

УДК 616.419:611.018.47:616.15

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ CD68 В ПЕЙЕРОВЫХ
БЛЯШКАХ КРЫС ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ
ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО ГЛИКОПРОТЕИНА НА РЕАКЦИЮ ТРАНСПЛАНТАТ
ПРОТИВ ХОЗЯИНА**

Теличко Д.С., Логинова Н.П.

Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А.Вагнера, г. Пермь,
Россия.

Резюме. Пептиды трофобластического $\beta 1$ гликопротеина являются фетоплацентарным белком с возможной иммуносупрессорной активностью, изучали терапевтический потенциал этого белка в эксперименте *in vivo*. Реципиентами были самцы крыс Wistar, не подвергавшиеся предварительной цитостатической терапии. Животным вводили трофобластический $\beta 1$ гликопротеин на фоне аллогенной внутрибрюшинной трансплантации клеток красного костного мозга в эксперименте, оценивали экспрессию CD68 в клетках пейеровых бляшек через 35 дней эксперимента. В результате показано, что при введении ТБГ количество позитивно окрашенных CD68 клеток существенно уменьшается (примерно в 3 раза), по сравнению с группой контроля.

Ключевые слова: трофобластический $\beta 1$ гликопротеин, реакция трансплантат против хозяина, пейерова бляшка, макрофаг, красный костный мозг

**IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF CD68 EXPRESSION IN RAT PEYER'S PATCHES
IN A STUDY OF SHORT PEPTIDES OF TROPHOBLASTIC GLYCOPROTEIN IN GRAFT-VERSUS-
HOST REACTION**

Telichko D.S., Loginova N.P.

Perm state medical university named after academician E.A.Vagner, Perm, Russia,

Abstract. Short peptides of trophoblastic glycoprotein are active metabolites of fetoplacental protein with a potential immunosuppressive action. Therapeutic effect of the protein was evaluated *in vivo*. Adult male Wistar rats were the recipients with no preparatory cytotoxic therapy. Trophoblastic $\beta 1$ glycoprotein was injected to animals with allogenic intraabdominal red blood marrow cells transplantation, then the amount of CD68 expressing cells in Peyer`s patches was counted after 35 days. It was established, that injection of short peptides of trophoblastic glycoprotein decreased the number of CD68 positive stained cells (nearly in 3 times) in comparing with a control group.

Keywords: trophoblastic $\beta 1$ glycoprotein, graft-versus-host reaction, peyer`s patch, macrophage, red blood marrow

Введение. Развитие реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) является нежелательным явлением при аллогенной пересадке красного костного мозга пациентам с различными лимфо-пролиферативными заболеваниями [2]. Для лечения этого состояния было предложено использовать пептиды трофобластического гликопротеина (ТБГ). Пептиды трофобластического $\beta 1$ гликопротеина (ТБГ) являются функциональным усиленным аналогом гликоделина, гормона, вырабатывающегося во время беременности у самок. Установлено, что гликоделин способен проявлять иммуномодуляторную активность, купируя реакцию трансплантат против хозяина [4]. Долгое время этапность РТПХ, ключевые органы и структуры органов, вовлеченные в этот процесс, оставались неизученными. Согласно исследованиям [7], пейеровы бляшки (ПБ) являются основным сайтом данной реакции. Изучение иммуноморфологического профиля ПБ позволяет установить эффективность иммуномодулирования ТБГ и описать течение РТПХ. Первым этапом реакции является заселение трансплантированными CTL (cytotoxic lymphocytes) $CD8^+$ клетками пейеровых бляшек; и мезентериальных лимфоузлов впоследствии. Первично, потенциал агрессивности в отношении хозяина определяется $CD11^+$ клетками, в следствие их антигенпрезентации аутоантигенов донорским цитотоксическим лимфоцитам [3]. $CD11^+$ являются подгруппой большого кластера $CD68^+$ клеток, в который так же входят и макрофаги. Следует отметить, что их функциональный потенциал реализуется в области субэпителиальной зоне пейеровых бляшек (SED – suerithelial dome) [5].

Стимулированные макрофаги способны секретировать различные цитокины и провоспалительные факторы, такие как MIP-1a и MIP-1b (CCL4) [6]. В частности, MIP-1b способен повышать уровень IL-1b, что приводит к локальной индукции $CD4^+$ наивных Т-лимфоцитов в Th17. Экспериментально показано, что при воздействии ТБГ на культуру $CD4^+$ наивных Т-лимфоцитов, их путь дифференцировки определяется в Treg клетки, тем самым осуществляя свою иммуномодуляторную и протекторную активность, в отношении прогрессирования и развития РТПХ [1]. Таким образом, количество $CD68^+$ клеток может косвенно судить об эффективности ТБГ при РТПХ.

Материалы и методы. В эксперименте задействованы самцы белых крыс линии Wistar в возрасте от 2 до 3 месяцев (массой около 250г). Выведение животных из эксперимента проводили на 35 сутки, путем декапитации. Изначально, первой группе (№1) вводили взвесь красного костного мозга (ККМ) внутрибрюшинно, без ТБГ; второй группе (№2) внутрибрюшинно вводили взвесь красного костного мозга и подкожно ТБГ; Исследовали пейеровы бляшки животных. Иммуногистохимические реакции проводили аппаратным способом, с использованием моноклональных антител (GenTex, США) к $CD68^+$ клеткам. Подсчет клеток производился ручным

способом в программе ImagePro после цифровизации изображения с помощью оптического микроскопа Olympus (все образцы стандартизированы по масштабу, равное увеличение на микроскопе при исследовании). Показателем сравнения эффективности выступило соотношение клеток в SED 1 группы к клеткам в SED 2 группы исследования. Площадь SED (в пикселях, pix) определялась на основании морфометрических данных с использованием цвето-контрастных инструментов программы.

Результаты и обсуждение. С целью нивелирования недостоверности результатов, по причине срезов на различных уровнях пейеровых бляшек, за основу оценки было взято соотношение площади SED к количеству клеток CD68^+ в этой области, из расчета, что ниша заполнена относительно равномерно. Это подтверждается фактом, что количество клеток прямопропорционально площади купола пейеровой бляшки. Таким образом, среднее значение каждого признака не будет искажать действительную картину и может служить материалом для расчетов. В исследовании получили среднее значение площади SED (pix) для 1 группы (ККМ), что составило 24786629,7 pix , а количество (шт) CD68^+ клеток 61,3. При введении ТБГ число клеток существенно уменьшается, и на среднюю площадь в 32174210,7 pix приходилось 22 позитивно окрашенных клеток. Само соотношение количество/площадь №1 к количеству/площадь №2 может представлено, как 3:1.

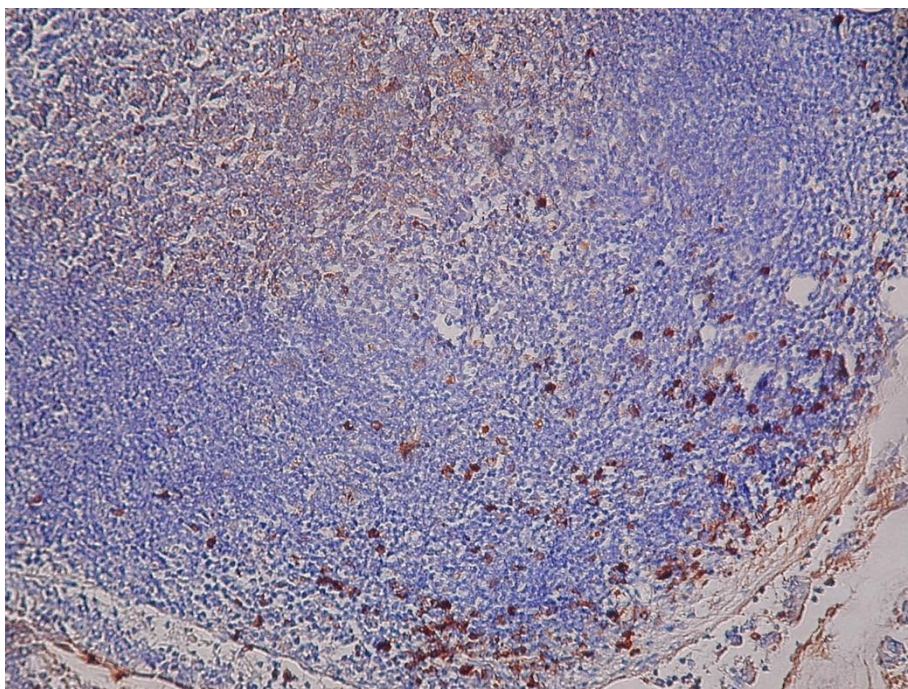


Рисунок 1. Пейерова бляшка. группа №1 (ККМ), 35 сутки. Ув.х200.

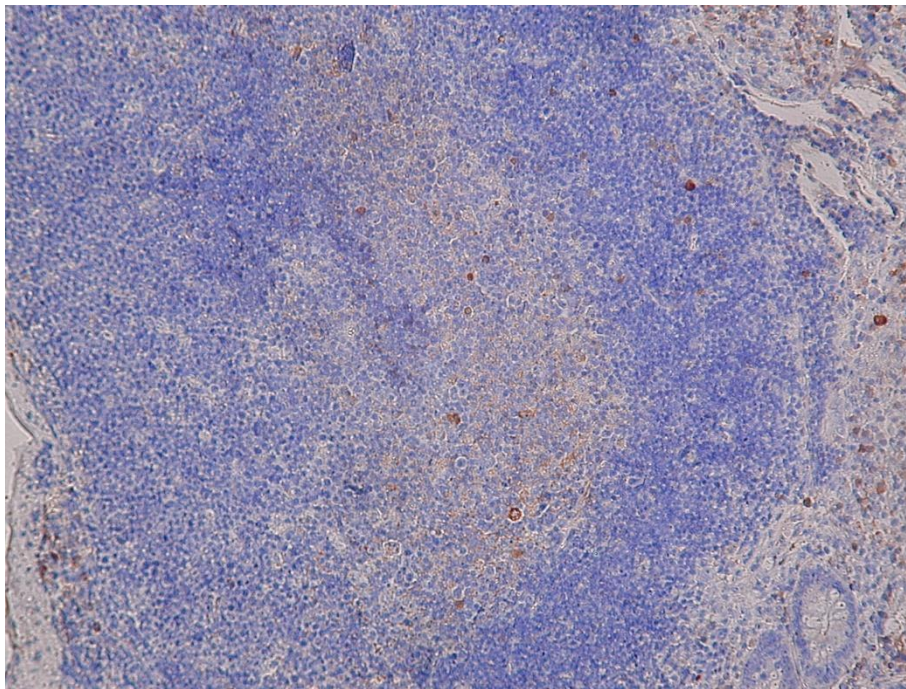


Рисунок 2. Пейерова бляшка, группа 2 (ККМ+ТБГ), 35 сутки. Ув.Х200

Выводы. Полученные результаты исследования позволяют убедительно судить об эффективности ТБГ в отношении опосредованной иммуномодуляции РТПХ, через снижение количества CD68⁺ клеток в SED ПБ.

Список литературы

1. Заморина С.А., Раев М.Б. Трофобластический β 1-гликопротеин человека как фактор дифференцировки минорных регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Treg, Th17). Роль молекул CD9 // Биологические мембраны. Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2016. – Т. 33, № 4. – С. 278-286.
2. Appelbaum, F.R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy // Nature. – 2001. – V. 411. – P. 385–389.
3. Baker B.M.B., Altman N., Podack E., Levy R.B. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice // J. Exp. Med. – 1996. – V. 183. – P 2645–2656.
4. Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. Immunomodulatory activity of glycodefin implications in allograft rejection // Clin. Exp. Immunol. – 2018. – V. 192, N 2. – P. 213-223.
5. Kelsall B.L., Strober, W. Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch // J. Exp. Med. – 1996. V. 183. P. 237–247.
6. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1 // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2002. – V. 13, N 6. – P. 455–81.

7. Murai M., Yoneyama H., Ezaki T. et al. Erratum: Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction // *Nature Immunology*. – V. 4, N 2. – P. 154–160.