

УДК 616-076:577.112] : [612.176+[579.61:616.34]] – 092.9

І. О. Топол
О. М. Камишиний

Запорізький державний медичний
університет

ВИВЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ Т-РЕГУЛЯТОРНИХ КЛІТИН В УМОВАХ СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ І ПРИ МОДУЛЯЦІЇ СКЛАДУ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ

Ключові слова: стрес, Т-регуляторні клітини, пробіотики, антибіотики.

Резюме. Досліджено вплив хронічного соціального стресу (ХСС) і модуляції складу кишкової мікрофлори на розподіл CD25+Foxp3+-клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів. Встановлено, що розвиток ХСС призводить до зниження кількості CD25+Foxp3+-лімфоцитів, зростання щільності CD25-рецепторів на клітинній мембрані і зменшення концентрації Foxp3 в імунопозитивних клітинах. Уведення канаміцину не впливає на кількість CD25+Foxp3+-лімфоцитів і структуру їх популяції, тоді як лактобактерин сприяє підвищенню числа Т-reg клітин на 33-66 % ($p < 0,05$) при збільшенні в них концентрації білка Foxp3.

Вступ

Численні дослідження останніх років свідчать, що важливу роль у забезпеченні імунологічної автотолерантності й негативному контролі як патологічних, так і фізіологічних імунних реакцій відіграють супресорні Т-регуляторні клітини (Тreg) [1,3]. Елімінація або інактивація цих клітин викликає розвиток тяжких аутоімунних захворювань (АІЗ), а також призводить до посилення імунної відповіді на алоантигени і пухлинні клітини [1].

CD25 (α -ланцюг рецептора ІЛ-2, ІЛ-2R α) тривалий час вважався одним із характерних маркерів Тreg, однак він експресувався і на будь-яких інших Т-клітинах після їх активації. У 2003 р. був описаний ген, локалізований у хромосомі X, FOXP3 (fork head box P3), який контролює розвиток і функціонування Тreg-клітин у мишей, потім це було показано й для Тreg-клітин людини [3]. Продукт гена FOXP3, транскрипційний фактор Foxp3 (білок скурфін), у даний час вважається одним із найбільш специфічних внутрішньоклітинних маркерів для Тreg-клітин [3]. Експериментальна трансдукція Foxp3 в нерегуляторні Foxp3-CD25-CD4 "наївні" Т-клітини людини або мишей присвоює останнім функціональні властивості та фенотип Тreg, а за відсутності функціонального Foxp3 регуляторні Т-клітини не продукуються, і такі миші гинуть упродовж перших 3 тижнів життя від тяжких лімфопроліферативних порушень [3].

Основним місцем генерації індукційних Тreg-клітин (іТreg) є кишково-асоційована лімфоїдна тканина (КАЛТ). При цьому розвиток і функціональний стан КАЛТ залежить від складу кишкової мікрофлори [11]. Так, у гнотобіотичних тварин порушується

морфогенез і спостерігаються значні дефекти як вродженої, так й адаптивної ланок імунної системи, тобто кишкова мікробіота формує КАЛТ і регулює диференціювання окремих субпопуляцій Т-клітин, зокрема, Тreg, а зміни її складу здатні як спричиняти розвиток запальних та АІЗ, так і попереджувати їх розвиток [11]. Цікаво, що хронічний соціальний стрес (ХСС) здатен не тільки спричиняти зміни у функціонуванні КАЛТ, які проявляються дисбалансом прозапальних та регуляторних субпопуляцій Т-хелперів, а й змінюють склад кишкової мікрофлори [16].

Мета дослідження

Вивчити розподіл CD25+Foxp3+-експресуючих клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar в умовах ХСС і при модуляції складу кишкової мікрофлори антибіотиками й пробіотиками.

Матеріал і методи

Дослідження проводили на 70 самках щурів лінії Wistar, які були розділені на сім експериментальних груп: контрольні щури, яким перорально внутрішньошлунково (в/ш) упродовж 3-х тижнів вводили по 0,5 мл фізіологічного розчину (група 1); щури, яким моделювали ХСС 1 шляхом тритижневої соціальної ізоляції і тривалого психоемоційного впливу (ПЕВ), що припускав перманентне проживання самок в «агресивному середовищі», а саме - через перфоровану перегородку в клітці з агресивним самцем, який щодня вступав у конфронтації з підсадженим до нього іншим самцем [11] (група 2); щури, яким моделювали ХСС2 шля-

хом утримання тварин у перенаселених клітках (20 щурів на клітку) впродовж 3 тижнів із щоденною зміною угруповання, при якому піддослідну самку кожний день поміщали до нової збалансованої та перенаселеної колонії (група 3); щури з ХСС1 та ХСС2, яким здійснювали модуляцію складу кишкової мікрофлори шляхом в/ш уведень аміноглікозидного антибіотику *канаміцину* (*Can*) впродовж 7 діб щоденно, починаючи з 3-го тижня моделювання ХСС у дозі 15 мг/кг (групи 4 та 5 відповідно); щури з ХСС1 та ХСС2, яким здійснювали модуляцію складу кишкової мікрофлори шляхом в/ш щоденних уведень *Лактобактерину* (*Lb*, суміш живих ліофільно висушених лактобактерій *L.plantarum* штаму 8P-A3 і *L.fermentum* штаму 90T-C4) впродовж 3-х тижнів у дозі 4·10⁸ КУО (групи 6 та 7, відповідно). Рівень емоційно-поведінкової активності встановлювали в тесті «відкрите поле» згідно з вираженням дослідницької активності, у тесті Порсолта («вимушеного плавання», ВП) визначали рівень депресивності тварин. Щурів виводили з експерименту методом декапітації під наркозом.

Структуру популяції CD25+Foxp3+-клітин КАЛТ вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів та даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротацийному мікромомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, фіксованої за Буеном, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН = 7,4) і фарбували моноклональними антитілами (МКАТ) до CD25 та Foxp3 щура методом подвійної імуофлуоресценції. При цьому гістологічні зрізи інкубували одночасно з первинними кролячими МКАТ до Foxp3 щурів виробництва SantaCruzBiotechnology (США) та з мишачими МКАТ до CD25 щурів виробництва Caltag Laboratories (США), вже кон'югованими з FITC упродовж 18 годин у вологій камері при Т = 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин (Т = 37°C) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. В якості вторинних антитіл використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кроля, кон'югованих з TexasRed (SantaCruz Biotechnology, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером та поміщали в суміш гліцерину і фосфатного буферу (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (НИН, США). Зображення, які отримували на мікроскопі AXIOSKOP (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) або 595 нм (TexasRed), за допомогою високочутливої камери

AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакету програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводили в комп'ютер. При цьому в автоматичному режимі визначали ділянки зі статистично значущою флуоресценцією, характерною для лімфоїдних клітин, що експресують CD25 або Foxp3. Обчислювали морфометричні й денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. Накладання ідентичних знімків у комп'ютерній програмі дозволяло ідентифікувати клітини, які одночасно експресували CD25 та Foxp3 (CD25+Foxp3+). При фарбуванні МКАТ досліджували так звані заповнені лімфоцитами ворсинки (Lymphocyte-lled villi, LFV), які є окремим компартментом КАЛТ щурів та є скупченням лімфоїдних клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок. LFV можуть бути місцем інтенсивної активації наївних лімфоцитів і ранньої стадії формування ізольованих лімфоїдних вузликів. Усі одержані експериментальні дані обробляли на персональному комп'ютері пакетом прикладних і статистичних програм EXCEL з пакету MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001).

Обговорення результатів дослідження

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar показав, що сумарна щільність CD25+Foxp3+лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки LFV складала 115±8 на 1 мм² (табл.). Розвиток стресу супроводжувався зниженням сумарної щільності CD25+Foxp3+-лімфоцитів, більш вираженим у випадку ХСС2 (на 51,3%, р < 0,05). При цьому вивчення розподілу окремих класів клітин, ко-експресуючих CD25 і Foxp3, показало зниження щільності популяції (ЩП) CD25+Foxp3+-середніх лімфоцитів на 45-53% (р < 0,05) і CD25+Foxp3+-малих лімфоцитів на 37-60% (р < 0,05) порівняно з контролем при відносній стабільності їх відсоткової частки в структурі популяції (табл.). Характерно, що розвиток стресу супроводжувався достовірним збільшенням щільності CD25-рецепторів на клітинній мембрані у CD25+-лімфоцитах і CD25+-малих лімфоцитів, тоді як концентрація транскрипційного фактора Foxp3 знижувалась (найбільш інтенсивно – у Foxp3+ середніх лімфоцитів – на 26-30%, р < 0,05).

Уведення *Can* стресованим щурам не впливало на загальну кількість CD25+Foxp3+-лімфоцитів і структуру їх популяції в LFV (див. табл. 1), але призводило до достовірного збільшення концентрації білка Foxp3 і різноспрямованих змін щільності CD25-рецепторів імунопозитивних клітин. З іншого боку, при введенні *Lb* в умовах ХСС відзначалося підвищення сумарної щільності CD25+Foxp3+-лімфоцитів на 33-66% (р < 0,05) за рахунок збільшення, головним чином, ЩП CD25+

Таблиця

Кількість CD25⁺Foxp3⁺ лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar (M± m)

Серії	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ лімфоцити	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ лімфоцитів
контроль	19±3 16,7±2,7%	38±4 33,5±3,4%	57±4 49,7±3,7%	114±8
стрес 1	16±2 22,4±2,3%	21±2 ¹ 28,5±2,8%	36±3 ¹ 49,1±4,2%	72±5 ¹
стрес 2	15±2 27,3±3,5% ¹	18±2 ¹ 31,9±3,0%	23±3 ¹ 40,8±4,8%	56±4 ¹
стрес 1 + канаміцин	20±3 25,4±3,8%	24±3 ¹ 31,0±3,5%	34±4 ¹ 43,5±4,8%	78±8 ¹
стрес 2 + канаміцин	18±2 30,0±4,0% ¹	16±2 ¹ 27,8±4,0%	25±3 ¹ 42,2±5,1%	59±6 ¹
стрес 1 + лактобактерин	22±3 23,1±3,3%	27±3 ¹ 28,1±3,0%	47±4 ² 48,7±3,7%	97±7 ²
стрес 2 + лактобактерин	20±3 21,8±3,0%	31±3 ³ 33,1±3,4%	42±3 ^{1,3} 45,1±3,2%	93±7 ^{1,3}

Примітка. в чисельнику - щільність популяції CD25⁺Foxp3⁺лімфоцитів (на 1 мм²), в знаменнику - процентна частка окремих класів CD25⁺Foxp3⁺лімфоцитів; достовірність відзнак параметрів р < 0,05 відносно контролю (1), стресу 1 (2), стресу 2 (3)

Foxp3⁺- малих лімфоцитів (на 30-83 %, р < 0,05) (табл.). Крім того, введення *Lb* щурам, підданих дії стресу, супроводжувалося переважним зниженням щільності CD25-рецепторів й односпрямованим збільшенням концентрації білка Foxp3, найбільш вираженого у Foxp3⁺лімфоцитів (на 19-30%, р < 0,05) і Foxp3⁺- середніх лімфоцитів (на 37 -46%, р < 0,05) порівняно з серіями ХСС1 і ХСС2.

Відомо, що зменшення вмісту Treg призводить до виникнення важкого запального захворювання кишечника (IBD – inflammatory bowel disease), викликаного умовно-патогенною мікрофлорою, а при хворобі Крона описано декілька типів мутацій, які зачіпають ген Foxp3 [14]. У літературі є цілий ряд даних про захисну роль Treg-клітин при аутоімунних тиреоїдиті, гастриті, оофориті, орхіті, виразковому коліті [1,3,14]. Результати робіт інших дослідників також свідчать, що розвиток соціального стресу може знижувати кількість Treg-клітин і посилювати прозапальну сигналізацію [12]. Крім того, вимкнення Treg шляхом застосування anti-CD25 МКАТ посилює розвиток стресу і модулює тривожність і депресивноподібний стан у мишей, а також збільшує в їх плазмі крові концентрацію прозапальних цитокінів ІЛ-6, TNFα, IFNγ, ІЛ-17А [9]. Li Y. et al. (2010) показали, що в пацієнтів із депресією кількість CD4⁺CD25⁺-Treg-клітин у крові знижена [10]. Таким чином, зменшення кількості регуляторних лімфоцитів при стресі, у свою чергу, може ще більше посилювати його прояви (стрес-дефіцит Treg - посилення стресу). Дані ефекти ХСС на популяцію Treg реалізуються, на

наш погляд, через зміни складу кишкової мікрофлори. Відомо, що ХСС змінює склад мікрофлори кишечника. Так, Bailey M. et al. (2011) продемонстрували найбільш сучасним методом піросеквенування, що в експериментальних тварин, які піддавалися дії соціального стресу, спостерігалось значне зниження бактерій представників роду *Bacteroides* і збільшення представників роду *Clostridium* [16]. Крім цього, ХСС активує вроджену імунну систему, стимулює продукцію прозапальних цитокінів ІЛ-6 і TNFα та індукує бактеріальну транслокацію в КАЛТ людини та експериментальних тварин [15]. У свою чергу, зміни складу мікрофлори впливають на рівень диференціювання різних субпопуляцій Т-хелперів. У роботах Ivanov I. et al. (2009) було продемонстровано, що сегментарні ниткоподібні бактерії (*segmented filamentous bacteria, SFB*) індукують в КАЛТ диференціювання прозапальних Th17 і Th1-клітин [6], а деякі представники роду *Clostridium* (cluster IV і XIVa) та полісахарид А (PSA) *Bacteroides fragilis* стимулюють утворення Т-регуляторних клітин і продукцію супресорного цитокіну ІЛ-10 [11]. Одним із можливих механізмів такого стимулюючого впливу ХСС може бути активація адреналін/норадреналінової (А1-3) системи кворум-сенсінгу (QS), активність якої була виявлена в багатьох представників інтестинальної мікрофлори, як коменсальної (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*), так і патогенної (*E. coli O26:H11*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*). Це свідчить про ймовірну участь цього медіатора у міжвидовому «спілкуванні» [8]. Але

найбільш інтригуючим фактом стало виявлення агоністичних взаємодій AI-3 QS-системи з адреналіном та норадреналіном, що дозволяє припустити наявність у бактерій досить специфічних механізмів рецепції сигнальної інформації організму господаря [17]. Тобто, можливо, що в умовах ХСС катехоламіни, що синтезуються, виступають у ролі лігандів для рецепторів QS-системи AI-3 бактерій, що сприймається як сигнал, який свідчить про достатню для атаки щільність бактеріальної популяції та індукує їх транслокацію в КАЛТ із гіперактивацією спочатку вродженої, а потім адаптивної імунної системи [8]. Крім того, зміни складу мікрофлори впливають на експресію клітинами КАЛТ ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), який індукує катаболізм триптофану в проапоптотичні метаболіти (наприклад, кінуренін), здатні пригнічувати активацію ефекторних Т-клітин. Виявлена здатність IDO-експресуючих клітин керувати диференціюванням наївних CD4⁺Т-лімфоцитів в Foxp3⁺Тreg, а також їх спроможність безпосередньо активувати дозрівання Тreg та попереджувати індуковану запаленням конверсію Тreg-клітин у прозапальні субпопуляції Т-хелперів: Th17- та Th1-клітини [13].

У свою чергу, серед найбільш вживаних засобів, які здатні змінювати склад кишкової мікрофлори і, таким чином, впливати на рівень імунної відповіді, є пробіотики (ПБ), зокрема лактобактерії (ЛБ), що здійснюють вплив на КАЛТ через цілу низку механізмів [3]. Багато досліджень продемонструвало здатність ЛБ збільшувати кількість Т-регуляторних клітин і, таким чином, попереджати розвиток запальних та AI3, а також зменшувати стан депресії і тривоги в умовах стресу [5]. Підвищуючи рівень Тreg, ЛБ оказують антидіабетогенну дію в умовах стрептозотозин-індукованого діабету та у *BB-DP* щурів шляхом індукції CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺-клітин, зменшують ризик розвитку хвороби Крона та виразкового коліту [20]. Однак, з іншого боку, такий їх імуносупресивний ефект може сприяти розвитку інфекційних та онкологічних захворювань, а багато досліджень впливу ЛБ на імунну систему лобіюється фірмами-виробниками ПБ. Це підтверджується і деякими даними, що свідчать про можливість ЛБ підвищувати ризик розвитку AI3, зокрема ревматоїдного артриту, експериментального автоімунного енцефаліту та ін. Зокрема, оральний прийом ЛБ експериментальними тваринами може активувати експресію TLR2 і TLR4 типів, зменшувати рівень Тreg-клітин та підвищувати кількість прозапальних Th17- і Th1-клітин, а також IL-12 [18]. Chiba Y. et al. (2010) продемонстрували, що *Lactobacillus casei* збільшують продукцію IL-12 клітинами селезінки та ПБ мишей навіть сильніше, ніж деякі патогенні бактерії,

що, у свою чергу, стимулює утворення Th1-клітин та продукцію прозапального IFN γ [4]. Тобто, неконтрольований прийом ЛБ здатен здійснювати й імуностимулюючу дію та бути одним із тригерів розвитку AI3. Крім того, ЛБ здатні впливати на кількість основних регуляторів диференціювання наївних Т-клітин у прозапальні Th17-клітини - сегментарних ниткоподібних бактерій (*SFB*) та *Bacteroides fragilis*, які стимулюють утворення Т-reg клітин і продукцію супресорного цитокіну IL-10, тобто є одними з важливих регуляторів балансу Th17/Т-reg у КАЛТ [2]. Отримані нами дані свідчать про можливість ЛБ збільшувати кількість CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів в умовах ХСС і, таким чином, попереджати розвиток автоімунних і запальних захворювань. У свою чергу, прийом АБ є одним із факторів ризику розвитку в подальшому запальних і AI3, зокрема ЦД 1 та 2 типу, хвороби Крона та ін. [19]. Аміноглікозиди (АГ) через зміни мікробної композиції кишечника, насамперед зменшення кількості коменсальної мікрофлори, здатні впливати на рівень експресії TLR2 і TLR4 типів [19], молекул МНС-II, зменшувати продукцію антимікробних пептидів, впливати на рівень прозапальних Th17-клітин, стимулювати утворення нових М-клітин (microfold cells), які розташовані не в зоні фолікуло-асоційованого епітелію, а на поверхні кишкових ворсинок (так званих ворсинчастих М-клітин, villous M-cell). Оральний прийом АГ використовується як експериментальна модель кишкового дисбіозу та його запальних захворювань [7]. Тем не менше, введення Сап в умовах ХСС не впливали на кількість CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів і будову їх популяції в LFV, хоча й призводили до зростання концентрації білка Foxp3.

Висновки

1. Розвиток стресу супроводжується зниженням кількості CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів у LFV, призводить до збільшення щільності CD25-рецепторів на клітинній мембрані та зменшення концентрації транскрипційного фактора Foxp3 в імунопозитивних клітинах.

2. Уведення канаміцину стресованим щурам не впливає на загальну кількість CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів і структуру їх популяції в LFV, тоді як модуляція кишкової мікрофлори за допомогою лактобактерину призводить до підвищення кількості Тreg клітин на 33-66 % ($p < 0,05$) при збільшенні в них концентрації білка Foxp3.

Перспективи подальших досліджень

Представляє значний інтерес подальше вивчення компонентів вродженої й адаптивної імунної системи КАЛТ в умовах ХСС та при модуляції складу кишкової мікрофлори.

Література. 1. Angelina M. Induced CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in Immune Tolerance /M. Angelina, Bilate and Juan J. Lafaille// Annu. Rev. Immunol. – 2012. – Vol.30. – P.733–758. 2. Baarlen P. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli /P. Baarlen, J. Wells, M. Kleerebezem // Trends in Immunology.-2013.-Vol.3.-P.1–8. 3. Bailey M. Exposure to a social stress or alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation /M. Bailey, S. Dowd, J. Galley //Brain Behav. Immun. – 2011. – Vol. 25. – P. 397–407. 4. Chiba Y. Well-controlled pro-inflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei /Y. Chiba, K. Shida, S. Nagata // Immunology. – 2010. – Vol. 130, №3. – P. 352–362. 5. Cryan J. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior /J. Cryan, T. Dinan // Nat. Rev. Neurosci. -2012.-Vol.9.-P.1-12. 6. Ivanov I. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria /I. Ivanov, K. Atarashi, N. Manel // Cell. – 2009. – Vol. 139. – P. 485–498. 7. Kaiser P. The streptomycin mouse model for Salmonella diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's mucosal immune response /P. Kaiser, M. Diard, B. Stecher // Immunol. Rev. – 2012. – Vol.245, №1. – P. 56-83. 8. Karavolos M. Pathogenes pionage: multiple bacterial adrenergic sens or seaves drop on host communication systems/M. Karavolos, K. Winzer, P. Williams, C. Khan // Mol.Microbiol. – 2013. – Vol. 87, №3. – P.455-465. 9. Kim S.J. CD4+CD25+ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice /S.J. Kim, H. Lee, G. Lee // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 420-454. 10. Li Y. Altered expression of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder /Y. Li, B. Xiao, W. Qiu// J. Affect. Disord. – 2010. – Vol. 124, № 1-2. – P. 68-75. 11. Martins M. Functional stability of Foxp3+ regulatory T cells / M.Martins, C.A.Piccirillo // Trends Mol. Med. – 2012 – Vol. 18, № 8. – P.454-462. 12. Miller A. Depression and Immunity: A Role for T cells? /A. Miller// BrainBehavImmun. – 2010 – Vol. 24, № 1. – P. 1–8. 13. Munn D. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, Tregs and cancer/D. Munn // Curr. Med. Chem. – 2011. – Vol. 18, №15. – P. 2240–2246. 14. Murai M. Regulatory T-cell stability and plasticity in mucosal and systemic immune systems /M. Murai, P. Krause, H. Cheroutre, M. Kronenberg// Mucosal Immunol. – 2010. – Vol. 3 № 5. – P.443-449. 15. Powell N.D. Psychosocial stress and inflammation in cancer /N.D. Powell, A.J. Tarr, J.F.Sheridan // Brain Behav. Immun. – 2013. – Vol. 30 – P. 7-41. 16. Sommer F. The gut microbiota– masters of host development and physiology /F. Sommer, F. Backhed // Nat. Rev. Microbiol.-2013.-Vol.2.-P.1-12. 17. Sperandio V. Bacteria-host communication: the language of hormones/V. Sperandio, A. Torres, B. Jarvis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol.,100, №15. – P.8951-8956. 18. Shida K. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities /K. Shida, M. Nanno, S. Nagata // GutMicrobes. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 109-114. 19. Willing B. Shifting the balance: antibiotic effects on host – microbiota mutualism / B. Willing, S. Russell, B. Finlay // Nat.Rev.Microbiol. – 2011. – Vol. 9 № 4. – P. 233-243. 20. Zhao H. Probiotic sin crease T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice /H. Zhao, X. Huang, Z. Zuo// World J. Gastroenterol. – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 742–749.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА И МОДУЛЯЦИИ СОСТАВА КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ

И. А. Топол, А. М. Камышин

Резюме. Исследовано влияние хронического социального стресса (ХСС) и модуляции состава кишечной микрофлоры на распределение CD25+Foxp3+-клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки крыс. Установлено, что развитие ХСС приводит к снижению количества CD25+Foxp3+-лимфоцитов, росту плотности CD25-рецепторов на клеточной мембране и уменьшению концентрации Foxp3 в иммунопозитивных клетках. Введение канамицина не влияет на количество CD25+Foxp3+-лимфоцитов и структуру их популяции, тогда как лактобактерин способствует повышению числа T-reg клеток на 33-66% ($p<0,05$) при возрастании в них концентрации белка Foxp3.

Ключевые слова: стресс, Т-регуляторные клетки, пробиотики, антибиотики

STUDY OF THE EXPRESSION OF MOLECULAR MARKER OF T-REGULATED CELLS UNDER CONDITIONS OF SOCIAL STRESS AND MODULATION OF THE COMPOSITION OF INTESTINAL MICROFLORA

I. A. Topol, A. M. Kamyshyn

The aim of research. The influence of chronic social stress and modulation of the composition of intestinal microflora on the distribution of CD25+Foxp3+-cells in the own lamina of mucous membrane of the fibres of ileum of the rats has been investigated.

Methods. Researches have been conducted on 70 rats (female) of Wistar line, which were divided on 7 experimental groups: control rats (group 1); rats, which were modeled CHSS1 by means of three weeks social isolation and prolong psycho-emotional influence (group2); rats, having CHSS 2 modeling by means of keeping animals in over populated cages with every day change of grouping (group 3); rats with CHSS1 and CHSS2 which were made the modeling of intestinal microflora by means of introduction of aminoglycosed antibiotic kanamycin (*Can*) (group 4 and 5, accordingly); rats with rats with CHSS1 and CHSS2 which were made the modeling of intestinal microflora by means of everyday introduction of lactobacterine (groups 6 and 7, accordingly). Researched lymphoid cells were identified by immunofluorescence method.

Results. It is established that the development of CHSS results to the reducing of quantity of CD25+Foxp3+-lymphocytes, increasing of CD25-receptors density on the cellular membrane and reducing of Foxp3 concentration in immunopositive cells. Introduction of kanamycin to the stressed rats doesn't influence on the general quantity of CD25+Foxp3+-lymphocytes and the structure of its population, but lactobacterine results to the increasing of T-regulated cells quantity on 33-66% ($p<0,05$) in the enlargement of Foxp3 protein concentration there.

Conclusions. Results have got by us mark about the opportunity of LB increase the number of CD25+Foxp3+-lymphocytes in CHSS conditions, in such way they prevent the development of autoimmune and inflammatory diseases. AB intake is one of the risk factors of AID development further.

Keywords: stress, T-regulatory cells, probiotics, antibiotics

Zaporozhye State Medical University

e-mail: innatopol@yandex.ua

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №2 (44).-P.180-184.

Надійшла до редакції 17.05.2013

Рецензент – проф. В. Ф. Мислицький

© I. O. Topol, O. M. Kamyshyn, 2013