

УДК 616.345-002-092.4:576:31:615.37

А. С. Правоторова, Ю. В. Сидкина
 ІУ «Дніпропетровська медичинська академія МОЗ України», г. Дніпропетровськ

МЕТОДОЛОГИЯ МАРКИРОВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В СЛИЗИСТОЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Существует проблема маркирования иммунных клеток моноклональными антителами к CD-рецепторам, состоящая в перекрестной экспрессии клеточных детерминант сразу несколькими видами лейкоцитов, что требует задействования двух-трех маркеров, по ассоциации которых и выявляются клеточные кластеры. Не являются исключением и дендритные клетки, несущие антигенные метки идентичные гистиоцитам, В-лимфоцитам. Цель исследования - поиск специфичного маркера дендритных клеток в составе воспаленной слизистой оболочки толстой кишки при экспериментальном язвенном колите. Были изучены фрагменты толстой кишки лабораторных крыс линии Вистар, у которых моделировали язвенный колит путем введения тринитробензолсульфоновой кислоты в толстую кишку. Было установлено, что из всех изученных маркеров дендритных клеток в составе слизистой толстой кишки наиболее приемлемым является S-100, поскольку интенсивно накапливается в цитоплазме ДК, но не гистиоцитов и лейкоцитов, не требует дифференцировки с нервными элементами. Маркер позволяет исследовать детали гетерогенности его накопления в цитоплазме ДК.

Ключевые слова: дендритные клетки, язвенный колит, иммуногистохимическое маркирование.

Работа является фрагментом НИР «Гістологічні аспекти взаємодії дендритних клітин із мікрооточенням у складі внутрішніх органів в умовах експериментального моделювання патологічних станів».

Неспецифический язвенный колит (НЯК) относят к группе воспалительных заболеваний кишечника с невыясненной этиологией. Характеризуется хроническим характером течения, поражением слизистой оболочки толстой кишки [5]. Одним из главных патогенетических звеньев в развитии НЯК, по мнению большинства исследователей, является нарушение эпителиального барьера слизистой оболочки толстой кишки [6] и инициация иммунного ответа на проникновение бактерий и других антигенов в глубокие слои, в результате чего иммунными комплексами оказывается дополнительное альтеративное действие [2].

Для активации иммунных реакций, связанных с диссеминацией антигенного компонента в глубокие слои слизистой, необходимо участие антигенпрезентирующих клеток (АПК), в роли которых могут быть как дендритные клетки (ДК), так и моноциты, В-лимфоциты [4]. К АПК относят также группу неиммунных клеток, к которым относятся эндотелиоциты сосудов и эпителиоциты кишки, несущие на себе молекулы МНС II класса. Существует теория о том, что начальная активация Т-лимфоцитов с участием неиммунных АПК может приводить к персистенции лейкоцитарной инфильтрации и поддержанию хронического воспаления [3].

Изучение иммунных механизмов развития и прогрессирования НЯК требует четкого дифференцирования клеток-участников с помощью строго специфичных маркеров, какими являются CD-компоненты плазмолемы лейкоцитов. Существует проблема маркирования иммунных клеток моноклональными антителами к CD-рецепторам, состоящая в перекрестной экспрессии клеточных детерминант сразу несколькими видами лейкоцитов, что требует задействования двух-трех маркеров, по ассоциации которых и выявляются клеточные кластеры. Не являются исключением и дендритные клетки, несущие антигенные метки идентичные гистиоцитам, В-лимфоцитам.

Целью работы был поиск специфичного маркера дендритных клеток в составе воспаленной слизистой оболочки толстой кишки при экспериментальном язвенном колите.

Материал и методы исследования. Были изучены фрагменты толстой кишки лабораторных крыс линии Вистар (n=15), на которых моделировали неспецифический язвенный колит. Животным под легким хлороформным наркозом внутрикишечно вводили 1 мл спиртового раствора тринитробензолсульфоновой кислоты в концентрации 30 мг/мл через пластмассовый катетер, который вставляли на глубину 8 см от наружного прямокишечного сфинктера. Животным группы контроля (n=7) внутрикишечно вводили физиологический раствор (рН 7,4). Образцы толстой кишки забирали на 5, 7 и 10 сутки после введения раствора. Наличие язвенного воспаления оценивали макроскопически по следующей шкале от 1 до 5 баллов, что соответствовало количеству изъязвлений. 5 баллов присваивали при наличии 5 и более язв.

В качестве первичных антител использовали антитела к CD68, CD11, CD1 и антитела к S-100 как описанные в литературе маркеры дендритных клеток. S-100 - это Ca²⁺-связывающий белок, который присутствует в дендритных клетках и не выявляется на моноцитах и гистиоцитах; в клинике применяется для определения принадлежности опухолевидных разрастаний к кластеру

дендритных клеток [1]. Использовали систему визуализации UltraVision Quanto, LabVision. Для идентификации реакции наносился раствор хромогена 3-диаминобензидинтетрахлорид (DAB) (Quanto, LabVision) под контролем микроскопа с проявлением в виде коричневой окраски специфических структур. Интенсивность окрашивания оценивали полуколичественным методом в баллах: 1 балл – слабое окрашивание, 3 балла – интенсивное окрашивание.

Результаты исследования и их обсуждение. При оценке интенсивности реакции и характере распространенности маркер-позитивных клеток было выяснено, что антигенный спектр клеток слизистой кишки лабораторных крыс значительно отличается от такового, описанного для клеток человека. Количество CD11- и CD1-позитивных клеточных элементов было крайне мало. Кроме того, интенсивность окраски при использовании указанных антител оценивалась нами в 1 балл, что было на уровне неспецифической реакции. Наиболее специфичную реакцию мы получили при использовании антител к белку S-100. Локализация маркер-позитивных клеток соответствовала предположительному присутствию антигенпрезентирующих клеток – в составе лимфоидных фолликулов, а также на границе эпителия и подслизистой основы. Интенсивность окрашивания составляла в большинстве случаев 2 балла. Маркер накапливался в цитоплазме дендритных клеток гетерогенно с присутствием участков интенсивного окрашивания (рис. 1). Клетки имели различную площадь поверхности от 67,3 мкм² до 352,9 мкм²). Маркер S-100 позволяет не только идентифицировать ДК, но и оценить детали его накопления в тех или иных участках клетки. Следует сказать, что гистиоциты и лейкоциты были маркер-негативными.

Белок S-100 является компонентом нервных элементов, присутствующих в стенке кишки, однако не в слизистой. В связи с этим не возникает необходимости дифференцировать между ДК и нервными элементами маркер-позитивные участки. Кроме того, нервные волокна могут быть эталонным элементом для определения балльности окрашивания, поскольку они метятся максимально интенсивно.

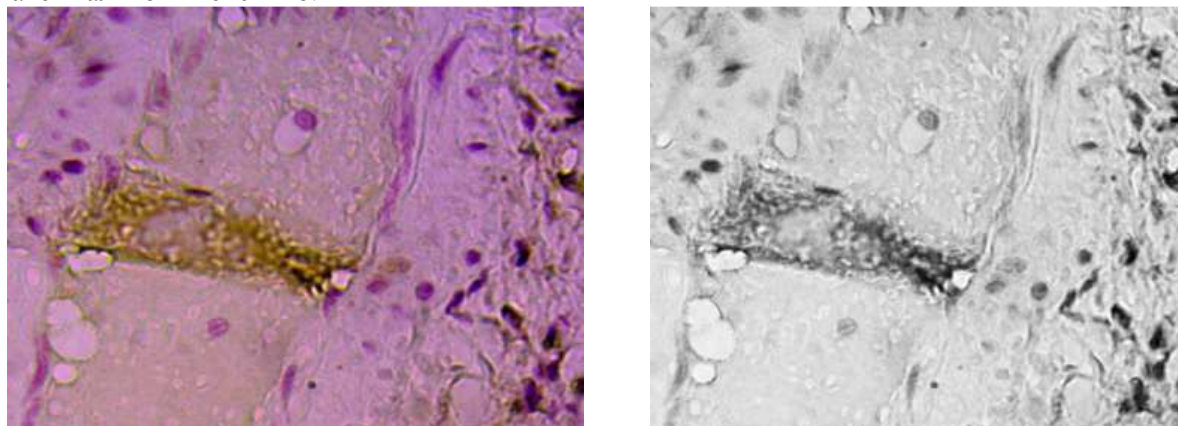


Рис. 1. Фрагмент толстой кишки крысы с экспериментальным колитом. В центре визуализируется дендритная клетка миелоидного типа. Препарат обработан антителами к белку S-100, докрашен гематоксилином Гейденгайна. Ув.: ×1000.

Заключение

Таким образом, из всех изученных маркеров дендритных клеток в составе слизистой толстой кишки наиболее приемлемым является S-100, поскольку интенсивно накапливается в цитоплазме ДК, не реагирует с гистиоцитами и лейкоцитами, а также не требует дифференцировки с нервными элементами, т.к. структуры имеют различную локализацию при схожей интенсивности окрашивания. Кроме того, маркер позволяет исследовать детали гетерогенности его накопления в цитоплазме ДК.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем планируется изучить количественные и качественные характеристики дендритных клеток, присутствующих в слизистой толстой кишки в условиях экспериментального язвенного колита.

Список литературы

1. Глузман Д. Ф. Диагностика опухолей из гистиоцитов и дендритных клеток / Д. Ф. Глузман, Л. М. Склярченко, С. В. Коваль [и др.] // Здоров'я України. – 2013. - № 9. – С. 32-34.
2. Дорофеев А. Э. Сравнительная оценка клинических форм и степени активности воспалительных заболеваний кишечника / А. Э. Дорофеев, А. А. Элина // Новости медицины и фармации. Гастроэнтерология. – 2012. - № 407. – 4 с.
3. Одинец А. Г. Роль дендритных клеток в иммунном ответе / А. Г. Одинец // Новые медицинские технологии. – 2008. - № 8. – С. 72-74.
4. Fries P. Mucosal dendritic cell diversity in the gastrointestinal tract / P. Fries, P. Griebel // Cell Tissue Res. – 2011. - № 343. – P. 33-41.

5. Olson O. Homeostasis and inflammation in the Intestine / O. Olson, J. Laukoetter, E. Su [et al.] // Cell. – 2010. - № 6. – P. 859-870.
 6. Tolstanova G. Role of anti-angiogenic factor endostatin in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis / G. Tolstanova, X. Deng, T. Khomenko [et al.] // Life Sci. – 2011. – Vol. 88 (1-2). – P. 74-81.

Реферати

МЕТОДОЛОГІЯ МАРКУВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН В СЛИЗОВІЙ ТОВСТОЇ КИШКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ВИРАЗКОВОМУ КОЛІТІ

Правоторова О. С., Сілкина Ю. В.

Існує проблема маркування імунних клітин моноклональними антитілами до CD-рецепторів, що постає в перехресній експресії клітинних детермінант відразу декількома видами лейкоцитів, а це вимагає задіяння двох-трьох маркерів, по асоціації яких і виявляються клітинні кластери. Не є винятком і дендритні клітини, які мають антигенні мітки ідентичні гістіоцитам, В-лімфоцитам. Мета дослідження - пошук специфічного маркера дендритних клітин у складі запаленої слизової оболонки товстої кишки при експериментальному виразковому коліті. Були вивчені фрагменти товстої кишки лабораторних щурів лінії Вістар, у яких моделювали виразковий коліт шляхом введення трінітробензолсульфонової кислоти в товсту кишку. Було встановлено, що з усіх вивчених маркерів дендритних клітин в складі слизової товстої кишки найбільш прийнятним є S-100, оскільки інтенсивно накопичується в цитоплазмі ДК, але не гістіоцитів та лейкоцитів, не вимагає диференціювання з нервовими елементами. Маркер дозволяє досліджувати деталі гетерогенності його накопичення в цитоплазмі ДК.

Ключові слова: дендритні клітини, виразковий коліт, імуногістохімічне маркування.

Стаття надійшла 5.10.2014 р.

METHODOLOGY OF LABELING DENDRITIC CELLS IN THE COLONIC MUCOSA IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

Pravotorova O. S., Silkina Yu. V.

There is a problem - labeling of immune cells with monoclonal antibodies to CD-receptors because appears the cross expression of cell determinants by several types of leukocytes, that requires to use of two or three markers for identification some cell clusters. No exception the dendritic cells that have identical antigenic tags the same the histiocytes, B-lymphocytes. The aim - to find a specific marker of dendritic cells within the inflamed mucosa of the colon in experimental ulcerative colitis. We were studied colon laboratory Wistar rats, which modeled ulcerative colitis by administering trinitrobenzolsulfonic acid in the colon. It was found that the most important marker of dendritic cells in the mucosal part of the colon is S-100 because accumulates in the cytoplasm dendritic cells, but not leukocytes and histiocytes, not requires differentiation with neural elements. Marker allows to investigate the details of the heterogeneity of its accumulation in the cytoplasm of dendritic cells.

Key words: dendritic cells, ulcerative colitis, immunohistochemical markers.

Рецензент Старченко І.І.

UDC 611.316:577.114.4:616-097.1]-053.31-092.9

V. Syrtsov, I. Maslova
 Zaporizhzhya state medical university, Zaporozhye

GLYCOSAMINOGLICANS DISTRIBUTION IN THE RATS' MAJOR SALIVARY GLANDS DURING EARLY POSTNATAL PERIOD AFTER ANTENATAL ANTIGEN ACTION

Purpose - to determine the features of glycoproteins' distribution in the structures of rats' major salivary glands in early postnatal period after intrauterine antigen action. In newborn animals receiving antigen in the antenatal period, in the cells' cytoplasm and extracellular matrix indicate the accumulation' increase of Alcian blue stain - positive compounds retained until the 11th and offset at the 45th day of postnatal life. The detected changes in the major salivary glands cells' are the basis for the development of inflammatory and dystrophic processes and can lead to the functional violations formation' hereinafter.

Key words: major salivary glands, intrauterine antigenic action, glycosaminoglycans, rats.

The major salivary glands synthetic and structural imbalance take one the main role in the general structure of oral pathology. Nowadays, one of the leading take pathological condition connecting with the salivary glands' inflammatory and dystrophic violations. The problem of etiology and pathogenesis not enough studied and demanded intent attention of researchers [5, 6, 7]. One of determinatives that result in violation of major salivary glands morphogenesis of and as a result the development of its pathology is the condition of pregnant health, more than half of them has chronic diseases and system functional disorders which is accompanied by the immune pathological condition, namely by antigen influence on a fetus [8]. Nowadays it is determined injection of the antigen in the antenatal period is the basis for the development of inflammatory processes in a postnatal period [9]. Afterbirth, the changes in connective tissue caused by antigen influence to fetus during the embryonic formation are the most striking manifestations of the undifferentiated connective tissue syndrome in newborn [9]. GAGs are the most susceptible component in dysplasia syndrome and perform the number of important functions in the salivary glands. Interconnection of glycosaminoglycans (GAGs) distribution in the major salivary glands structures in a postnatal period injected intrauterine an antigen after birth is not enough studied.

Purpose. To determine the glycosaminoglycans distribution features in the rats' major salivary glands structures in early postnatal period after intrauterine antigen action.