

стафілококковом сепсисе. На 9-е и 10-е сутки пс стафілококковом сепсисі. На 9-е і 10-у добу після бактеріальної інтоксикації проведено морфологічне дослідження печінки та селезінки гістологічними і морфометричними методами. Были выявл морфометричними методами. Були виявлені тромбогеморагические нарушения сосудов и паренхи тромбогеморагические порушення судин і паренхіми печени и селезенки, с последующими димтрофичес печінки і селезінки, з подальшими дімтрофіческі-некротическими изменениями паренхимы выше отмечен некротичними змінами паренхіми вище зазначених органов.

Ключевые слова: экспериментальный сепсис, печень, селезінка.

стафілококковом сепсисі. На 9-е і 10-у добу після бактеріальної інтоксикації проведено морфологічне дослідження печінки та селезінки гістологічними і морфометричними методами. Були виявлені тромбогеморагические нарушения сосудов и паренхи тромбогеморагические порушення судин і паренхіми печінки і селезінки, з подальшими дімтрофіческі-некротичними змінами паренхіми вище зазначених органов.

Ключові слова: експериментальний сепсис, печінка, селезінка.

Стаття надійшла 21.03.2015 р.

Рецензент Старченко І.І.

УДК 612.438.017.1:616.379-008.64-092.9

О. М. Камішній

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя

ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ АУТОІМУННОГО РЕГУЛЯТОРА AIRE В ТИМУСІ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

В експерименті досліджувались та обговорювались особливості експресії білка AIRE в тимусі щурів з експериментальним цукровим діабетом. Дослідження проведені на 28 самцях щурів лінії Вістар (вік 5-6 місяців). ЕЦД моделювали однократним внутріочеревинним введенням стрептозотоцину (SIGMA, США) в дозі 50 мг/кг. Для визначення AIRE було застосовано метод подвійної імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до AIRE, CD4-антигену і цитокератинів щура. Аналіз структури тимуса проводили за допомогою програмного забезпечення, розробленого на основі макро-мови програмування VIDAS. Встановлено, що кількість AIRE+клітин у корковій речовині тимуса контрольних тварин в 2 рази нижче, ніж у мозковій речовині. При цьому серед AIRE+клітин ідентифікуються не лише епітеліоретикулоцити тимуса (AIRE+MAPC+), але й значна кількість тимоцитів (AIRE+CD4+). Розвиток ЕЦД не супроводжувався змінами кількості AIRE+клітин у корковій речовині тимуса, тоді як у мозковій речовині їх щільність популяції знижувалася на 35% у порівнянні з контрольною групою тварин. При цьому концентрація білка AIRE у щурів з ЕЦД вірогідно знижувалася в порівнянні з контролем в AIRE+клітинах обох досліджених зон тимуса.

Ключові слова: AIRE, тимус, цукровий діабет.

Робота є фрагментом НДР «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології», державний реєстраційний номер 0112U005642.

Цукровий діабет 1 типу є багатофакторним, полігенним захворюванням, у патогенезі якого важливу роль можуть грати порушення функціонування цілої низки генів. До них відносять гени, що кодуєть молекули головного комплексу гістосумісності 1 і 2 класів, інсулін, транскрипційний фактор Foxp3, цитотоксичний лейкоцитарний антиген CTLA-4, гени, що регулюють протеасомну деградацію білків і процесінг антигенів і ін. [3]. Особливе місце серед генів, критичних для розвитку аутоімунної патології займає ген аутоімунного регулятора (AIRE) [5].

Відкриття останніх років показали, що AIRE є регулятором ектопічної транскрипції в тимусі цілого ряду периферичних тканиноспецифічних антигенів (peripheral tissue-specific antigens, PTSA) [7, 9], у тому числі таких панкреатичних антигенів як інсулін, проінсулін, проглюкагон, просоматостатин і пропанкреатичний поліпептид [4]. Зміни рівня експресії AIRE у тимусі може істотно впливати на представництво β-клітинних антигенів і в такий спосіб порушувати процес формування центральної толерантності до них, створюючи загрозу для розвитку цукрового діабету.

Метою роботи було вивчити розподіл AIRE+експресуючих клітин в тимусі щурів з експериментальним стрептозотоциновим цукровим діабетом (ЕЦД).

Матеріал та методи дослідження. Дослідження проведені на 28 самцях щурів лінії Вістар масою 230-250 г (вік 5-6 місяців). ЕЦД моделювали однократним внутріочеревинним введенням стрептозотоцину (SIGMA, США) у дозі 50 мг/кг. Щурів з 3-х тижневим ЕЦД декапітували під наркозом і виділяли тимус, що фіксували в розчині Буена (18 годин) і після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін.

Для виявлення експресії AIRE у тимусі використовували метод подвійної імунофлюоресценції. Для цього регідровані гістологічні зрізи тимуса інкубували протягом 18 годин у вологій камері при T=40°C із первинними кролячими моноклональними антитілами до

AIRE щура виробництва Santa Cruz Biotechnology (США), з мишачими моноклональними антитілами до цитокератинів щура (monoclonal Anti-Pan Cytocerafin – MAPC, клон РСК-26) виробництва Sigma (США) і з мишачими моноклональними антитілами до CD4-антигену щура виробництва Beckman Coulter (США), вже кон'югованими із флюоресцеїна ізотіоціанатом (FITC) у сполученнях AIRE-MAPC, AIRE-CD4. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин ($T=37^{\circ}\text{C}$) із вторинними антитілами в розведенні 1:64. Як вторинні антитіла використовували козячі антитіла до повної молекули Ig кролика, кон'юговані з Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США). Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і містили в суміш гліцерину й фосфатного буфера (9:1) для наступної люмінесцентної мікроскопії. Зображення, одержуване на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) або 595 нм (Texas Red) за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4922 (COHU Inc., США) вводилося в комп'ютерну систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Аналіз структури тимуса здійснювали за допомогою оригінального програмного забезпечення, розробленого на основі макро-мови програмування VIDAS.

Результати дослідження та їх обговорення. Вивчення серійних зрізів тимуса контрольних щурів, попередньо інкубованих з моноклональними антитілами до AIRE, показало, що сумарна щільність AIRE-імунопозитивних клітин (AIRE+) у корковій речовині тимуса становить 160 ± 14 на 1 мм^2 , що в 2 рази нижче, ніж у мозковій речовині й відповідає даним Anderson M. et al. (2002) про переважну локалізацію AIRE+-клітин у медулярній зоні й на кортико-медулярній границі тимуса [1]. При цьому метод подвійної імунофлюоресценції (AIRE-TR, CD4-FITC і AIRE-TR, MAPC-FITC) показав, що серед AIRE+-клітин ідентифікуються не лише епітеліоретікулоцити тимуса (AIRE+MAPC+), але й значне число тимоцитів (AIRE+CD4+). Отримані дані підтверджуються дослідженнями Suzuki E. et al. (2008), який методом проточної цитофлуориметрії й RealTime-PCR продемонстрував, що в тимусі AIRE може бути виражений у дубль-позитивних CD4+CD8+ тимоцитах і В-лімфоцитах [11]. Розвиток ЕЦД не супроводжувався змінами кількості AIRE+-клітин у корковій речовині тимуса, тоді як у мозковій речовині їх щільність популяції знижувалася на 35% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою тварин. При цьому концентрація білка AIRE у щурів з ЕЦД вірогідно знижувалася в порівнянні з контролем в AIRE+-клітинах обох досліджених зон тимуса.

Інші дослідження тканеві експресії Aire продемонстрували, що мРНК і білок Aire експресуються насамперед у лімфоїдних органах, найбільш інтенсивно – у тимусі, значно слабкіше в селезінці й лімфатичних вузлах. Імуногістохімічні дослідження показали, що серед клітин тимуса Aire найбільш виражений у медулярних епітеліоретікулоцитах (mTEC) і дендритних клітинах [1, 3]. Вивчення внутрішньоклітинної локалізації показало, що AIRE може розташовуватися як у ядрі, так і в цитоплазмі клітин. Крім цього, експресія AIRE була виявлена в тимоцитах і периферичних лімфоцитах [11]. У периферичній крові AIRE був виражений тільки в В-лімфоцитах, дендритних клітинах і макрофагах, але не в Т-лімфоцитах, а мРНК AIRE була більш інтенсивно виражена в В-лімфоцитах у порівнянні з Т-лімфоцитами. Nagafuchi S. et al. (2006) показали, що AIRE експресується також у людських периферичних CD4+ Т-лімфоцитах, і найбільше високо - в антиген- і інтерлейкін 2-стимульованих Т-клітинах (IL-2T) [10]. Дефіцит AIRE, як показали Li J. et al. (2007), порушує пізні етапи диференціювання CD4+-однопозитивних тимоцитів, приводячи до скупчення незрілих клітин цього фенотипу в тимусі [8]. Цей результат демонструє, що на додаток до індукції виразу PTSAs, AIRE може також впливати на заключні етапи дозрівання тимоцитів.

Виділення й очищення mTEC від Aire-нокаутних і від мишей дикого типу з наступною оцінкою їх ген-експресуючого профілю методом ДНК-мікрочипів (DNA-microarray) показало, що Aire дійсно регулює транскрипцію великої кількості тканиноспецифічних антигенів, у тому числі й β -клітинних (зокрема інсуліну). Цікаво, що транскрипція ряду PTSAs, наприклад таких як С-реактивний білок і глутаматдекарбоксилаза (GAD67), виявилася незалежною від Aire [4]. Aire також позитивно або негативно регулює транскрипцію в mTEC великого діапазону генів, які не кодують PTSAs. Цікавим фактом було виявлення того, що дефіцит Aire викликає збільшену сприйнятливості до стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. Крім того, макрофаги Aire (-/-) мишей продукували більш високі рівні продіабетогенного цитокіну TNF α і більш низькі рівні супресорного цитокіну IL-10 після індукції стрептозотоцинового діабету, а Aire (-/-) миші розвивали більш високу частоту виявлення аутоантитіл до клітин панкреатичних островців [6].

Висновки

1. У контрольних щурів AIRE+-клітини локалізовані переважно у медулярній зоні тимуса. Методом подвійної імуофлюоресценції встановлено, що серед AIRE+-клітин ідентифікуються як епітеліоретикулоцити тимуса (AIRE+MAPC+), так і значна кількість тимоцитів (AIRE+CD4+).

2. Розвиток ЕЦД супроводжується зниженням кількості AIRE+-клітин та концентрації білка AIRE у мозковій речовині тимуса у порівнянні з контрольною групою тварин, що може істотно впливати на представництво β -клітинних антигенів і порушувати процес формування центральної толерантності до них.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку передбачають проведення молекулярно-генетичних досліджень з метою вивчення рівня мРНК AIRE.

Список літератури

1. Anderson M. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the Aire protein / M. Anderson, E. [Yenanzi](#), L. Klein // Science.-2002.- Vol.298.-P. 1395-1401.
2. Anderson G. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance / G. Anderson, P. Lane, E. Jenkinson // Nature Rev. Immunol.-2007.-Vol. 7.-P. 954-963.
3. Chentoufi A. Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms / A. Chentoufi, N. Binder, N. Berka // Scand. J. of Immunol.-2008.-Vol. 68.-P. 1-11.
4. Derbinski J. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels/ J. Derbinski, J. Gabler, B. Brors // J. Exp. Med.- 2005.-Vol. 202.-P. 33-45.
5. Holmdahl R. Aire-ing self antigen variability and tolerance // Eur. J. Immunol.-2007.-Vol. 37.-P. 598-601.
6. Hässler S. Aire deficiency causes increased susceptibility to streptozotocin-induced murine type 1 diabetes/ S. Hässler, L. Peltonen, S. Sandler // Scand. J. Immunol.- 2008.-Vol. 67.-P. 569-580.
7. Kont V. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens/ V.Kont, M.Laan, K.Kisand // Mol. Immunol.- 2008.-Vol. 45.-P. 25-33
8. Li J. Developmental pathway of CD4+CD8- medullary thymocytes during mouse ontogeny and its defect in Aire-/-mice/ J. Li, Y. Li, J. Yao // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2007.-Vol. 104.-P. 18175-18180.
9. Mathis D. A decade of AIRE / D. Mathis, C. Benoist // Nature Reviews Immunology.- 2007.-Vol. 7.-P. 645-650.
10. Nagafuchi S. Autoimmune regulator (AIRE) gene is expressed in human activated CD4+ T-cells and regulated by mitogen-activated protein kinase pathway/ S. Nagafuchi, H. Katsuta, R. Koyanagi // Microbiol. Immunol.- 2006.-Vol. 50.-P. 979-987.
11. Suzuki E. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes / E. Suzuki, Y. Kobayashi, O. Kawano // Autoimmunity.-2008.-Vol 41.-P. 133-139.

Реферати

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПРЕССИИ АУТОИММУННОГО РЕГУЛЯТОРА AIRE В ТИМУСЕ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ
Камышный А. М.

В эксперименте изучались и обсуждались особенности экспрессии белка AIRE в тимусе крыс с экспериментальным сахарным диабетом. 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 иммуофлюоресценции 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.

Статья надійшла 20.02.2015 р.

DESCRIPTION OF AIRE AUTOIMMUNE REGULATOR EXPRESSION IN RAT THYMUS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Камышный А. М.

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. All statistical analyses were performed using EXCEL MS Office 2010 (Microsoft Corp., USA), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001) software. Results are expressed as mean values \pm SEM. Differences were considered statistically significant if the p value was <0.05 . Conclusions. 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.