

Исследования проведены на 28 самцах крыс линии Вистар (возраст 5-6 месяцев). ЭСД моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (SIGMA, США) в дозе 50 мг/кг. Для определения AIRE применялся метод двойной иммунофлюоресценции с применением моноклональных антител к AIRE, CD4-антигену и цитокератинам крысы. Анализ структуры тимуса проводили с помощью программного обеспечения, разработанного на основе макро-языка программирования VIDAS. Установлено, что количество AIRE+-клеток в корковом веществе тимуса контрольных животных в 2 раза ниже, чем в мозговом. При этом среди AIRE+-клеток идентифицируются не только эпителиоретикулоциты тимуса (AIRE+MAPC+), но и значительное число тимоцитов (AIRE+CD4+). Развитие ЭСД не сопровождалось изменениями количества AIRE+-клеток в коре тимуса, тогда как в мозговом веществе их плотность популяции снижалась на 35% по сравнению с контрольной группой животных. При этом концентрация белка AIRE у крыс с ЭСД достоверно снижалась по сравнению с контролем в AIRE+-клетках обеих изученных зон тимуса.

Ключевые слова: AIRE, тимус, сахарный диабет.

Стаття надійшла 20.02.2015 р.

Investigations were carried out on 28 male rats Vistar line 5-6 months of age. EDM was designed by intraperitoneal injection of streptozotocyn (SIGMA, USA) at dose 50 mg/kg one time. Method of double immunofluorescence with usage of rat monoclonal anti-AIRE, anti-CD4 and rat anticytokeratin antibodies was used for revelation of AIRE. Structure of a thymus was analyzed with the help of software VIDAS. Results are expressed as mean values \pm SEM. Differences were considered statistically significant if the p value was <0.05 . In summary, although the effects of AIRE on central tolerance are well established, the cellular and molecular mechanisms are still unclear. Along with the better-understood effects on TSA expression, AIRE can also alter the differentiation program of mTECs, regulate the expression of thymic chemokines, contribute to specific Treg induction, and induce mTEC apoptosis. This novel knowledge of normal and pathologic functions of the thymus constitutes a solid basis for the development of a novel type of tolerogenic/negative self-vaccination against type 1 diabetes (T1D).

Key words: AIRE, thymus, diabetes mellitus.

Рецензент Волошин М.А.

УДК 611.33.08: 612.017

С. С. Ключко, В. М. Свтушенко

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, м. Запоріжжя

РОЛЬ ЛІМФОЇДНОГО КОМПОНЕНТА У ФОРМУВАННІ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ШЛУНКА ЩУРІВ ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО ВВЕДЕННЯ АНТИГЕНА

З метою виявлення морфофункціональних змін стромальних клітин слизової оболонки шлунка щурів на тлі збільшення кількості PNA+-T-незрілих лімфоцитів після внутрішньоутробного введення антигена були досліджені 210 шлунків щурів лінії Wistar морфометричним, гістологічним та статистичним методами. Встановлено, що внутрішньоутробне антигенне навантаження призводить до зменшення кількості фібробластів на 35% у слизовій оболонці шлунка на тлі зростання вмісту PNA+-T-незрілих лімфоцитів на ранніх термінах спостереження (1 - 14 доба після народження). Це свідчить про те, що імунологічно незрілі T-лімфоцити змінюють морфологічну структуру сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки шлунка.

Ключові слова: шлунок, щури, фібробласти, PNA+-лімфоцити, антиген.

Згідно концепції А. М. Чернуха [5], аналіз адаптивних реакцій органу необхідно проводити з урахуванням змін наступних елементів: сполучної тканини, мікроциркуляторного русла, нервово-гуморального апарату, робочої частини органу. Сполучнотканинна строма являє собою третій рівень системи захисту слизової оболонки шлунка і дванадцятипалої кишки. Перші два - хімічний, представлений слизово-бікарбонатним буфером, і клітинний, утворений шаром покривного епітелію і формуючий бар'єр на шляху мікроорганізмів. Компоненти сполучної тканини визначають регуляцію, трофіку, контроль кінетики покривного епітелію, реакції неспецифічної і специфічної імунної захисту організму. Раніше авторами даної статті були отримані результати щодо збільшення кількості PNA+-T-незрілих лімфоцитів слизової оболонки шлунка з першої до чотирнадцятої доби постнатального періоду життя після внутрішньоутробного введення антигена [2]. Тому є актуальним дослідження компонентів сполучнотканинної строми на тлі змін у формуванні лімфоїдної тканини шлунка після внутрішньоутробної антигенної дії.

Метою роботи було дослідження морфофункціональних змін стромальних клітин слизової оболонки шлунка щурів на тлі збільшення кількості PNA+-T-незрілих лімфоцитів після внутрішньоутробного введення антигена.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження були шлунки 210 щурів лінії Вистар у віці від 1 до 90 доби постнатального розвитку. Дотримання морально-етичних норм при виконанні роботи підтверджено Комісією з питань біоетики Запорізького державного медичного університету (протокол № 7 від 22.05.2014 року). В експерименті використовували 5 груп тварин: перша - інтактні щури, друга і третя - експериментальні тварини, яким вводили антиген відповідно внутрішньоплідно та в навколоплідні води, четверта і п'ята група - контрольні, тваринам яких вводили фізіологічний розчин хлориду натрію відповідно внутрішньоплідно та в навколоплідні

води на 18 добу внутрішньоутробного розвитку. Залежно від строку експеримента (1, 3, 7, 14, 21, 45, 90 добу) щури кожної групи були розділені на 7 підгруп. У кожній підгрупі по 6 тварин. Як антиген була обрана спліт-вакцина для профілактики грипу інактивована Ваксігрип (Санофі Пастер С.А. Франція), яка є зареєстрованим фармакологічним препаратом (сертифікат про державну реєстрацію медичного імунологічного препарату № 6367-300200000 від 7 липня 2011). Вводили в кількості 0,0025 мг вакцини в 0,05 мл розчину (в розведенні 1:20 з фізіологічним розчином). Плодам контрольних груп вводили ізотонічний 0,9% розчин NaCl у дозі 0,05 мл. При роботі з експериментальними тваринами керувалися «Правилами використання лабораторних експериментальних тварин» (2006, додаток 4). Тварин виводили з експерименту шляхом передозування тіопенталовим наркозом. Методи дослідження: гістологічний, морфометричний, статистичний. Для морфологічного дослідження матеріал брали з фундальної частини шлунка, слизова оболонка якої вистлана одношаровим призматичним залозистим епітелієм. Шматочки матеріалу фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в батареї спиртів зростаючої концентрації, потім заливали у парафін і виготовляли серійні зрізи товщиною 4-5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном Караці та еозином. За фіброласти брали великі (18-30 мкм) неправильної форми клітини з великим об'ємом цитоплазми, що містять велике ажурне ядро з еухроматином і 1-2 ядерця. Вони мали слабобазофільне забарвлення цитоплазми з одним або декількома відростками. Підраховували їх середню кількість на умовній одиниці площі 100 мкм² в 10 полях зору трьох зрізів кожного шлунка при імерсійному збільшенні мікроскопа (об.100, ок.10) на світловому бінокулярному мікроскопі Granum.

Результати дослідження та їх обговорення Кількісний аналіз результатів морфометричного дослідження та статистичну обробку морфометричних даних проводили за допомогою стат. пакета ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5). Оцінювали правильність розподілу ознак за кожним із отриманих варіаційних рядів (всі вивчені мікрометричні параметри мали нормальний розподіл), середні значення за кожним показником, стандартні помилки та стандартні відхилення. Достовірність різниці значень між незалежними мікрометричними величинами визначали за парним двовибірковим критерієм Ст'юдента. Результати дослідження та їх обговорення. В інтактній групі на першу добу життя середня кількість фіброластів складала $2,51 \pm 0,13$ у полі зору. У тварин 1-ої доби життя в групі з внутрішньоплідним введенням антигена кількість фіброластів була менше порівняно з тваринами інтактної груп на 22%, а у групі з введенням антигена до навколоплідних вод - менше на 35% та становила відповідно $1,96 \pm 0,04$ і $1,63 \pm 0,02$ у полі зору. Фіброласти мали веретеноподібну, іноді відросчату форму, овальне ядро з 1-2 ядерцями. У тварин 3-ої доби життя кількість фіброластів у групі з внутрішньоплідним введенням антигена менше порівняно з тваринами інтактної групи на 5%, а у тварин з введенням антигена до навколоплідних вод – менше на 6% та становила відповідно $3,15 \pm 0,01$ та $3,11 \pm 0,02$ у полі зору. В інтактній групі на сьому добу після народження середня кількість фіброластів складала $11,7 \pm 0,12$ у полі зору. У групі з внутрішньоплідним введенням антигена їх кількість менша порівняно з тваринами інтактної групи на 13%, а у групі з введенням антигена до навколоплідних вод - менша на 11% та становила відповідно $10,2 \pm 0,13$ і $10,4 \pm 0,12$ у полі зору. У тварин 14-ої доби життя кількість фіброластів у групі з внутрішньоплідним введенням антигена більше порівняно з тваринами інтактної груп на 3%, а у групі з введенням антигена у навколоплідні води - більше на 6% та становила відповідно $2,53 \pm 0,06$ і $2,60 \pm 0,09$ у полі зору. На 21-шу добу постнатального онтогенеза збільшувалась кількість лімфоїдних утворень, що знаходяться у власній пластинці слизової оболонки шлунка навколо кровоносних судин, а також навколо залоз та поверхнево-ямкового епітелію. Лімфоїдні структури виявлялися у вигляді дифузних скупчень. В клітинному складі виявлялись не тільки малі, а й середні і великі лімфоцити, а також макрофаги, плазмочити та фіброласти. Кількість лімфоїдних утворень збільшувалась порівняно з попереднім терміном спостереження. В інтактній групі на 21-шу добу життя середня кількість фіброластів складала $5,40 \pm 0,28$ у полі зору. У групі з внутрішньоплідним введенням антигена їх кількість більше порівняно з тваринами інтактної групи на 5%, а у групі з введенням антигена у навколоплідні води – більше на 2% і становила відповідно $5,70 \pm 0,06$ та $5,53 \pm 0,09$ у полі зору. У тварин 45-ту добу життя кількість фіброластів в групі з внутрішньоплідним введенням антигена менше порівняно з тваринами інтактної групи на 12%, а в групі з введенням антигена в навколоплідні води - менше на 8% і становила відповідно $6,08 \pm 0,15$ та $6,28 \pm 0,12$ в полі зору. У тварин інтактної та контрольної груп на 90-ту добу життя кількість фіброластів в слизовій оболонці шлунка щурів статистично достовірно не відрізнялась. В інтактній групі середня кількість фіброластів складала $9,80 \pm 0,21$ у полі зору. У тварин 90-ої

доби життя кількість фібробластів у групі з внутрішньоплідним введенням антигену не змінилась в порівнянні з тваринами інтактною групи, а у групі з введенням антигену у навколоплідні води - стала більше на 1% ($9,90 \pm 0,18$ клітин у полі зору). Основна маса цих клітин розташовувалась по периферії лімфоїдних утворень слизової оболонки шлунка та перебувала поблизу залозистих відділів та м'язових пучків, мала овальну або відросчасту форму, контактувала з клітинами лімфоїдного ряду. На тлі збільшення кількості популяції PNA⁺-Т-незрілих лімфоцитів в експериментальних групах тварин виявлено зменшення кількості фібробластів в слизовій оболонці шлунка на ранніх термінах спостереження (1 - 14 доба після народження) в порівнянні з тваринами інтактною групи. Причому найбільш виражені зміни спостерігалися в групі з внутрішньоплідним введенням антигену. Встановлена закономірність розкриває вплив імунологічно незрілих Т-лімфоцитів на морфологічну структуру сполучної тканини власної пластинки слизової оболонки шлунка. Отримані дані збігаються з результатами, представленими в роботах ряду вчених відносно прямої кишки, передміхурової залози, легень, товстого кишечника [1, 3, 4].

Висновок

Таким чином, зменшення кількості фібробластів слизової оболонки шлунка внаслідок пренатальної дії антигену дає підставу стверджувати, що внутрішньоутробне антигенне навантаження може впливати на стан компонентів сполучної тканини шлунка опосередковано через дію на неї імунологічно незрілих Т-лімфоцитів.

Перспективи подальших розробок. В подальшому планується дослідження особливого пулу стромальних клітин слизової оболонки шлунка - міофібробластів за допомогою імуногістохімічного методу на тлі збільшеного антигенного навантаження у пренатальний період онтогенеза.

Список літератури

1. Евтушенко В. М. Реактивные особенности лимфоидной популяции соединительной ткани предстательной железы после антигенного воздействия / В. М. Евтушенко, В. К. Сырцов // Запор. мед. журн. – 2004. - № 4 (25). – С. 114 – 115.
2. Ключко С. С. Особенности распределения рецепторов к лектину арахиса (PNA) в желудке крыс / С. С. Ключко, В. М. Евтушенко // – Запоріжжя, - 2013. – С. 73 - 74.
3. Сырцов В. К. Закономерности вариабельности лимфоидных структур периферического звена иммунной системы / В. К. Сырцов, В. М. Евтушенко, С. П. Ковалев [и др.] // Вісник проблем біології та медицини. – 2003. – Вип. 3. – С. 87 – 88.
4. Сырцов В. К. Развитие эпителиальных и лимфоидных структур гортани человека в пренатальном периоде онтогенеза / В. К. Сырцов, Е. И. Потоцкая // Запор. мед. журн. – 2005. - № 5 (32). – С. 15 – 16.
5. Сырцов В. К. Концепция антигенно-структурного гомеостаза и проблема гистогенеза / В. К. Сырцов, О. В. Федосеева, Е. И. Потоцкая [и др.] // Світ медицини та біології. – 2006. - № 2. – С. 120-124.

Реферати

РОЛЬ ЛИМФОИДНОЙ КОМПОНЕНТА В ФОРМИРОВАНИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ЖЕЛУДКА КРЫС ПОСЛЕ ВНУТРИУТРОБНОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНА

Ключко С. С., Евтушенко В. М.

Роль лимфоидного компонента в формировании соединительной ткани желудка крыс после внутриутробного введения антигена. С целью выявления морфофункциональных изменений стромальных клеток слизистой оболочки желудка крыс на фоне увеличения количества PNA⁺-Т-незрелых лимфоцитов после внутриутробного введения антигена были исследованы 210 желудков крыс линии Wistar морфометрическим, гистологическим и статистическим методами. Установлено, что внутриутробное введение антигена приводит к уменьшению количества фибробластов на 35% в слизистой оболочке желудка на фоне увеличения содержания PNA⁺-Т-незрелых лимфоцитов на ранних терминах наблюдения (1 - 14 сутки после рождения). Это свидетельствует о том, что иммунологически незрелые Т-лимфоциты изменяют морфологическую структуру соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки желудка.

Ключевые слова: желудок, крысы, фибробласты, PNA⁺-лимфоциты, антиген.

ROLE OF LYMPHOID COMPONENT IN THE FORMATION OF CONNECTIVE TISSUE STOMACH OF RATS AFTER INTRAUTERINE INTRODUCTION OF ANTIGEN

Kluchko S. S., Evtushenko V. M.

The role of lymphoid component in formation of connective tissue of rats'stomach after antenatal antigen administration. In order to identify morphological and functional changes in the stromal cells of the gastric mucosa of rats against the background of increasing the number of PNA⁺-T-lymphocytes immature after intrauterine administration of antigen were examined 210 stomachs of Wistar rats morphometric, histological and statistical methods. It was established that intrafetal administration of an antigen leads to a reduction in the number of fibroblasts by 35% in the gastric mucosa against the background of increasing the content of PNA⁺-T-lymphocytes immature early terms of observation (1 - 14 days after birth). This demonstrates that immunologically immature T-lymphocytes alter the morphological structure of the connective tissue of the lamina propria of the gastric mucosa.

Key words: stomach, rats, fibroblasts, PNA⁺-lymphocytes, antigen.

Стаття надійшла 1.03.2015 р.

Рецензент Білаш С.М.