

УДК 612.017

DOI: 10.14427/jipai.2020.4.75

## Иммунопатологические механизмы токсического повреждения печени, тимуса и селезенки

З.А. Шафигуллина<sup>1,2</sup>, И.Г. Данилова<sup>1</sup><sup>1</sup> ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, г. Екатеринбург

### Immunopathological mechanisms of toxic damage to the liver, thymus and spleen

Z.A. Shafigullina<sup>1,2</sup>, I.G. Danilova<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Immunology and Physiology Ural Branch of RAS, Yekaterinburg<sup>2</sup> Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Institute of Natural Sciences and Mathematics, Yekaterinburg

#### Аннотация

**Цель исследования:** установить особенности иммунного ответа на ранних стадиях диффузного токсического повреждения.

**Материалы и методы.** Диффузное токсическое повреждение у крыс-самцов линии Wistar моделировали путем однократной внутрибрюшинной инъекции масляного раствора тетрахлорметана (CCl<sub>4</sub>) в дозе 50 мг/100 г. Выведение животных из эксперимента было выполнено через 3, 7 и 14 суток. В рамках исследования проведен гематологический и гистологический анализ, иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание тканей печени, тимуса и селезенки, выполнена количественная оценка CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> (Т-и В-лимфоцитов), F4/80<sup>+</sup> (макрофагов), а также HSP70<sup>+</sup>-клеток.

**Результаты.** Показано, что введение CCl<sub>4</sub> вызывает структурные нарушения ткани печени, тимуса и селезенки. На ранних сроках отмечается увеличение CD3<sup>+</sup>-клеток в печени и селезенке, в то время как в тимусе преобладают CD45RA<sup>+</sup>-клетки. На 3 сутки после воздействия токсиканта в печени количество F4/80<sup>+</sup>-клеток возрастает на 56,7%, в тимусе и селезенке на 21% и 19,3% соответственно, также отмечается увеличение количества HSP70<sup>+</sup>-клеток приблизительно в 2 раза в печени и тимусе, а в селезенке в 7 раз.

**Заключение.** Гепатотропный яд CCl<sub>4</sub> вызывает повреждение не только печени, но и органов иммунопоэза. На ранних сроках воздействия токсиканта в печени и селезенке преобладающей популяцией являются Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>-клетки), тогда как в тимусе – В-лимфоциты (CD45RA<sup>+</sup>-клетки). Во всех исследуемых органах на 3 сутки эксперимента возрастает количество макрофагов, а в отдаленные сроки – существенно снижается. Данный факт свидетельствует о том, что макрофаги выступают в роли мишени токсического воздействия.

#### Summary

**Objective:** to establish the features of immune response in early stages of diffuse toxic damage.

**Materials and methods.** Diffuse toxic liver damage in male Wistar rats was caused by a single intraperitoneal injection of an oil solution of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) at a dose of 50 mg/100 g. Animals were excluded from the experiment on days 3, 7 and 14. The study included hematological and histological analysis, immunohistochemical (IHC) staining of liver, thymus and spleen tissues, quantitative evaluation of CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> (T- and B-lymphocytes), F4/80<sup>+</sup> (macrophages), and HSP70<sup>+</sup>-cells.

**Results.** CCl<sub>4</sub> administration has been shown to cause structural disorders of liver, thymus, and spleen tissue. In the early stages, there is an increase in CD3<sup>+</sup>-cells in the liver and spleen, while CD45RA<sup>+</sup>-cells predominating in the thymus. On the 3rd day after CCl<sub>4</sub> administration, the number of F4/80<sup>+</sup>-cells in the liver increases by 56.7%, in the thymus and spleen by 21% and 19.3%, respectively, there is also an increase in the number of HSP70<sup>+</sup>-cells roughly 2 times in the liver and thymus, and by 7 times in the spleen.

**Conclusion.** Hepatotropic poison CCl<sub>4</sub> causes damage not only the liver but the organs of immunopoiesis. In the early stages of exposure to the toxicant the predominant population is T-lymphocytes (CD3<sup>+</sup>-cells) in the liver and spleen, and B – lymphocytes (CD45RA<sup>+</sup>-cells) in the thymus. In all the studied organs, the number of macrophages increases on the 3rd day of the experiment, and significantly decreases at the later term. This fact indicates that macrophages act as a target of toxic effects.

The increase in the number of HSP70<sup>+</sup>-cells in the liver, thymus, and spleen in response to toxic damage is likely aimed at triggering the repair or elimination of denatured proteins that are toxic to the cell.

Увеличение количества HSP70<sup>+</sup>-клеток в печени, тимусе и селезенке в ответ на токсическое повреждение вероятно направлено на запуск процессов репарации или элиминации токсичных для клетки денатурированных белков.

### **Ключевые слова**

Лимфоциты, макрофаги, HSP70, токсическое повреждение

### **Введение**

Распространенной экспериментальной моделью диффузного токсического повреждения является интоксикация организма, вызванная воздействием  $CCl_4$  [1]. Показано, что  $CCl_4$  обладает плеiotропным действием и наряду с повреждением печени, основного органа-мишени, вызывает нарушение в таких органах иммунной системы, как тимус и селезенка [2]. Имунокомпетентные клетки печени, тимуса и селезенки, к числу которых относятся лимфоциты и макрофаги, играют решающую роль не только в инициации воспалительной реакции, возникающей в ответ на воздействие патогенного стимула, но и определяют скорость восстановительных процессов за счет продукции широкого спектра медиаторов. Одними из важнейших агентов, принимающих участие в вышеописанных физиологических процессах, являются белки теплового шока. При воздействии «стрессорного» фактора внутриклеточное содержание HSP70 (белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа) может увеличиваться в десятки раз и составлять до 5% от содержания всех клеточных белков [3]. Имеются данные о том, что к экспрессии HSP70 способен широкий спектр клеток, в том числе гепатоциты, лимфоциты и макрофаги [4]. Внутриклеточный HSP70 не только опосредует шаперон-цитопротекторные функции, но также может блокировать избыточный апоптоз [5]. Кроме того, HSP70 активно высвобождается во внеклеточную среду, где он действует как цитокиновый и пептидный адъювант, тем самым способствуя как врожденному, так и адаптивному иммунным ответам [6].

Изучение иммунотоксичных свойств  $CCl_4$  и получение данных о его воздействии на количественное соотношение популяций лимфоцитов и макрофагов, а также клеток, содержащих гранулы HSP70, позволит разработать и патогенетически обосновать оптимальный метод коррекции нарушений.

*Цель исследования:* установить особенности иммунного ответа на ранних стадиях токсиче-

### **Keywords**

Lymphocytes, macrophages, HSP70, toxic damage

ского повреждения, вызванного гепатотропным ядом.

### **Материалы и методы**

Исследование проведено на 50 крысах-самцах линии Wistar весом 180-200 г. Все манипуляции с животными выполнены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС. На проведение исследования получено разрешение комиссии по биоэтике Института естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина (протокол №2 от 21.10.2020 г) и этического комитета Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол № 01/19 от 18.12.2019 г). В ходе эксперимента животные содержались по 5 крыс в клетке на обычном рационе вивария с неограниченным доступом к пище и воде и температурным режимом +20-22°C.

Для моделирования токсического повреждения применяли 50% масляный раствор тетрахлорметана (ГОСТ 20288-74, АО «ЭКОС-1»). Инъекции раствора  $CCl_4$  вводили крысам однократно внутривентриально в дозе 50 мг/100 г, что соответствует 0,3 мл/кг [7]. Продолжительность действия гепатотоксиканта составляла 3, 7 и 14 суток. К группам с  $CCl_4$ -воздействием была сформирована контрольная группа животных. Интактная группа состояла из здоровых животных.

После двенадцатичасового голодания и забора крови из хвостовой вены крысы были выведены из эксперимента передозировкой золетила (15 мг/кг). После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали печень, тимус и селезенку. Фрагменты печени фиксировали в 10% забуференном водном растворе формалина в течение 24 часов. Далее в течение 6-8 часов фрагменты органов промывали проточной водопроводной холодной водой, а затем подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия). После заливки ткани в

парафин на ручном санном микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) изготавливались срезы толщиной 3-4 мкм. Для оценки структурных изменений ткань печени, тимуса и селезенки окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическое исследование было выполнено с использованием светового микроскопа Leica DM2500 и программного обеспечения для захвата и анализа изображений Leica Application Suite. Морфометрический анализ тимуса включал определение площади коркового и мозгового вещества, в селезенке оценивали площадь красной и белой пульпы.

Общий анализ периферической крови выполнен на гематологическом анализаторе Biocode Hycel Celly 70 (Biocode Hycel, Франция).

Иммуногистохимическое исследование применяли для выявления CD3<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> клеток в ткани печени, тимуса и селезенки. Были использованы первичные моноклональные антитела mouse anti-rat CD3 clone G 4.18, CD45 RA clone OX-33 (BD Pharmingen, США) и вторичные антитела Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption, BD Biosciences, США), для определения F4/80<sup>+</sup> клеток – первичные поликлональные антитела anti-F4/80, PA5-21399 (Thermo Fisher Scientific, США), и вторичные – Biotin Goat Anti-Rabbit Ig G (Thermo Fisher, Scientific, США). Антигенреактивные клетки выявляли при помощи тест-системы Novolink™ Polymer Detection System (Novocastra Lab., Ltd), контрастируя их раствором хромогенного субстрата DAB (3,3-диаминобензидин).

Подсчет количества Т и В-лимфоцитов, F4/80<sup>+</sup> клеток выполнен в 20 полях зрения при увеличении микроскопа 1000x с последующим пересчетом на 1 мм<sup>2</sup> среза.

Клетки, экспрессирующие белки теплового шока HSP70 в печени, тимусе и селезенке определяли иммуногистохимическим непрямым пероксидазным методом, в ходе которого применяли первичные антитела HSP 70 (3A3): sc-32239, clone 3A3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) и вторичные поликлональные антитела Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption, Biosciences, США). Количество HSP70<sup>+</sup>-клеток оценивали в 40 полях зрения, использовали увеличение микроскопа 400x.

Для исключения неспецифического окрашивания во всех случаях применяли негативный и позитивный изотипический контроль.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы OriginPro 2018 software (OriginLab Corporation,

США) и непараметрического критерия Краскела-Уоллеса для множественных сравнений (непараметрический метод сравнения трех или более групп). Данный статистический подход был выбран в связи с отсутствием нормального распределения. Критический уровень значимости  $p$  при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

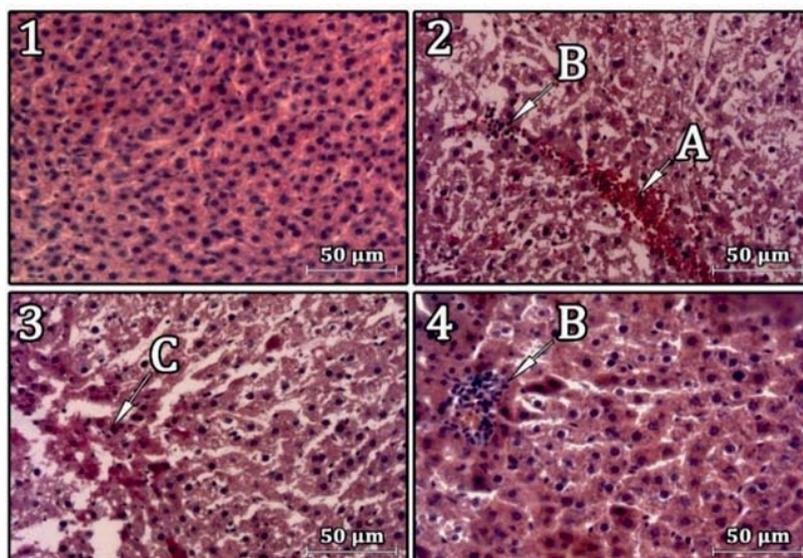
## Результаты и обсуждение

В связи с тем, что в ходе исследования не было установлено различий между показателями интактной и контрольной группой животных в дальнейшем представлены результаты только интактной группы.

При гистологическом исследовании на 3 сутки после введения CCl<sub>4</sub> в ткани печени выявлен ряд патологических изменений, характерных для токсического гепатита, проявляющихся в форме единичных некрозов, анизоцитоза и анизоуклеоза гепатоцитов, также присутствуют клетки с признаками крупнокапельной вакуольной дистрофии. Явные нарушения со стороны сосудов микроциркуляторного русла проявляются в виде полнокровия центральных вен и вен портальных трактов печени (рис. 1). Выявленные морфологические изменения, вероятно, обусловлены воспалительной реакцией, которая развивается практически сразу после введения токсиканта.

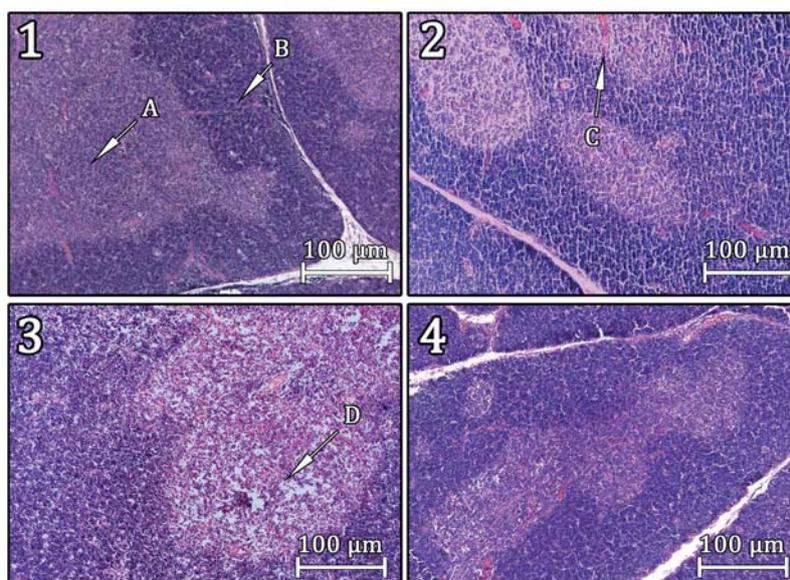
К 7 и 14 суткам, после интоксикации CCl<sub>4</sub>, нарастают деструктивные процессы в печени. Характерно наличие многочисленных очаговых некрозов гепатоцитов с умеренной перифокальной инфильтрацией лимфоцитами и зернистая дистрофия гепатоцитов, которая является следствием нарушения белкового обмена. Признаки экссудативного воспаления выражены в меньшей степени (рис. 1).

Установлено, что воздействие CCl<sub>4</sub> приводит не только к нарушению структуры печени, но и органов иммунной системы [8, 9]. В центральном органе иммунопоза – тимусе на ранние сроки после введения CCl<sub>4</sub> выявлена стертость границ между корковым и мозговым веществом, в мозговом веществе наблюдается полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (рис. 2). В просвете сосудов видны сладжированные эритроциты. Для мозгового и коркового вещества тимуса характерен умеренный интерстициальный отек, в корковом веществе встречаются участки разрыхления плотности тимоцитов, при этом площадь мозгового вещества возрастает на 13,5%, а коркового – на 19,8% (табл. 1) относительно показателей интактных животных.



**Рис. 1. Структура печени экспериментальных животных. Окраска гематоксилином и эозином**

Примечание: 1 – интактная группа; 2 –  $\text{CCl}_4$  3 сутки, 3 –  $\text{CCl}_4$  7 сутки, 4 –  $\text{CCl}_4$  14 сутки; А – полнокровие, В – очаговая лимфо-лейкоцитарная инфильтрация, С – некроз гепатоцитов.



**Рис. 2. Структура тимуса экспериментальных животных. Окраска гематоксилином и эозином**

Примечание: 1 – интактная группа; 2 –  $\text{CCl}_4$  3 сутки, 3 –  $\text{CCl}_4$  7 сутки, 4 –  $\text{CCl}_4$  14 сутки; А – мозговое вещество, В – корковое вещество, С – полнокровие сосудов, D – разряжение плотности тимоцитов.

Через 7 суток после введения  $\text{CCl}_4$  в ткани тимуса усиливается интерстициальный отек. Зафиксировано расширение просвета сосудов. В ряде сосудов мозгового вещества отмечается набухание эндотелиоцитов и их частичная десквамация. В некоторых сосудах выявлен лейкодиapedез. В дольках тимуса границы между корковым и мозговым веществом стерты, паренхима разряжена (рис. 2).

К 14 суток после внутрибрюшинного введения  $\text{CCl}_4$  границы между корковым и мозговым веществом долек тимуса четкие. Во всех дольках отмечается увеличение площади коркового вещества в 2 раза по сравнению с аналогичным параметром интактной группы (табл. 1), в мозговом слое выражено полнокровие и капилляростаз (рис. 2).

В периферическом органе иммунной системы – селезенке, через 3 суток после интоксикации  $CCl_4$ , отмечается оголение стромы, сохраняется четкость границ между красной и белой пульпой. В части трабекулярных сосудов выявлены признаки полнокровия и капилляростаза (рис. 3). Сохраняется зональность лимфоидных фолликулов белой пульпы. В красной пульпе наблюдается фокусы гемосидероза.

На фоне воздействия токсиканта к 7 суткам в ткани селезенки нарастает интерстициальный отек с оголением отдельных участков стромы органа. Границы между красной и белой пульпой стерты, отмечается полнокровие и капилляростаз трабекулярных сосудов. Зональность лимфоидных фолликулов белой пульпы нарушена (рис. 3).

Согласно данным морфометрического анализа, установлено, что на 3 и 7 сутки после интокси-

кации  $CCl_4$  происходит угнетение иммунопоэза в селезенке, которое сопровождается достоверным уменьшением площади белой пульпы на 53,3% и 40% относительно показателей интактной группы (табл. 1).

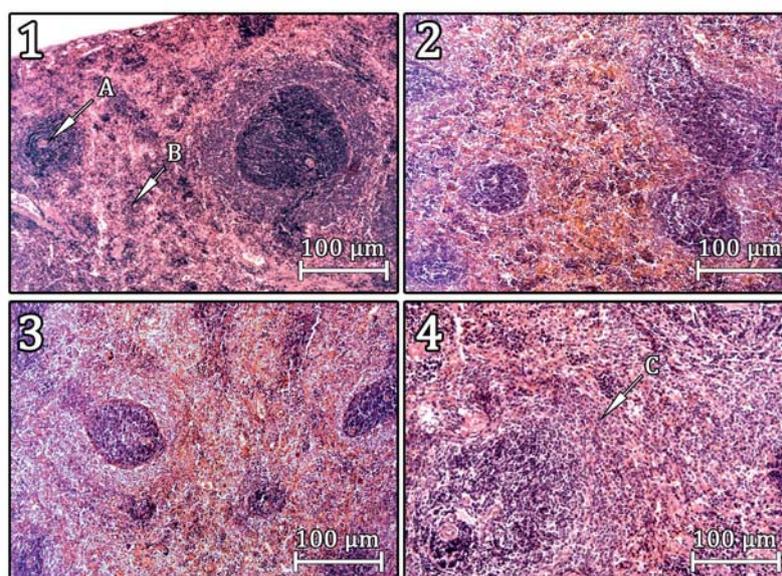
Через 2 недели после введения токсиканта в селезенке отмечается стертость границ между красной и белой пульпой (рис. 3), визуализируется уменьшение количества лимфоидных фолликулов. Структура зональности фолликула нарушена. В части сосудов стромы эндотелиоцитоз (нарушение структуры эндотелия).

При анализе периферической крови крыс при токсическом воздействии  $CCl_4$  отмечается типичная для развития воспалительной реакции картина. В ранние сроки после введения токсиканта увеличивается количество лейкоцитов, обусловленное возрастанием уровня лимфоцитов

**Таблица 1. Морфометрические параметры органов иммунопоэза в норме и при токсическом повреждении**

Группа/ Показатель	Площадь мозгового вещества тимуса, мм <sup>2</sup>	Площадь коркового вещества тимуса, мм <sup>2</sup>	Площадь белой пульпы селезенки, мм <sup>2</sup>	Площадь красной пульпы селезенки, мм <sup>2</sup>
Интактная	0,37±0,08	1,21±0,23	0,15±0,01	0,85±0,01
$CCl_4$ 3 сутки	0,42±0,08 *	1,45±0,19	0,07±0,01 *	0,93±0,01
$CCl_4$ 7 сутки	0,34±0,14	1,68±0,33	0,09±0,01*	0,91±0,01
$CCl_4$ 14 сутки	0,21±0,03 *#	2,94±0,36 *	0,08±0,01*	0,90±0,02

Примечание: статистически значимые различия с интактной группой (\*,  $p < 0,05$ ) и с группой  $CCl_4$  3 сутки (#,  $p < 0,05$ ).



**Рис. 3. Структура селезенки экспериментальных животных. Окраска гематоксилином и эозином**

Примечание: 1 – интактная группа; 2 –  $CCl_4$  3 сутки, 3 –  $CCl_4$  7 сутки, 4 –  $CCl_4$  14 сутки; А – белая пульпа, В – красная пульпа, С – нарушение зональности лимфоидного фолликула.

и моноцитов (табл. 2), что вероятно связано с регуляторной ролью этих клеток в восстановительных процессах.

Для оценки выраженности воспалительной реакции и вовлеченности иммунокомпетентных клеток в регуляторный ответ в условиях токсического повреждения выполнено иммуногистохимическое окрашивание тканей печени, тимуса и селезенки на CD3<sup>+</sup> и CD45RA<sup>+</sup>-клетки.

Известно, что лимфоциты печени участвуют в регуляции продолжительности жизни гепатоцитов в физиологическом (апоптоз) и патологическом (некроз) цикле. [10, 11]. CD3<sup>+</sup> маркер используют для количественной оценки популяции Т-лимфоцитов [12]. В рамках данного исследования установлено, что на ранних этапах после воздействия гепатотропного яда в ткани печени развивается острая воспалительная реакция, при этом количество CD3<sup>+</sup>-клеток возрастает по сравнению с показателями интактной группы больше чем на 90% (рис. 4). На 7 сутки после воздействия CCl<sub>4</sub> зафиксировано резкое снижение количества CD3<sup>+</sup>-клеток, в то время как на 14 сутки данный показатель вновь возрастает.

Оценка количества CD45RA<sup>+</sup>-клеток (В-лимфоциты) при воздействии токсиканта показала, что

на 3 сутки их число в паренхиме печени уменьшается в 10 раз по сравнению с показателями интактной группы, а на 7 сутки – в 8 раз (рис. 5).

Результат иммуногистохимического анализа показал, что на 7 сутки после внутрибрюшинного введения CCl<sub>4</sub> в ткани тимуса количество CD45RA<sup>+</sup> достоверно возрастает на 36% относительно показателей группы CCl<sub>4</sub> 3 сутки (рис. 5). При количественной оценке CD3<sup>+</sup>-клеток в ткани тимуса достоверных различий не было выявлено.

В селезенке, в ранние сроки после воздействия токсиканта отмечается увеличение количества CD3<sup>+</sup>-клеток на 35% (рис. 4) по сравнению с показателями здоровых животных. К 7 и 14 сутки, количество Т-лимфоцитов уменьшается, однако достоверных различий не обнаружено.

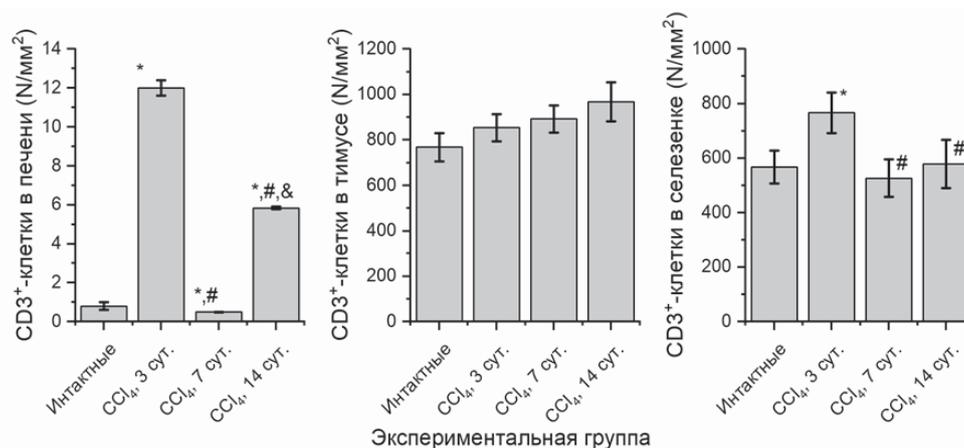
На основании данных иммуногистохимического окрашивания можно заключить, что токсическое повреждение, вызванное CCl<sub>4</sub>, приводит к увеличению популяции CD3<sup>+</sup> клеток в печени и селезенке, в то время как в тимусе преобладают CD45RA<sup>+</sup>-клетки.

Наряду с лимфоцитами важная роль в регуляции воспалительной реакции и процессов регенерации принадлежит макрофагам. В ранние сроки диффузного токсического повреждения

**Таблица 2. Показатели белой крови экспериментальных животных в динамике токсического повреждения**

Показатель \ Группа	Интактная	CCl <sub>4</sub> , 3 сутки	CCl <sub>4</sub> , 7 сутки	CCl <sub>4</sub> , 14 сутки
Лейкоциты, г/л	10,36 ± 0,88	22,26 ± 2,98 *	23,28 ± 4,67 *	21,24 ± 5,09 *
Лимфоциты, г/л	6,64 ± 0,58	13,08 ± 2,17 *	18,8 ± 9,52	13,52 ± 3,94 *
Моноциты, г/л	0,96 ± 0,12	3,26 ± 1,66	3,48 ± 1,11 *	6,72 ± 1,17 *, #

Примечание: статистически значимые различия с интактной группой (\*, p<0,05) и с группой CCl<sub>4</sub> 3 сутки (#, p<0,05).



**Рис. 4. Т-лимфоциты в печени и органах иммунопоэза в норме и при токсической повреждении**

Примечание: статистически значимые различия с интактной группой (\*, p<0,05), с группой CCl<sub>4</sub> 3 сутки (#, p<0,05), с группой CCl<sub>4</sub> 7 сутки (&, p<0,05).

в ткани печени отмечается увеличение числа макрофагов на 56,7% (рис. 6) по сравнению с показателями здоровых животных. В более поздние сроки эксперимента количество макрофагов в печени резко снижается (рис. 6), что вероятно связано с высокой функциональной нагрузкой, с необходимостью нейтрализации токсиканта и образующихся метаболитов.

В тимусе на 3 сутки после воздействия  $CCl_4$  зафиксировано увеличение количества макрофагов на 21% относительно показателей интактной группы (рис. 6). В более отдаленные сроки, к 14 суткам, количество макрофагов поддерживается на достаточно высоком уровне.

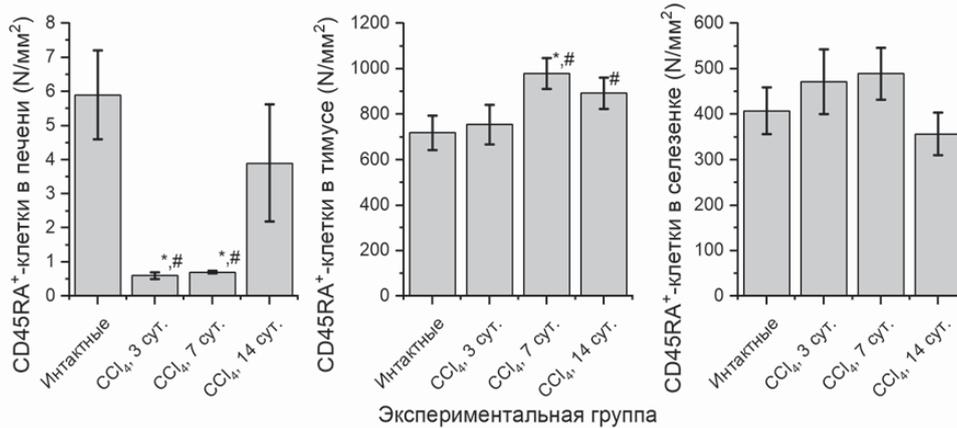
В селезенке в ответ на действие токсиканта на 3 и 7 сутки количество  $F4/80^+$  клеток возрастает на 19,3% и 28,5% (рис. 6). К 14 суткам эксперимента количество  $F4/80^+$  существенно снижается.

Повышенное количество макрофагов в печени и селезенке поддерживается только на ранних этапах после введения токсиканта (рис. 7), тогда как в тимусе данная тенденция наблюдается на 14 сутки.

Важная роль в поддержании иммунного гомеостаза в условиях физиологической нормы и при повышенной ксенобиотической нагрузке на организм принадлежит HSP70 [13]. В рамках данного исследования была проведена оценка количества  $HSP70^+$ -клеток в печени, тимусе и селезенке (рис. 8).

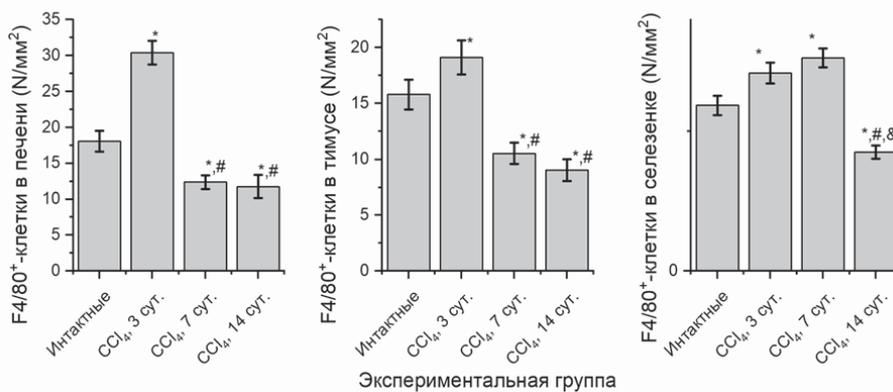
Установлено, что в ответ на внутрибрюшинное введение  $CCl_4$  на 3 сутки относительно показателей интактной группы, в ткани печени и тимуса отмечается увеличение количества  $HSP70^+$ -клеток приблизительно в 2 раза, при этом в селезенке их число возрастает в 7 раз (рис. 9).

Согласно литературным данным, HSP 70 выполняет цитопротекторную функцию при по-



**Рис. 5. В-лимфоциты в печени и органах иммунопоэза в норме и при токсической повреждении**

Примечание: статистически значимые различия с интактной группой (\*,  $p < 0,05$ ), с группой  $CCl_4$  3 сутки (#,  $p < 0,05$ ), с группой  $CCl_4$  7 сутки (&,  $p < 0,05$ ).



**Рис. 6. Макрофаги в печени и органах иммунопоэза в норме и при токсической повреждении**

Примечание: статистически значимые различия с интактной группой (\*,  $p < 0,05$ ), с группой  $CCl_4$  3 сутки (#,  $p < 0,05$ ), с группой  $CCl_4$  7 сутки (&,  $p < 0,05$ ).

вреждении тканей, является компонентом острой фазы воспаления и способствует привлечению фагоцитов и других воспалительных эффекторных клеток в очаг повреждения, стимулирует их активацию и / или обеспечивает эффероцитоз поврежденных клеток [13, 14]. В более отдаленные

сроки исследования, на 7 и 14 сутки, в органах иммунопоэза количество HSP70<sup>+</sup>-клеток снижается относительно показателей группы CCl<sub>4</sub> 3 сутки, но остается существенно выше уровня интактных (рис. 9), в то время как в печени достоверных изменений данного параметра выявлено не было.

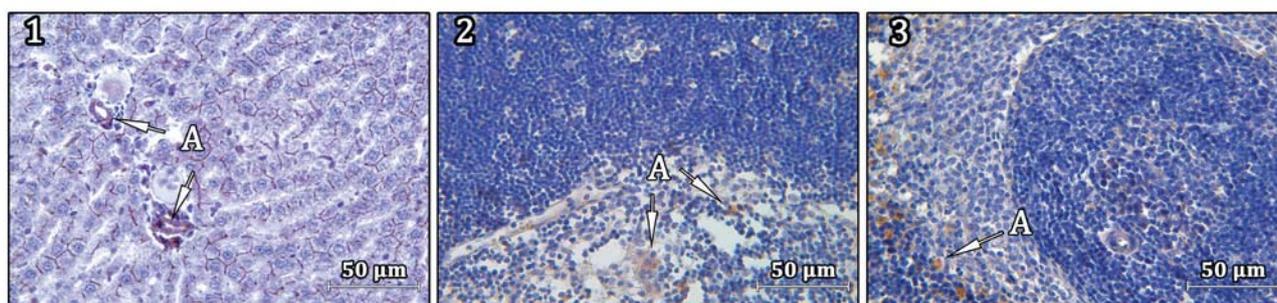


Рис. 7. F4/80<sup>+</sup>-клетки (A) в ткани печени (1), тимуса (2) и селезенки (3) на 3 сутки после внутрибрюшинного введения CCl<sub>4</sub>; иммуногистохимическое окрашивание, ув. 400х.

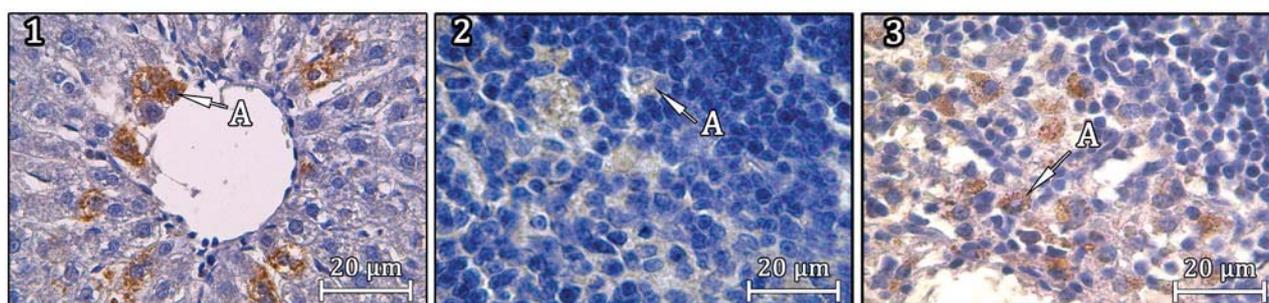


Рис. 8. HSP70<sup>+</sup>-клетки (A) в ткани печени (1), тимуса (2) и селезенки (3) на 3 сутки после внутрибрюшинного введения CCl<sub>4</sub>; иммуногистохимическое окрашивание, ув. 1000х.

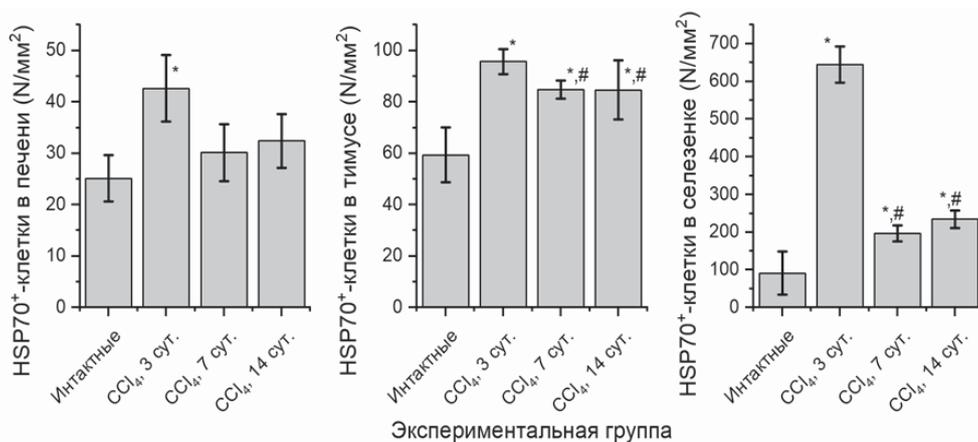


Рис. 9. Количество HSP70<sup>+</sup>-клеток в печени и органах иммунопоэза в норме и при токсическом повреждении CCl<sub>4</sub>

Примечание: статистически значимые различия с интактной группой (\*, p<0,05), с группой CCl<sub>4</sub> 3 сутки (#, p<0,05), с группой CCl<sub>4</sub> 7 сутки (&, p<0,05).

## Выводы

1. Гепатотропный яд  $\text{CCl}_4$  вызывает повреждение не только печени, но и органов иммунопоза. В тимусе отмечается уменьшение площади мозгового вещества, а в селезенке сокращение площади белой пульпы.
2. После внутривенного введения  $\text{CCl}_4$  развивается острая воспалительная реакция, которая выражается в увеличении количества лимфоцитов и моноцитов как в крови, так и в ткани печени, тимуса и селезенки.
3. На ранних сроках воздействия токсиканта в печени и селезенке преобладающей популяцией являются Т-лимфоциты ( $\text{CD3}^+$ -клетки), тогда как в тимусе – В-лимфоциты ( $\text{CD45RA}^+$ -клетки). Существенное снижение макрофагальной инфильтрации в исследуемых органах, по мере увеличения срока эксперимента, свидетельствует о том, что данный тип клеток является мишенью токсического воздействия.

двух органов, по мере увеличения срока эксперимента, свидетельствует о том, что данный тип клеток является мишенью токсического воздействия.

4. Увеличение количества  $\text{HSP70}^+$ -клеток в печени, тимусе и селезенке в ответ на токсическое повреждение вероятно направлено на запуск процессов репарации или элиминации токсичных для клетки денатурированных белков.

## Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90012 и бюджетной программы № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590107-0 с использованием оборудования ЦКП ИИФ УрО РАН.

## Литература

1. Мяделец О.Д., Лебедева Е.И. Функциональная морфология и элементы общей патологии печени: монография. Витебск: ВГМУ, 2018. 339 с.
2. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммуноксикология ксенобиотиков. Саратов, СВИБХБ. 2007. 420 с.
3. Andreeva L.I. Theoretical and applied value of 70 kDa heat shock proteins: the possible practical application and pharmacological correction. *Obzory Klin. Farmakol. Lek. Ter.* 2002; Vol. 1, № 2: 2–14.
4. Kurashova N.A., Madaeva I.M., Kolesnikova L.I. Expression of HSP70 Heat-Shock Proteins under Oxidative Stress. *Adv Gerontol.* 2020; Vol. 10: 20–25. DOI: 10.1134/S2079057020010099.
5. Beere H.M. The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci.* 2004; Vol. 117: 2641–2651.
6. Mansilla M. Jose, Costa C., Eixarch H. et. al. Hsp70 regulates immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *PloS one.* 2014; Vol. 9,8 e105737. DOI: 10.1371/journal.pone.0105737.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
8. Сатановская В. И., Пронько П. С., Гайшманова А. В. и др. Влияние пантенола и карнитина на ферменты обмена альдегидов в печени крыс, пораженных тетрахлорметаном. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2009; Т. 72, № 3: 39–40.
9. Муфазалова Н. А., Муфазалова Л. Ф., Мухаметзянова А. Я. Повреждающее воздействие тетрахлорметана на функциональное состояние мононуклеарных фагоцитов. *Международный научно-исследовательский журнал.* 2015; Vol. 2 (33), часть 4: 48–52.
10. Цыркунов М. В., Прокопчик Н. И., Андреев В. П. и др. Клиническая морфология печени: некрозы. *Журнал гродненского государственного медицинского университета.* 2017; Т. 15, № 5: 557–568. DOI: 10.25298/2221-8785-2017-15-5-557-568.
11. Цыркунов М. В., Андреев В. П., Прокопчик Н. И. и др. Клиническая морфология печени: цитотоксические лимфоциты. *Журнал гродненского государственного медицинского университета.* 2018; Т. 16, № 3: 343–349. DOI: 10.25298/2221-8785-2018-16-3-337-349.
12. O'Farrelly C., Crispe I. N. Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunology Today.* 1999; Vol. 20: 394–398. DOI: 10.1016/S0167-5699(99)01518-2.
13. Qu B., Jia Y., Liu Y. et. al. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones.* 2015; 20(6): 885–892. DOI: 10.1007/s12192-015-0618-8.
14. Merchant S., Korbelik M. Heat shock protein 70 is acute phase reactant: response elicited by tumor treatment with photodynamic therapy. *Cell Stress Chaperones.* 2011; 16(2): 153–162. DOI: 10.1007/s12192-010-0227-5.

## Сведения об авторах:

Шафигулина Злата Александровна – младший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН ИИФ УрО РАН, аспирант ФГАУ ВО Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики.  
Данилова Ирина Георгиевна – д. б. н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии ФГБУН ИИФ УрО РАН.  
Адрес для корреспонденции: Российская Федерация, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, д. 106. Тел. +7-952-138-01-57. E-mail: zлата\_pyankova@mail.ru

Поступила 23.12.2020 г.