

© Жеребят'єв О.С., Камишний О.М., Камишна В.А.

УДК: 616.341-002:[577.112:577.122]

Жеребят'єв О.С., Камишний О.М., Камишна В.А.

Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології (проспект Маяковського, 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035)

ЕКСПРЕСІЯ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ FOXP3 ТА ROR γ T ПРИ ГОСТРОМУ ІЛЕЇТІ У ЩУРІВ

Резюме. В експерименті досліджувався вплив гострого ілеїту на інтенсивність експресії транскрипційних факторів Foxp3 та ROR γ T лімфоцитами тонкої кишки. Для визначення Foxp3⁺ та ROR γ T⁺-клітин було застосовано метод непрямой імуофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл. Встановлено, що розвиток ілеїту супроводжувався зменшенням кількості імунопозитивних лімфоцитів і впливав на концентрацію транскрипційних факторів у лімфоцитах.

Ключові слова: експериментальний ілеїт, запальні захворювання кишківника, Th17, регуляторні Т-клітини.

Вступ

Запальні захворювання кишківника (ЗЗК) складаються з двох різних, але близькоспоріднених нозологій: виразкового коліту та хвороби Крона. Виразковий коліт залучає товсту кишку на рівні слизової оболонки, в той час хвороба Крона характеризується трансмуральним запаленням, і може вражати будь-який сегмент шлунково-кишкового тракту від ротової порожнини до товстої кишки, особливо клубову і ободову кишки [Baumgart, Carding, 2007].

Ми зосередили увагу на Т-клітинах які можуть відігравати певну роль у патофізіології запалення кишківника, а саме Т-регуляторних лімфоцитах (Treg) і Т-хелперах 17 типу (Th17). CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-клітини, які включають 5-10% CD4⁺ Т-клітин, мають потужний регуляторний потенціал і можуть відігравати важливу роль в ряді аутоімунних та інфекційних захворювань, включаючи хворобу Крона. Treg здатні істотно обмежувати надмірні запальні/аутоімунні реакції [Izcue et al., 2006]. Фактор транскрипції Foxp3, також відомий як Forkhead box protein P3, Scurfin, керує фенотипічним перетворенням наївних Т-клітин в Treg та є більш специфічним маркером Т регуляторних клітин, ніж більшість маркерів клітинної поверхні. На противагу цьому, Th17 є новою і важливою субпопуляцією Т-хелперів, які можуть мати відношення до пошкодження тканин при захворюваннях, які як раніше вважалося, залежать від Th1 - енцефаломієліт, ЗЗК, ревматоїдний артрит і алергічна гіперчутливість дихальних шляхів [Weaver et al., 2007]. Основним регулятором диференціювання Th17 є транскрипційний фактор ROR γ T. Тому, *метадослідження* - вивчити особливості експресії транскрипційних факторів Foxp3 та ROR γ T клітинами кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) у щурів з гострим експериментальним ілеїтом.

Матеріали та методи

Дослідження проведені на 20 самцях щурів лінії Wistar. Тварини отримані з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП "Біомодельсервіс" (Київ). Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних "Загальних етичних принципів досліджень на тваринах" (Україна, 2001) і положень "Євро-

пейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей" (Страсбург, 1985). Тварини були розподілені на дві групи по 10 щурів. Перша група - контрольні тварини, друга група - тварини з експериментальною патологією-гострим індометацин-індукованим ілеїтом (ГІ). ГІ індукували одноразовим підшкірним введенням 0,15% розчину індометацину (Sigma, США) в дозі 15 мг/кг [Nandi, 2010]. На 5 добу після введення індометацину тварин виводили з експерименту декапітуванням під наркозом. Вилучали ділянки клубової кишки і на 20 годин занурювали в фіксатор Буена.

Структуру популяції Foxp3⁺ та ROR γ T⁺-клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних та денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідrataцію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали у 0,1М фосфатному буфері (pH=7,4) і фарбували гематоксиліном-еозином. Для дослідження структури популяції імунопозитивних лімфоцитів зрізи інкубували з первинними кролячими моноклональними антитілами (МКАТ) до ROR γ T щура або первинними мишачими МКАТ до Foxp3 (Santa Cruz Biotechnology, США) протягом 18 годин у вологій камері при T=4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин (T=37°C) з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика або миші, кон'югованими з FITC. Після інкубації всі зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і розміщували в суміші гліцерину і фосфатного буфера (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Зображення, що отримується на мікроскопі Primo Star (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) за допомогою високочутливої камери Axio Cam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводили в комп'ютер. При

цьому в автоматичному режимі визначалися області зі статистично значущою флюоресценцією, характерною для лімфоїдних клітин експресуючих транскрипційних факторів. Обчислювалися морфометричні і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. Концентрацію транскрипційного фактора визначали враховуючи інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічну флюоресценцію препарату (так званий "фон"). На підставі цих показників обраховувалася коректована клітинна флюоресценція (в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції $UO_{(ф)}$): Integrated Density (інтегрована щільність) - (площа виділених клітин * середню флюоресценцію фона). При фарбуванні МКАТ досліджували Foxp3⁺ та RORγt⁺-лімфоцити, розташовані у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) і в ізольованих лімфоїдних вузликах (ІЛВ) клубової кишки які є, відповідно, ефекторними та індуктивними зонами імунної відповіді в КАЛТ.

Результати. Обговорення

Розвиток ГІ у тварин супроводжувався макроскопічними змінами в тонкому кишківнику, а саме наявністю вираженого набряку, гіперемії, множинних ерозій і виразок. При гістологічному дослідженні тканин забарвлених гематоксиліном-еозином ми спостерігали ознаки запалення з пошкодженням епітеліального бар'єру, дефектами ворсинок і сильною інфільтрацією власної пластинки слизової оболонки нейтрофілами, макрофагами і лімфоцитами.

Аналіз серійних зрізів клубової кишки щурів лінії Wistar показав, що розвиток ГІ супроводжується односпрямованим зменшенням у досліджуваних зонах клубової кишки сумарної щільності популяції Foxp3⁺ лімфоцитів (у ВПСОВ на 32%; в ІЛВ на 29%, $p < 0,05$) (рис. 1А), зменшенням RORγt⁺ лімфоцитів (у ВПСОВ на 18%; в ІЛВ на 14%, $p < 0,05$) (рис. 1В).

Вивчення інтенсивності флюоресценції імунопозитивних клітин у ВПСОВ, яке відображає концентрацію транскрипційного фактора в лімфоцитах показало, що розвиток ГІ супроводжується достовірним зменшенням концентрації Foxp3 в лімфобластах (на 20%, $p < 0,05$), а також зменшенням концентрації RORγt в лімфобластах (на 5%, $p < 0,05$) у порівнянні з контролем. В ІЛВ клубової кишки ГІ викликав зниження концентрації Foxp3 в лімфобластах (на 99%, $p < 0,05$) а також зменшенням концентрації RORγt в лімфобластах (на 5%,

$p < 0,05$) у порівнянні з контролем.

Згідно з сучасними уявленнями щодо функцій Th17 і Treg лімфоцитів, під час розвитку ЗЗК відбувається зміщення балансу цих клітин в бік збільшення Th17 (про-запальна субпопуляція) і зменшення Treg (протизапальна і імуносупресивна субпопуляція). Відомо, що Treg здатні зменшувати прояви коліта, індукованого перенесенням наївних Т-клітин в організм RAG2^{-/-} мишей-реципієнтів. За цих умов, Treg клітини мігрують в запалений кишківник і секретують протизапальний IL-10 [Uhlir et al., 2006].

Th17 пов'язані з численними аутоімунними захворюваннями і ЗЗК. У тварин дефіцитних по ядерному рецептору RORγt послаблюється експериментально-індуковані аутоімунні захворювання. Переміщення диференційованих Th17 в організм мишей з лімфопенією призводить до розвитку коліту. Ці дані доводять, що Th17 клітини відіграють центральну роль в патогенезі ЗЗК [Huber et al., 2012]. Fujino et al. [2003] показали, що експресія IL-17 (основний цитокін що секретується Th17) у слизовій оболонці кишківнику і в сироватці збільшувалась у пацієнтів з ЗЗК. Цілком імовірно, що ця зміна може бути пов'язана з зміненими імунними і запальними реакціями у слизовій оболонці кишківнику [Fujino et al., 2003]. Eastaff-Leung et al. [2010] показали, що зменшення кількості Treg і збільшення Th17-клітин спостерігається у периферійній крові пацієнтів з ЗЗК. Dambacher et al. [2009] засвідчили, що пацієнти з хворобою Крона мають підвищений рівень IL-17A в слизовій оболонці кишківника, власна пластинка містить підвищену кількість Th17 клітин, а фактор транскрипції RORγt експресований на більш високих рівнях.

Отримані нами дані дещо не збігаються з результатами інших дослідників. Зокрема, виявлене нами зниження кількості Th17 можна пояснити тим, що різноманітні субпопуляції Th є досить пластичними і на ранніх стадіях розвитку можуть диференціюватися в інші клітини. Яскравим підтвердженням цього є виявлення подвійних позитивних Foxp3⁺RORγt⁺ Т-лімфоцитів, які можуть надалі диференціюватися як в регуляторні кліти-

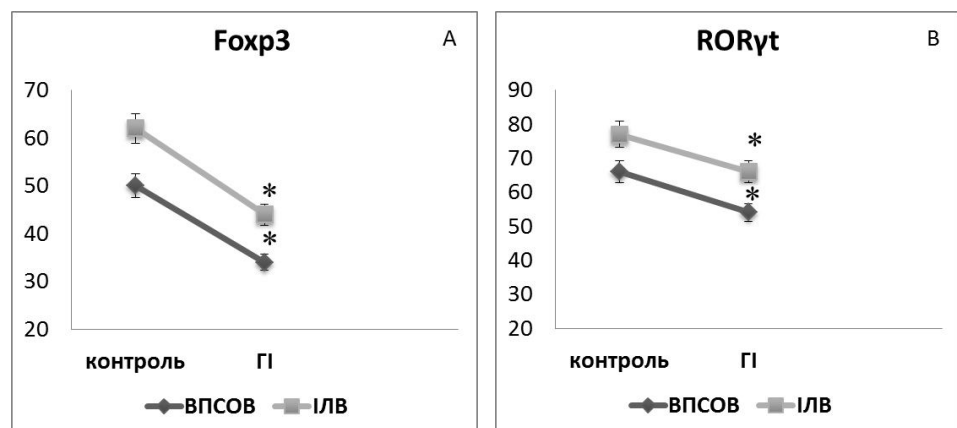


Рис. 1. Сумарна щільність (на 1мм²) Foxp3⁺ (А) та RORγt⁺ клітин (В) у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки при розвитку гострого (ГІ) ілеїту у експериментальних тварин.

Примітка. * - $p < 0,05$.

ни, що перешкоджають розвитку аутоімунних захворювань, так і в прозапальні Th17-клітини. Тому, експресія лімфоцитами транскрипційних факторів Foxp3 або ROR γ t ще не є свідченням їхнього термінального диференціювання й зовсім не факт, що ROR γ t⁺ клітина врешті-решт поповнить пул Th17-клітин, а не Treg [Tartar, 2010]. Ueno et al. [2013] показали, що кількість циркулюючих подвійних IL-17 і Foxp3 експресуючих CD4⁺ T-клітин збільшується у пацієнтів з ЗЗК. Коекспресія ROR γ t і Foxp3 в цих клітинах передбачає перетворення з Treg Th17 клітин. Це пов'язано зі зниженням супресорної функції Foxp3 CD4⁺ T-лімфоцитів [Ueno et al., 2013]. Крім того, Ayyoub et al. [2009] повідомив що Tregs секретують IL-17 *ex vivo* і конститутивно експресують ROR γ t. IL-17-секретуючі Treg поділяють деякі фенотипічні і функціональні особливості зі звичайними клітинами Th17, експресуючи високі рівні хемокинових рецепторів CCR4 і CCR6 і низькі рівні CXCR3. Однак, на відміну від звичайних Th17, вони експресують низькі рівні CD161 і в основному не секретують IL-22 і TNF- α *ex vivo*. Секреція IL-17 і конститутивна експресія ROR γ t людськими клітинами пам'яті Treg припускає, що, на додаток до їх відомих супресорних функцій ці клітини, ймовірно, грають додаткові, поки що не описані, прозапальні функції [Ayyoub et al., 2009].

Цитокини, що виробляються Th17, стимулюють формування щільних контактів між епітеліоцитами кишечника, забезпечуючи тим самим стійкість до бактеріальної транслокації через слизову оболонку шлунково-кишкового тракту в кров. Th17 клітини також впливають на клітинні компоненти імунної системи шляхом залучення нейтрофілів до місця запалення, стимулюючи вироблення антимікробних пептидів з епітеліаль-

них клітин, збільшення виробництва матриксних металопротеїназ з фібробластів, підвищення продукції IgA. Таким чином, виявлене зниження кількості Th17 мабуть може пояснити запалення кишечника опосередковане посиленою бактеріальною транслокацією через нещільні контакти між епітеліальними клітинами [Blaschitz, Raffatellu, 2010]. Також, нещодавні дослідження McGeachy et al. [2007] виявили потенційну гетерогенність в популяціях клітин Th17, продемонструвавши, що деякі з них можуть навіть секретувати IL-10, фактор, що інгібує запалення кишечника. Таким чином, цілком можливо, що функція Th17 клітин може відрізнятися залежно від інших факторів, які можуть бути присутніми в локальному середовищі. У нормальному кишечнику, основною функцією клітин Th17 може бути вартова, яка сприяє підтримці епітеліальної бар'єрної функції, тоді як в ділянках хронічного запалення кишечника, високі рівні IL-17 та IL-23 можуть підтримувати прогресію патології [McGeachy et al., 2007].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Розвиток ілеїту односпрямовано зменшує у КАЛТ кількість Foxp3⁺ та ROR⁺ лімфоцитів.

2. В умовах гострого ілеїту спостерігається зменшення концентрації Foxp3 та ROR γ t переважно в лімфобластах та малих лімфоцитах обох морфофункціональних зонах кишечника.

Опираючись на проведені нами дослідження, вважаємо доцільним і перспективним вивчення експресії транскрипційних факторів Foxp3 та ROR у щурів з експериментальним ілеїтом, скорегованим фармакологічними засобами.

Список літератури

- Ayyoub M. Human memory FOXP3⁺ Tregs secrete IL-17 *ex vivo* and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor ROR γ t / M. Ayyoub, F. Deknuydt, I. Raimbaud [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2009. - Vol. 106. - P. 8635 - 8640.
- Baumgart D. C. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology / D. C. Baumgart, S. R. Carding // Lancet. - 2007. - Vol. 369. - P. 1627 - 1640.
- Blaschitz C. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier / C. Blaschitz, M. Raffatellu // J. Clin. Immunol. - 2010. - Vol. 30. - P. 196 - 203.
- Characterization of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and IL-10-secreting CD4⁺CD25⁺ T cells during cure of colitis / H. H. Uhlig, J. Coombes, C. Mottet [et al.] // J. Immunol. - 2006. - Vol. 177. - P. 5852 - 5860.
- Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease / N. Eastaff-Leung, N. Mabarrack, A. Barbour [et al.] // J. Clin. Immunol. - 2010. - Vol. 1. - P. 80 - 89.
- Foxp3⁺ROR γ t⁺ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes / D. Tartar, A. Van Morlan, X. Wan [et al.] // J. Immunol. - 2010. - Vol. 7. - P. 3377 - 3385.
- Huber S. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine / S. Huber, N. Gagliani, R. A. Flavell // Eur. J. Immunol. - 2012. - Vol. 9. - P. 2238 - 2245.
- IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages / C. T. Weaver, R. D. Hatton, P. R. Mangan [et al.] // Annu. Rev. Immunol. - 2007. - Vol. 25. - P. 821 - 852.
- Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease / S. Fujino, A. Andoh, S. Bamba [et al.] // Gut. - 2003. - Vol. 52. - P. 65 - 70.
- Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4⁺ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3⁺ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients / A. Ueno, H. Jijon, R. Chan [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. - 2013. - Vol. 12. - P. 2522 - 2534.
- Izcue A. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation / A. Izcue, J. L. Coombes, F. Powrie // Immunol. Rev. - 2006. - Vol. 212. - P. 256 - 271.
- TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology / M. J. McGeachy, K. S. Bak-Jensen, Y. Chen [et al.] // Nat. Immunol. - 2007. - Vol. 8. - P. 1390 - 1397.
- The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation / J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann [et al.] // Gut. - 2009. - Vol. 58. - P. 1207 - 1217.
- TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis / J. Nandi, B. Saud, J. Zinkievich [et al.] // Mol. Cell. Biochem. - 2010. - Vol. 336. - P. 17 - 24.

Жеребятъев А.С., Камышный А.М., Камышная В.А.

ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ FOXP3 И ROR γ T ПРИ ОСТРОМ ИЛЕИТЕ У КРЫС

Резюме. В эксперименте изучалось влияние острого илеита на интенсивность экспрессии транскрипционных факторов Foxp3 и ROR γ t лимфоцитами тонкого кишечника. Для определения Foxp3⁺ и ROR γ t⁺-клеток был применен метод непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител. Установлено, что развитие илеита сопровождалось уменьшением количества иммунопозитивных лимфоцитов и влияло на концентрацию транскрипционных факторов в лимфоцитах.

Ключевые слова: экспериментальный илеит, воспалительные заболевания кишечника, Th17, регуляторные T-клетки.

Zherebiatiev A.S., Kamyshnyi A.M., Kamyshnaia V.A.

THE EXPRESSION OF THE TRANSCRIPTION FACTORS FOXP3 AND ROR γ T IN RATS WITH ACUTE ILEITIS

Summary. We studied the effect of acute ileitis on expression intensity of the transcription factor Forkhead box p3 (Foxp3) and the transcription factor retinoic acid-related orphan receptor- γ t (ROR- γ t), with lymphocytes of small intestine. The Foxp3⁺ and ROR γ t⁺-cells were determined using an indirect immunofluorescence technique with using a monoclonal antibody. We established that development of ileitis was accompanied with the decrease of amount of the immunopositive lymphocytes and it influenced concentration of the transcription factors in lymphocytes.

Key words: experimental ileitis, inflammatory bowel disease, Th17, regulatory T cells.

Стаття надійшла до редакції 15.04.2014 р.

Жеребятъев Александр Сергійович - ст. лаборант кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету; +38 096 795-99-37; Gerya2009@yandex.ru

Камышный Александр Михайлович - д. мед. н., доцент, зав. кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету; +38 066 926-63-08; alexkamyshny@yandex.ru

Камышная Виктория Анатоліївна - к. мед. н., ст. викладач кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету; +38 066 926-63-08; alexkamyshny@yandex.ru

© Корсак А.В., Чайковський Ю.Б., Чухрай С.М., Ритікова Н.В., Маринський Г.С., Чернець О.В., Лопаткіна К.Г., Васильченко В.А., Сидоренко Д.Ф., Буряк Ю.З., Сердюк В.К.

УДК: (616-091+591.8):616-001:616-72

Корсак А.В., Чайковський Ю.Б., Чухрай С.М., Ритікова Н.В., Маринський Г.С.*, Чернець О.В.*, Лопаткіна К.Г.*, Васильченко В.А.*, Сидоренко Д.Ф.*, Буряк Ю.З.*, Сердюк В.К.*

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра гістології та ембріології (бульв. Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601), *Інститут електрозварювання імені Є.О. Патона (вул. Горького, 66, м. Київ, Україна, 01601)

МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРООТОЧЕННЯ НЕЙРОЦИТІВ РУХОВОГО ЦЕНТРУ ТРАВМОВАНОГО СІДНИЧОГО НЕРВУ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ВИСОКОЧАСТОТНОЇ-ЕЛЕКТРОЗВАРЮВАЛЬНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

Резюме. Розроблена нова експериментальна модель з'єднання тканин в ділянці травми периферійного нерва методом електрозварювання. Був застосований електронномікроскопічний та імуногістохімічний метод дослідження, які дозволили вивчити картину змін мікрооточення нейронів рухового сегментарного центру травмованого сідничого нерва та мікрооточення нейронів рухового центру травмованого сідничого нерва за умов впливу височастотної - зварювальної технології (ВЧ - зварювальної) на 1-му та 6-му тижнях після пошкодження. На 6-му тижні після пошкодження нерва у його руховому сегментарному центрі відбувається активація мікрооточення, яка виражена менше у тварин, оперованих за новою методикою, що свідчить про позитивний вплив ВЧ-зварювальної технології на регенерацію.

Ключові слова: мікрооточення, руховий центр, периферійний нерв.

Вступ

Стан та взаємовідношення клітинних популяцій сегментарних центрів впливає на перебіг відновних процесів в периферійних нервах при їх патології, у тому числі і при травматичному пошкодженні [Челышев и др., 2000] Тому актуальним є аналіз змін мікрооточення нейроцитів в руховому сегментарному центрі при використанні нових методик оперативного втручання на травмованих нервових стовбурах [Aldskogius et al., 1998]. На сучасному рівні широко під час хірургічного лікування застосовується височастотні електрозварювальні технології, але вплив їх на нервову тканину до

цього часу не визначено [Dagtekin et al., 2011]. Нами було розроблено нову методику оперативного лікування травматичного ушкодження периферійного нерва за умов застосування вищевказаної технології.

Для більш глибокого аналізу результатів динаміки змін мікрооточення нейроцитів рухового сегментарного центру за умов впливу ВЧ-електрозварювального приладу доцільно порівняти з класичними гістологічними методами використовувати електронну мікроскопію та імуногістохімію, що може дозволити удосконалити операції на нервових стовбурах та підвищити ефективність