

## УЧАСТЬ АНТИГЕНПРЕЗЕНТУЮЧИХ КЛІТИН В РЕАКЦІЇ ТИМУСА НА ІШЕМІЮ-РЕПЕРFUЗІЮ ГОЛОВНОГО МОЗКУ В ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

©О.В. Ткачук

*Буковинський державний медичний університет, Чернівці*

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено реакцію антигенпрезентуючих клітин тимуса на ішемічно-реперфузійне пошкодження головного мозку в щурів-самців із цукровим діабетом. Встановлено, що на 12 добу після ішемії-реперфузії головного мозку у тварин контрольної групи зменшуються щільність МНС-II<sup>+</sup>-макрофагів, МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів та МНС-II<sup>+</sup>-дендритних клітин, а у тварин із цукровим діабетом зростає щільність МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів. Цукровий діабет та ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних щурів і тварин із діабетом підвищують щільність МНС-II-рецепторів макрофагів, В-лімфоцитів та дендритних клітин у тимусі.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** стрептозотоциніндукований діабет, ішемія-реперфузія головного мозку, тимус, антигенпрезентуючі клітини.

**Вступ.** Згідно з більшістю сучасних досліджень цукровий діабет 1 типу вважається багатофакторним автоімунним захворюванням, що призводить до численних системних уражень нервової та ендокринної систем, внутрішніх органів, метаболічних та імунорегуляторних порушень, більшість з яких лежить в основі обтяження перебігу цереброваскулярної патології [1, 2, 3]. У свою чергу, порушення церебрального кровообігу та інсульту внаслідок порушення проникності гематоенцефалічного бар'єра призводять до зростання в крові рівня нейроантитіл [4, 5]. Така активація автоімунних механізмів у подальшому, залежно від обширності ішемії, стає причиною формування хронічного деструктивного процесу в мозку або вогнищевого інфаркту [5, 6]. Тому цілком природно очікувати, що поєднання двох патологічних станів із наявністю автоімунних компонентів має особливості патогенезу, які необхідно враховувати при проведенні відповідних терапевтичних заходів. Формування центральної автотолерантності забезпечується делецією в тимусі Т-клітин, антигенспецифічні рецептори яких мають високу спорідненість до власних антигенів [7, 8]. Показано, що одним із механізмів порушення автотолерантності при експериментальному цукровому діабеті є порушення презентації в тимусі панкреатичних антигенів [9, 10]. Тому цілком ймовірно, що надмірний вихід при ішемії-реперфузії нейроспецифічних білків може поглибити порушення негативної селекції тимоцитів, опосередковане антигенпрезентувальними клітинами (АПК), притаманні цукровому діабету. Негативна селекція не потребує участі спеціалізованих антигенпрезентуючих клітин. Зазвичай, це функція дендритних клітин тимуса чи макрофагів, локалізованих переважно в ділянці переходу кіркової зони в мозкову [11]. Вони несуть на своїй поверхні значну кількість молекул МНС класів I і

II, забезпечуючи тим самим зв'язування Т-клітин, які мають високу авідність до власних пептидів.

**Мета дослідження** – вивчити реакцію антигенпрезентуючих клітин тимуса на неповну глобальну ішемію головного мозку в щурів зі стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом.

**Матеріал і методи дослідження.** Із метою створення умов, необхідних для формування діабетичної енцефалопатії та ангіопатії (підтверджених морфологічно), у дослід брали тварин із чотиримісячним цукровим діабетом. Для цього цукровий діабет моделювали в білих нелінійних самців-щурів віком два місяці шляхом однократного внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (Sigma, США, 60 мг/кг маси тіла) [10]. У дослід брали щурів із рівнем глікемії вище 10 ммоль/л. По досягненні тваринами шестимісячного віку в частини щурів контрольної та дослідної груп моделювали 20-хвилинну неповну глобальну ішемію головного мозку двобічним кліпсуванням загальних сонних артерій із наступною реперфузією [12]. Контрольні групи формували з щурів без та з цукровим діабетом, у котрих сепарували сонні артерії, подразнювали їх стінку без припинення кровотоку. Тварин виводили з експерименту на 12 добу після моделювання ішемії декапітацією під наркозом. Тимус 18 год фіксували в розчині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін, готували серійні зрізи товщиною 5 мкм, здійснювали депарафінацію, регідратацію та відмивання в 0,1 М фосфатному буфері. АПК тимуса ідентифікували імуноцитофлуоресцентним методом виявлення експресії молекул головного комплексу гістосумісності II класу (МНС-II). Для виявлення МНС-II застосовували метод прямої імунофлуоресценції. Із цією метою регідровані, випадково обрані гістологічні зрізи залози, протягом 18 год інкубували (T= 4 °C) з моноклональними антитілами мишей (клон ОХ6, ізотип IgG1)

до МНС-II-антигену щура, кон'югованими з FITC (антитіла виробництва Beckman Coulter, США). Після інкубації зрізи відмивали в 0,1 М фосфатному буфері та заключали в суміш гліцерину й фосфатного буфера (9:1) для наступної люмінесцентної мікроскопії на флуоресцентному мікроскопі AXIOSKOP. Оскільки вивчені нами АПК в основній масі були сконцентровані на межі кіркової та мозкової зон тимуса, дослідження проведено в зрізах цієї ділянки залози. Класифікаційний математичний аналіз показав наявність трьох груп МНС-II – імунопозитивних (МНС-II<sup>+</sup>) клітин тимуса, які відрізнялися за інтенсивністю флуоресценції, морфометричними параметрами: МНС-II<sup>+</sup>-макрофаги, МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцити, МНС-II<sup>+</sup>-дендритні клітини. Зображення вводили в комп'ютерну систему цифрового аналізу VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) [10, 13]. Статистичну значимість відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента для незалежних вибірок. Дані представлені у вигляді середніх арифметичних та стандартного відхилення.

**Результати й обговорення.** Антигенпрезентуючі клітини – це досить гетерогенна популяція клітин організму. У тимусі вони головним чином представлені В-лімфоцитами, макрофагами та дендритними клітинами [11, 13, 14]. Дослідження показали, що в кірковій речовині тимуса тварин усіх експериментальних груп кількісно переважали МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцити. У тварин контрольної групи ішемія-реперфузія головного мозку зменшила сумарну кількість МНС-II<sup>+</sup>-клітин в 1,95 раза за рахунок зменшення МНС-II<sup>+</sup>- макрофагів, МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів та МНС-II<sup>+</sup>-дендритних клітин у 2,4, 2,0, 1,4 раза відповідно (табл. 1). Такий же вплив справляв і цукровий діабет – сумарна щільність МНС-II<sup>+</sup>-клітин знизилася в 1,6 раза, МНС-II<sup>+</sup>- макрофагів,

МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів та МНС-II<sup>+</sup>-дендритних клітин – в 1,6, 1,7, 1,4 раза відповідно. Однак ішемія мозку в цієї групи тварин призвела до зростання сумарної щільності АПК в 1,2 раза за рахунок МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів.

Це може пояснюватися зростанням кількості автоантигенів за поєднаної дії цих двох патологічних станів і відображати зміни тимічної селекції лімфоцитів, одним із провідних факторів якої є порушення програми апоптозу. Слід зазначити, що як у контролі, так і за всіх експериментальних втручань, серед досліджених АПК переважають В-лімфоцити. Високий вміст В-лімфоцитів у тимусі є характерною ознакою розвитку аутоімунних процесів і може іноді супроводжуватися утворенням у залозі лімфоїдних фолікулів [10, 13]. Вивчення щільності МНС-II-рецепторів на клітинній мембрані за інтенсивністю їх флуоресценції показало, що даний показник у тварин як контрольної, так і всіх експериментальних груп є найвищим у макрофагів, дещо нижчим – у дендритних клітин і найнижчим – у В-лімфоцитів (табл. 2). У контрольних щурів на 12 добу після ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку виявлено зростання щільності МНС-II-рецепторів усіх видів АПК в 1,1 раза, що відображає їх рівномірну участь у розвитку імунологічних реакцій на дане втручання.

Достовірного зростання щільність рецепторів усіх АПК зазнала й у тварин із цукровим діабетом, однак кількісно воно було менш значимим. Ішемія-реперфузія мозку у тварин даної групи спричинила на 12 добу зростання щільності рецепторів макрофагів, В-лімфоцитів та дендритних клітин в 1,2, 1,1, 1,1 раза відповідно. Таким чином, складається враження, що й у контрольних щурів, й у тварин із діабетом роль усіх досліджених АПК в реакції на ішемічно-ре-

Таблиця 1. Щільність популяції МНС-II<sup>+</sup>-клітин (на 1 мм<sup>2</sup> площі зрізу) та їх відсоткове співвідношення в тимусі щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M ± m)

Група спостереження	Сумарна щільність МНС-II <sup>+</sup> -клітин	МНС-II <sup>+</sup> -макрофаги	МНС-II <sup>+</sup> -В-лімфоцити	МНС-II <sup>+</sup> -дендритні клітини
Контроль	60,6±3,32	<u>10,2±0,78</u> 19,5±1,21	<u>42,6±2,58</u> 66,8±1,41	<u>7,86±0,64</u> 13,6±0,93
Ішемія-реперфузія	31±1,89*	<u>4,22±0,37*</u> 16,6±1,42	<u>21,3±1,41*</u> 47,8±3,17*	<u>5,40±0,46*</u> 18,3±1,33*
Діабет	37,2±2,83*	<u>6,40±0,63*</u> 20,0±1,50	<u>25,3±1,14*</u> 64,3±1,63	<u>5,45±0,55*</u> 16,1±1,32
Діабет та ішемія-реперфузія	43,8±2,61 <sup>#</sup>	<u>6,95±0,55<sup>^</sup></u> 20,1±1,41 <sup>^</sup>	<u>30,2±1,99<sup>#</sup></u> 64,1±1,65 <sup>^</sup>	<u>6,66±0,59</u> 15,4±1,15

Примітка. У чисельнику – щільність МНС-II<sup>+</sup> на 1 мм<sup>2</sup> загруднинної залози; у знаменнику – відсоткова частка окремих класів МНС-II<sup>+</sup>- клітин; вірогідність змін щодо показників: \* – у контрольних тварин; ^ – у контрольних тварин з ішемією-реперфузією головного мозку; # – у тварин із цукровим діабетом.

Таблиця 2. Щільність МНС-II<sup>+</sup>-рецепторів (E<sub>иФ</sub>) в тимусі щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом, ускладненим ішемічно-реперфузійним пошкодженням головного мозку (M±m)

Група спостереження	МНС-II <sup>+</sup> -макрофаги	МНС-II <sup>+</sup> -В-лімфоцити	МНС-II <sup>+</sup> -дендритні клітини
Контроль	0,871±0,008	0,713±0,004	0,776±0,009
Ішемія-реперфузія	0,938±0,017*	0,764±0,007*	0,840±0,015*
Діабет	0,887±0,010	0,731±0,005*	0,828±0,010
Діабет та ішемія-реперфузія	1,06±0,010 <sup>#</sup>	0,814±0,007 <sup>#</sup>	0,888±0,016 <sup>#</sup>

Примітка. Вірогідність змін щодо показників: \* – у контрольних тварин; # – у тварин із цукровим діабетом.

перфузійне пошкодження головного мозку рівнозначна. Привертає увагу стала залежність між зниженням кількості МНС-II<sup>+</sup>- макрофагів, МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів та МНС-II<sup>+</sup>-дендритних клітин і зростанням щільності їх рецепторів у тварин із цукровим діабетом та контрольних щурів після ішемії-реперфузії мозку, тоді як після ішемії-реперфузії на тлі цукрового діабету має місце паралельне зростання обох показників.

**Висновки.** 1. Чотиримісячний цукровий діабет та ішемія-реперфузія головного мозку у тварин контрольної групи зменшують сумарну щільність МНС-II<sup>+</sup>-клітин за рахунок МНС-II<sup>+</sup>-макрофагів, МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів та МНС-II<sup>+</sup>-дендритних клітин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Зайчик А. М. Молекулярно-біологічне основи порушений гуморальної регуляції при сахарном діабеті / А. М. Зайчик // Мед. акад. журн. – 2008. – Т. 8, № 1. – С. 127–138.

2. Иммунологические особенности органоспецифических аутоиммунных эндокринных заболеваний / Е. А. Селиванов, Т. В. Глазанова, Л. Н. Бубнова, В. И. Мазуров // Мед. акад. журн. – 2008. – Т. 8, № 1. – С. 237–242.

3. Интерлейкины и хемокины при остром ишемическом инсульте, отягощенном и не отягощенном диабетом / А. С. Бояджян, Э. А. Аракуелова, В. А. Айвазян, Л. А. Манукян // Цитокины и воспаление. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 40–43.

4. Прогностическое значение маркеров воспаления и аутоантител к нейроспецифическим антигенам у больных с острым ишемическим инсультом / Н. Ю. Рулева, П. Р. Камчатнов, Т. К. Люкова [и др.] // Аллергол. и иммунология. – 2004. – Т. 5, № 1. – С. 211.

5. Цимбалюк В. И. Роль некоторых нейроиммунных и сосудистых факторов при ишемических повреждениях головного мозга / В. И. Цимбалюк, М. С. Бровченко // Укр. мед. часопис. – 2005. – № 4(48). – С. 25–28.

6. Аутоиммунные механизмы при ишемии / Н. Константинова, В. И. Скворцова, И. Еремин [и др.] // Аллергол. и иммунология. – 2005. – Т. 6, № 2. – С. 147–149.

7. Kyewski B. Central role for central tolerance / V. Kyewski, L. Klein // Ann. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 24. – P. 571–606.

2. На 12 добу після ішемічно-реперфузійного пошкодження головного мозку у тварин із цукровим діабетом зростає щільність МНС-II<sup>+</sup>-В-лімфоцитів.

3. Цукровий діабет та ішемія-реперфузія головного мозку в контрольних щурів і тварин із діабетом підвищують щільність МНС-II-рецепторів макрофагів, В-лімфоцитів та дендритних клітин у тимусі.

**Перспективи подальших досліджень.** У подальшому планується дослідити морфометричні параметри антигенпрезентуючих клітин тимуса у щурів із поєднаним впливом цукрового діабету та ішемії-реперфузії головного мозку.

8. Pugliese A. Central and peripheral autoantigen presentation in immune tolerance / A. Pugliese // Immunology. – 2004. – Vol. 111. – P. 138–146.

9. Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs / A. Pugliese, D. Brown, D. Garza [et al.] // J. Clin. Invest. – 2001. – Vol. 107. – P. 555–564.

10. Колесник Ю. М. Влияние экспериментального сахарного диабета на морфофункциональное состояние антигенпредставляющих клеток тимуса / Ю. М. Колесник, А. М. Камышный, А. В. Абрамов // Запорож. мед. журн. – 2006. – № 5. – С. 6–9.

11. Ройт Ф. Иммунология / Ройт Ф. М., Бростофф Дж., Мейл Д.; пер. с англ. В. И. Кандрора, А. Н. Маца, Л. А. Певницкого, М. А. Серовой. – Москва: Мир, 2000. – 582 с.

12. Скибо Г. Н. Использование различных экспериментальных моделей для изучения клеточных механизмов ишемического поражения мозга / Г. Н. Скибо // Патология. – 2004. – Т. 1, № 1. – С. 22–30.

13. Камышный А. М. Влияние экспериментального сахарного диабета на процессы дифференцировки лимфоцитов в тимусе у крыс со спонтанной гипертензией / А. М. Камышный // Вісник морфології. – 2007. – № 13(1). – С. 48–52.

14. Geenen V., Brilot F. Role the thymus in the development of tolerance and autoimmunity towards the neuroendocrine system / V. Geenen, F. Brilot // Ann.N.Y.Acad. Sci. – 2003. – Vol. 992. – P. 186–195.

**PARTICIPATION OF ANTIGEN-PRESENTING CELLS IN THYMUS REACTION ON THE  
BRAIN ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED  
DIABETES MELLITUS**

**O.V. Tkachuk**

*Bukovynian State Medical University, Chernivtsi*

SUMMARY. The reaction of thymus antigen-presenting cells on the brain ischemia-reperfusion injury in male rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus has been investigated. It has been demonstrated that on the twelfth day after the brain ischemia-reperfusion the density of MHC-II<sup>+</sup>-macrophages, MHC-II<sup>+</sup>-B-lymphocytes and MHC-II<sup>+</sup>-dendritic cells decreases in control group while number of MHC-II<sup>+</sup> B-lymphocytes increases in diabetic animals. The density of MHC-II receptors of macrophages, B-lymphocytes and dendritic cells increases in thymus under the influence of diabetes mellitus, brain ischemia-reperfusion or combination of these two pathologies.

KEY WORDS: streptozotocin-induced diabetes mellitus, brain ischemia-reperfusion, thymus, antigen-presenting cells.