,03$	$1,43 \pm 0,06$	$+ 10,46 \pm 4,27\%$	$p < 0,03$
Уровень экспрессии CD20	$24,36 \pm 1,26\%$	$18,93 \pm 0,83\%$	$- 19,29 \pm 4,93\%$	$p < 0,04$

ных узелках CD20-положительные В-лимфоциты располагаются в мантийной и маргинальной зонах и крайне редко в периартериолярных лимфоидных муфтах. Обращают на себя внимание В-лимфоцитарные скопления вокруг первичных лимфоидных узелков селезенки крыс опытной группы, в отличие от животных, употреблявших чистую питьевую воду (рис. 4).

Около половины всех выявленных В-лимфоцитов селезенки располагаются в красной пульпе, преимущественно вокруг просветов ее богатой сосудистой сети: в контрольной группе – 56,2%, в опытной группе – 49,9% ($p < 0,05$). При употреблении хлорида кальция с питьевой водой происходит количественное перераспределение CD20-позитивных клеток с увеличением их количества в герминативных центрах на 10,9% ($p < 0,05$) и сокращением на 0,4–6,3% – в остальных

функциональных зонах селезенки ($p < 0,05$) (рис. 2).

Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – количественное соотношение Т-хелперов и Т-цитотоксических клеток (CD4/CD8) [8, 15]. Исследованию подвергнуты клетки селезенки, экспрессирующие на мембране CD4 и CD8, в обеих группах животных.

Уровни экспрессии CD4, CD8, CD20 и иммунорегуляторный индекс (ИРИ) в клетках селезенки лабораторных крыс контрольной группы и при экспериментальной гиперкальциемии ($M \pm m$)

Уровень экспрессии маркеров Т-хелперов более активно отвечает на экспериментальные условия с увеличением уровня экспрессии CD4-позитивных клеток селезенки на $4,69 \pm 1,11\%$ ($p < 0,04$). Цитотоксические Т-лимфоциты органа под влиянием соединения кальция увеличивают экспрессию в пределах $1,63 \pm 0,57\%$ ($p < 0,007$)

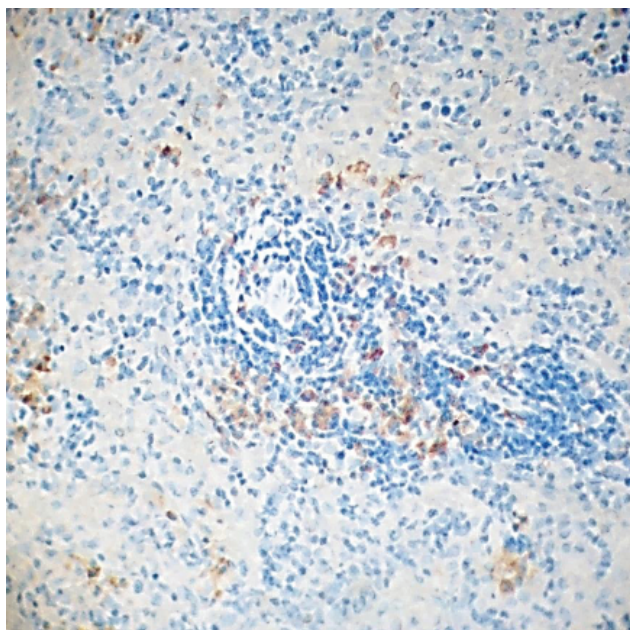


Рис. 4 А.

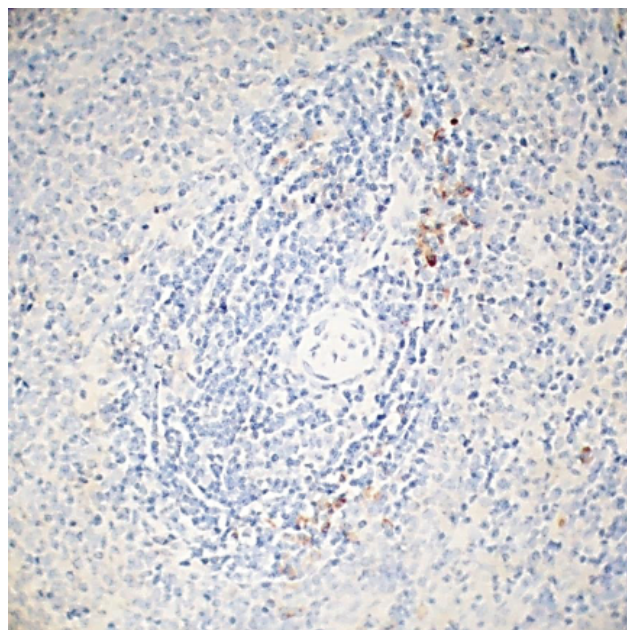


Рис. 4 Б.

Рис. 4. Селезенка лабораторных крыс. Иммуногистохимический метод с антителами к CD20. Микроскоп МИКМЕД-5. Об. 40. Ок. 10. А – контрольная группа. Б – опытная группа. 1 – CD20-позитивные клетки.

(табл. 1). Как следствие, на фоне употребления соединения кальция происходит индукция клеточного иммунитета селезенки с повышением иммунорегуляторного индекса на $10,46 \pm 4,27\%$ ($p < 0,03$).

Сравнительный анализ количества клеток с экспрессией маркеров клеточного (CD4+, CD8+) и гуморального (CD20+) звеньев иммунитета выявил, что практически во всех функциональных зонах селезенки крыс контрольной группы преобладает число В-лимфоцитов с максимальной их локализацией в красной пульпе органа (Рисунок 2). Исключение составляет периартериолярная лимфоидная муфта, где локализуется наибольшее количество лимфоцитов с Т-хелперной активностью, которые более чем в два раза превышают число В-лимфоцитов в данной зоне. В герминативном центре наблюдается противоположная картина с преимущественно В-лимфоцитарной локализацией. Маргинальная зона, особенно вокруг одноименного синуса, имеет богатую лимфоцитарную обеспеченность с преобладанием гуморальных CD20-позитивных компонентов. В мантийной зоне локализуются относительно равное количество клеток гуморального и клеточного звена иммунного ответа.

Употребление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается количественными изменениями иммунокомпетентных клеток селезенки (рис. 2). В периартериолярной лимфоидной муфте лимфоидных узелков наблюдается увеличение

количества Т-хелперов в 1,84 раза при относительно стабильном количестве цитотоксических Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов. Также отмечается превышение числа Т-хелперов в 2,16 раз в данной зоне контрольных животных, относительно В-лимфоцитарного пула, а на фоне эксперимента эти различия достигают 5,28 раз ($p < 0,05$). В герминативных центрах лимфоидных узелков селезенки наблюдается увеличение числа CD20-позитивных клеток в 1,54 раза ($p < 0,05$), а в мантийной зоне – их сокращение в 2,24 раза ($p < 0,05$).

По результатам данного исследования употребление хлорида кальция с питьевой водой сопровождается изменениями иммунокомпетентных клеток селезенки лабораторных крыс: гиперактивностью хелперного и цитотоксических звеньев иммунной системы (CD4+ и CD8+), повышением иммунорегуляторного индекса, инверсией гуморального иммунитета со снижением уровня экспрессии и количества CD20+ клеток. Данные изменения находятся в рамках современных представлений о гомеостатической регуляции клеточного и гуморального звеньев иммунитета по типу замещения [8].

Выявленный нами комплекс изменений в селезенке крыс при гиперкальциемии свидетельствует о повышении клеточного звена с компенсаторным снижением показателей гуморального иммунитета, что отражает проявление активации и ауторегуляции иммунного ответа. Таким образом, проведенное исследование свидетельствует об

избирательном характере воздействия кальция на модуляцию кооперативного взаимодействия Т- и В-клеточных звеньев иммунного ответа.

Основой адекватного воздействия соединения кальция на организм и оценки сопутствующих морфологических изменений в селезенке лабораторных крыс является достоверное повышение концентрации общего кальция в периферической крови [16]. Для лабораторного подтверждения эффективности употребления и абсорбции хлорида кальция с питьевой водой в течение 60 суток в дозе 235 мг/л в пересчете на кальций нами проведены биохимические анализы с определением концентрации общего кальция в сыворотке крови лабораторных крыс контрольной и опытной групп до начала и по окончании эксперимента на 60 сутки.

До начала эксперимента концентрация общего кальция в сыворотке крови лабораторных крыс контрольной группы составляла 2,24 – 2,52 ммоль/л ($2,43 \pm 0,007$ ммоль/л). Исходный показатель уровня общего кальция крови крыс, выбранных для прохождения эксперимента в составе опытной группы, находился в пределах от 2,22 ммоль/л до 2,56 ммоль/л и в среднем равен $2,42 \pm 0,009$ ммоль/л.

По окончании сроков эксперимента (на 60 сутки) у всех лабораторных животных обеих групп были повторно проведены биохимические анализы. У крыс, употреблявших чистую питьевую воду, и находившихся на стандартном сбалансированном рационе питания вивария, уровень общего кальция крови не имел значительных вариаций относительно исходных показателей и сохранился на уровне 2,22 – 2,61 ммоль/л ($2,41 \pm 0,01$ ммоль/л). При употреблении питьевой воды с добавлением хлорида кальция в течение 60 суток у крыс опытной группы концентрация общего кальция варьирует от 2,51 ммоль/л до 3,16 ммоль/л ($2,86 \pm 0,02$ ммоль/л). Таким образом, в модулируемых условиях эксперимента в периферической крови опытной группы лабораторных крыс происходит статистически значимое повышение концентрации общего кальция в крови на $0,41 \pm 0,01$ ммоль/л, что составляет $14,39 \pm 0,69\%$ от исходных значений ($p < 0,008$).

Выводы:

1. На фоне экспериментальной гиперкальциемии происходит увеличение количества CD4-позитивных клеток (Т-хелперов) белой пульпы селезенки: в периартериолярной лимфоидной муфте – на 6,5%, в герминативных центрах – на 7,8%, в маргинальной зоне – на 5,9% ($p < 0,05$). В красной пульпе органа опытных животных наблюдается сокращение числа исследуемых клеток на 17,2% ($p < 0,02$).

2. CD8-позитивные клетки (цитотоксические Т-лимфоциты) селезенки реагируют на экспе-

риментальную гиперкальциемию увеличением количества в красной пульпе (на 4,6%) и сокращением – в мантийной зоне лимфоидных узелков (на 2,6%) ($p < 0,05$).

3. При употреблении хлорида кальция с питьевой водой происходит количественное перераспределение CD20-позитивных клеток (В-лимфоцитов) с увеличением их количества в герминативных центрах на 10,9% ($p < 0,05$) и сокращением – в остальных функциональных зонах селезенки на 0,4–6,3% ($p < 0,05$).

4. Экспериментальная гиперкальциемия сопровождается повышением общего уровня экспрессии маркеров клеточного звена иммунного ответа CD4 (на $4,69 \pm 1,11\%$) и CD8 (на $1,63 \pm 0,57\%$) ($p < 0,04$), а также снижением данного показателя маркера гуморального звена иммунитета CD20 (на $19,29 \pm 4,93\%$) ($p < 0,04$) в клетках селезенки лабораторных крыс.

5. Употребление водного раствора хлорида кальция в концентрации 235 мг/л в течение 60 суток вызывает достоверное повышение уровня общего кальция в сыворотке крови на $14,39 \pm 0,69\%$ от контрольных значений ($p < 0,008$) и является адекватной моделью для формирования экспериментальной гиперкальциемии у крыс с последующей оценкой морфологических и иммуногистохимических изменений селезенки.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Онтогенетические аспекты стромально-паренхиматозных взаимоотношений в селезенке / А. И. Рябикина, М. Ю. Капитонова, А. А. Нестерова, З. Ч. Морозова // *Морфология*. – 2008. – Т. 132, № 2. – С. 58.
2. Auerbach, A. *Diagnostic Pathology: Spleen* / Auerbach A. – Lippincott Williams & Wilkins. – 2014. – 536 p.
3. Соотношение иммуномодуляционных сдвигов в центральных и периферических органах иммунной защиты при хроническом стрессе / А. А. Нестерова, М. Ю. Капитонова, Н. А. Мураева, А. И. Краюшкин и др. // *Морфология*. – 2006. – № 5. – С. 49–50.
4. Кудрин, А. В. *Микроэлементы в иммунологии и онкологии* / А. В. Кудрин, О. А. Громова. – М.: ГЭОТАР - Медиа, 2007. – 544 с.
5. Физиологическая роль кальция в организме / В. М. Студеникин, А. С. Николаев, О. В. Чумакова, Е. М. Мазурина и др. // *Научные труды I съезда физиологов СНГ*. – М.: Медицина-Здоровье, 2005. – С. 6.
6. Ярилин, А. А. *Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов: обзор* / А. А. Ярилин // *Иммунология*. – 2010. – Т. 31, № 3. – С. 153–168.
7. *Иммунология: учебник* / Р. М. Хаитов. – 2-е изд.,

- перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 528 с.: ил.
8. Coico, R. *Immunology: A Short Course*. 7th Edition / R. Coico, G. Sunshine. – 2015. – 432 p.
9. *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. Council for international organization of medical sciences and the international council for laboratory animal science. – Committee to revise the international guiding principles. – Geneva, 2012.
10. Яглов, В. В. Маркеры в морфологии и стратегия их исследования / В. В. Яглов // Клиническая морфология новообразований эндокринных желез. – М., 2010. – С. 116–120.
11. Lorette, J. *Immunocytochemical Methods and Protocols* / J. Lorette // *Methods in Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 115. – Second Edition. – Humana Press Inc., Totowa, NJ. – 457 p.
12. Дьячкова, И. М. Некоторые адаптационные реакции тимуса на поступление кальция и кремния с питьевой водой / И. М. Дьячкова, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, С. П. Сапожников. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2014. – 140 с.
13. Клиническая лабораторная диагностика / В. В. Долгов, С. А. Луговская, В. Т. Морозова и др. – М.: Медицина, 2002. – 157 с.
14. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
15. Abbas, A. K. *Cellular and Molecular Immunology* / A. K. Abbas, A. H. Lichtman, S. Pillai. – 2014. – 8th Ed. – 544 p.
16. Мирошников, С. А. Диапазон концентраций (референтные значения) химических элементов в теле животных / С. А. Мирошников, С. В. Лебедев // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 241–243.

Авторская справка:

1. Мельникова Ольга Владимировна – аспирант кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», врач аллерголог-иммунолог БУ «Центральная городская больница» Минздрава Чувашии; 428018, г. Чебоксары, Московский проспект, 14–81; мобильный телефон: 8905-028-39-53; e-mail: olga1407@bk.ru.
2. Сергеева Валентина Ефремовна – доктор биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»; 428000, г. Чебоксары, Московский проспект, 15; мобильный телефон: 8909-301-62-59; e-mail: kaf-biology@yandex.ru.