



UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК МЕЗЕНТЕРИАЛЬНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ ПОТОМСТВА, ПОЛУЧЕННОГО ОТ САМОК С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПОТИРЕОЗОМ

Азизова Феруза Хусановна

Миртолипова Мохизода Абдусатторовна

Ташкентская Медицинская Академия

АННОТАЦИЯ: Данная статья посвящена выявлению гипотериоза на пролиферативную активность лимфоидных клеток в структурно-функциональных зонах МЛУ полученного в условиях экспериментального гипотиреоза беременных у матери.

Структурно-функциональные перестройки в МЛУ в процессе постнатального онтогенеза, естественно, протекают при определенном уровне пролиферации лимфоидных клеток. В физиологических условиях между процессами пролиферации и апоптоза клеток имеется определенное равновесие, позволяющее поддерживать тканевой гомеостаз. Для изучения пролиферативной активности клеток МЛУ в динамике постнатального развития у контрольных и опытных крысят, мы применили метод иммуногистохимии с использованием высокоспецифичных моноклональных антител к маркеру пролиферации.

В МЛУ 3, 7, 14, 21 и 30 суточных крысят пролиферативную активность клеток оценивали с помощью маркера - Ki-67. Ki-67 – образуется только в пролиферирующих клетках, в состоянии покоя этот белок не синтезируется, это даёт возможность использовать данный белок в качестве маркера пролиферативной активности клетки.

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

Ключевые слова: гипотиреоз беременных, иммуногистохимия, пролиферация, мезентериальные лимфатические узлы.

Azizova Feruza Khusanovna

Mirtolipova Mohizoda Abdusattorovna

Tashkent Medical Academy

ANNOTATION: This article is devoted to the identification of hypothyroidism on the proliferative activity of lymphoid cells in the structural and functional zones of MDR obtained in conditions of experimental hypothyroidism in pregnant women in the mother.

Structural and functional rearrangements in the MDR during postnatal ontogenesis naturally occur at a certain level of proliferation of lymphoid cells. Under physiological conditions, there is a certain balance between the processes of cell proliferation and apoptosis, which allows maintaining tissue homeostasis. To study the proliferative activity of MDR cells in the dynamics of postnatal development in control and experimental rat pups, we applied the method of immunohistochemistry using highly specific monoclonal antibodies to the proliferation marker.

In MDR 3, 7, 14, 21 and 30 day old rat pups, the proliferative activity of cells was assessed using the marker Ki-67. Ki-67 - is formed only in proliferating cells; in a state of rest, this protein is not synthesized, this makes it possible to use this protein as a marker of cell proliferative activity

Key words: hypothyroidism in pregnant women, immunohistochemistry, proliferation, mesenteric lymph nodes.

Азизова Феруза Хусановна

Миртолипова Мохизода Абдусатторовна

Тошкент Тиббиёт Академияси

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

ANNOTATSIYA: Ushbu maqola eksperimental gipotiroidizm sharoitida olingan nasllarning mezenterial limfa tugunlarini (MLT) postnatal rivojlanishini strukturaviy va funktsional xususiyatlarini o'rganishga bag'ishlangan.

Postnatal ontogenez davrida MLT dagi strukturaviy va funktsional o'zgarishlar tabiiy ravishda limfoid hujayralarda proliferatsiyasining ma'lum darajasi sodir bo'ladi. Fiziologik sharoitda hujayra proliferatsiyasi va apoptoz jarayonlari o'rtasida ma'lum bir muvozanat mavjud bo'lib, bu to'qima gomeostazini saqlashga imkon beradi. Nazorat va eksperimental kalamush bolalarida postnatal rivojlanish dinamikasida MLT hujayralarining proliferativ faolligini o'rganish uchun biz proliferatsiya belgisiga yuqori o'ziga xos monoklonal antikordlardan foydalangan holda immunogistokimyo usulini qo'lladik.

MLT 3, 7, 14, 21 va 30 kunlik kalamush bolalarida hujayralarning proliferativ faolligi Ki-67 markeri yordamida baholandi. Ki-67 - faqat tinim holatida proliferatsiyalanuvchi hujayralarda hosil bo'ladi, oqsil sintez qilinmaydi, bu esa oqsilni hujayra proliferativ faolligining belgisi sifatida foydalanishga imkon beradi.

Kalit so'zlar: homiladorlikda gipotiroiz, immunogistokimyo, proliferatsiya, tutqich limfa tugunlari.

Актуальность проблемы. Развитие организма - сложный биологический процесс, он характеризуется не только количественным нарастанием массы тела, но и качественными структурными изменениями во многих органах и тканях, направленными на поддержание гомеостаза организма. В процессе эволюционного развития организма возникают новые координационные механизмы, приводящие к образованию структурных и функциональных взаимосвязей. Эти

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

взаимосвязи обеспечивают интеграцию деятельности различных органов и систем. Тесная взаимосвязь между иммунной и эндокринной системами показана в ряде работ [1,2,8,]. Установлено, что различные поражения эндокринных органов сопровождаются определенными иммунными сдвигами в организме, и, в свою очередь, те или иные иммунные расстройства приводят к нарушениям эндокринных функции организма [1, 10, 15,]. В этом плане взаимосвязь щитовидной железы с иммунной системой заслуживает особого внимания.

Среди дисфункций щитовидной железы особое место занимает так называемый «материнский гипотиреоз» (гипотиреоз беременных или гестационный гипотиреоз), который наблюдается у 2-2,5% всех беременных женщин и может проявляться в субклинической или манифестной формах [12, 14]. Актуальность проблемы гипотиреоза беременных в практике врачей различных специальностей несомненна, поскольку при дефиците тироидных гормонов, необходимых для нормального развития и функционирования практически каждой клетки организма человека, развиваются тяжелые изменения всех без исключения органов и систем [5, 6].

Целью исследования изучения пролиферативной активности клеток МЛУ, рожденных от самок с экспериментальным гипотиреозом, установлено снижение уровня экспрессии маркера Ki-67 в лимфоидных клетках в виде слабого окрашивания их ядер.

Материал и методы.

Иммуногистохимическое определение пролиферативной активности клеток проводили с помощью иммунопероксидазного метода на парафиновых срезах МЛУ (толщиной 4-5 мкм) с использованием моноклонального антитела Ki67, который идентифицирует ядерный антиген, присутствующий на всех стадиях клеточного цикла кроме G0.

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

После депарафинизации и обезвоживания блокировали эндогенную пероксидазу, обрабатывая срезы 0,3%-м раствором H_2O_2 , затем промывали их дистиллированной водой и для демаскировки антигенных детерминант подвергали температурной обработке в буферах pH 6,0 в СВЧ-печи длительностью 20 мин при 98°C, после чего промывали, наносили моноклональные антитела Ki-67 и инкубировали во влажной камере. После инкубации с антителами срезы промывали, наносили авидин-биотиновый комплекс, конъюгированный с пероксидазой, ядра докрашивали гематоксилином. Конечный продукт реакции - окрашивание в коричневый цвет ядер клеток, где выявляется антиген Ki-67.

Пролиферативную активность лимфоидных клеток в структурно-функциональных зонах МЛУ оценивали по индексу пролиферации ИП. ИП определяли путём подсчета абсолютного числа Ki-67-позитивных клеток на 100 клеток соответствующих структур МЛУ при увеличении светового микроскопа x400 с последующим вычислением показателя в процентах.

Результаты и обсуждение.

Для изучения пролиферативной активности клеток МЛУ в динамике постнатального развития у контрольных и опытных крысят, мы применили метод иммуногистохимии с использованием высокоспецифичных моноклональных антител к маркеру пролиферации.

В МЛУ 3, 7, 14, 21 и 30 суточных крысят пролиферативную активность клеток оценивали с помощью маркера - Ki-67. Ki-67 — образуется только в пролиферирующих клетках, в состоянии покоя этот белок не синтезируется, это даёт возможность использовать данный белок в качестве маркера пролиферативной активности клетки.

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

У крыс контрольной группы в МЛУ положительная реакция на Ki-67 отмечалась в виде окрашивания ядер паренхиматозных и стромальных клеток. Метку включали бласты, клетки лимфо- и моноцитопоза, а клетки стромы метились очень редко. При этом, в лимфобластах, пролимфоцитах, плазмобластах отмечалась сильная - «+++», в лимфоцитах и плазмацитах средняя - «++» экспрессия ядерной реакции в отношении маркера Ki-67. Наиболее высокая экспрессия Ki-67 позитивных клеток наблюдалась на 7-14 сутки постнатального развития крысят.

Подсчет числа клеток показал, что в первые 3 суток, когда отсутствуют сформированные структуры узла, плотность лимфоидных и стромальных клеток низкая и составляла $1948 \pm 87,6$ клеток на площадь 90×10^3 мкм², из них мечеными Ki-67 оказалось $98,7 \pm 4,2$ клеток, индекс пролиферации – 5,1%. Среди меченых клеток основная часть - лимфобласты и пролимфоциты; среди фибробластов и ретикулярных клеток меченые - единичные.

Через 7 суток после рождения крыс, когда дифференцируются в узлах лишь корковое и мозговое вещества, плотность клеток коркового вещества оказалось равной 2200 ± 110 , меченые из них $303,4 \pm 15,1$, а индекс пролиферации 13,8%. В мозговых тяжах соответственно $1550 \pm 12,9$, $152,0 \pm 7,3$ и 9,8%.

Таким образом, если на 3 сутки по всей ткани лимфатического узла индекс пролиферации составлял всего 5,1%, то с дифференцировкой к 7 суткам коркового и мозгового вещества основная масса пролиферирующих клеток локализуется в корковом веществе. В корковом веществе меченые клетки представлены лимфобластами, пролимфоцитами, плазмобластами и монобластами.



UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

Через 2 недели после рождения с формированием различных структурно-функциональных зон мезентериальных лимфатических узлов плотность клеток и индекс пролиферации определялись отдельно (табл. 6.1).

Таблица 1.

Динамика пролиферативной активности различных зон МЛУ в раннем постнатальном онтогенезе ($M \pm m$, %, $n=8$)

Зоны	Параметры	Возраст, сутки после рождения		
		14	21	30
Лимфоидные фолликулы (В-зона)	Плотность клеток	1722,0 $\pm$ 138,0	2023,0 $\pm$ 141,6	2126,0 $\pm$ 133,8
	Количество меченых клеток	171 $\pm$ 12,0	119 $\pm$ 8,3	132 $\pm$ 8,0
	Индекс пролиферации	10,0	5,9	6,2
Паракортикальная зона (Т-зона)	Плотность клеток	1314 $\pm$ 102,0	1599 $\pm$ 147,0	1694 $\pm$ 145,2
	Количество меченых клеток	163 $\pm$ 15,0	128 $\pm$ 12,6	135 $\pm$ 9,6
	Индекс пролиферации	12,4	8,0	7,9
Корковое плато (Т-зона)	Плотность клеток	1985 $\pm$ 166,0	2492 $\pm$ 117,0	2712 $\pm$ 133,0
	Количество меченых клеток	228 $\pm$ 14,0	159 $\pm$ 9,6	155 $\pm$ 7,5

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

	Индекс пролиферации	11,5	6,4	5,7
Мозговые тяги (В-зона)	Плотность клеток	1543±92,0	1654±103,5	1809±110,8
	Количество меченых клеток	125±6,8	74±6,4	87±5,0
	Индекс пролиферации	8,1	4,5	4,8

Примечание: * – различия значений достоверны по сравнению с предыдущим сроком, $P < 0,05$, (до 14 суток после рождения зоны МЛУ не идентифицируются)

Как видно из таблицы 1, в корковом веществе и его структурах пролиферативная активность высокая, особенно в паракортикальной, где обособляются Т-зависимые клетки. Метку включали бласты, клетки лимфо- и моноцитопоза, а клетки стромы метились очень редко.

На 21 сутки после рождения, когда в лимфатическом узле завершается структурно-функциональное становление, при той же почти плотности клеток ($P > 0,05$) в каждой из изучаемых зон, существенно ($P < 0,001$) снижалась в них доля меченых клеток. В каждой из зон МЛУ разница составляла в среднем 57-60%. Такое уменьшение пролиферации во всех структурах узла также подтверждает представления о завершении становления структурно-функциональных зон органа, установлении динамического равновесия между процессами пролиферации, дифференцировки и рециркуляции, обеспечивающими гомеоморфоз как органа в целом, так и его составляющих структур.

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

В результате изучения пролиферативной активности клеток МЛУ, рожденных от самок с экспериментальным гипотиреозом, установлено некоторое снижение уровня экспрессии маркера Ki-67 в лимфоидных клетках в виде слабого окрашивания их ядер.

Следует отметить, что по локализации и интенсивности продукта иммуногистохимической реакции в клетках МЛУ существенных различий между контролем и опытными группами не удалось обнаружить. Эти различия, указывающие на состояние процессов пролиферации в МЛУ, были получены при подсчете числа меченых клеток.

В связи с отсутствием на 3 сутки эксперимента формирующихся структурно-функциональных зон подсчет числа Ki-67 меченых клеток и определение ИМЯ осуществлен нами на массу диффузной лимфоидной ткани.

Исследование пролиферативной активности клеток МЛУ у опытной группы крысят показало, что на 3 сутки после рождения при плотности клеток $1876 \pm 90,4$ (при контроле - $1948 \pm 87,6$) на единицу площади, мечеными из них оказались $78,8 \pm 3,9$ клеток. Следовательно, индекс пролиферации равен - 4,2%, т.е. 1,2 раза меньше, чем аналогичные показатели контроля.

Через 7 суток после рождения у опытной группы крыс отмечалось уменьшение плотности и числа Ki-67 меченых клеток как в корковом веществе, так и в мозговых тяжах, индекс пролиферации соответственно в 2 и 1,8 раза был меньше, чем показатели контроля. В корковом веществе меченые клетки были представлены лимфобластами, пролимфоцитами, плазмобластами и монобластами.

Через 2 недели после рождения с формированием различных структурно-функциональных зон мезентериальных лимфатических узлов

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

плотность клеток и индекс пролиферации определялись отдельно (табл. 6.2).

Как видно из таблицы 1, во все сроки исследования во всех структурно-функциональных зонах МЛУ отмечалось снижение плотности распределения клеток, числа Ki-67 меченых клеток и показателя индекса пролиферации у опытной группы животных. Наиболее выраженные изменения пролиферации клеток наблюдалась на 14 сутки постнатальной жизни. В этот срок эксперимента индекс пролиферации у опытных достоверно снижался в Т-зависимых зонах органа: в корковом плато ($7,1 \pm$ против $11,5 \pm$) и паракортикальной зоне ($6,7 \pm$ против $12,4 \pm$), в этих зонах индекс пролиферации на 38 – 46% был ниже показателей контроля. В В-зависимых (лимфоидные фолликулы, мозговые тяжи) зонах индекс пролиферации имел тенденцию к недостоверному снижению. Эта закономерность сохранялась и через 21 день эксперимента.

Таблица 2.

Динамика пролиферативной активности различных зон МЛУ потомства, полученного от самок с экспериментальным гипотиреозом в раннем постнатальном онтогенезе ($M \pm m$, %, $n=8$)

Зоны	Параметры	Возраст, сутки после рождения		
		14	21	30
Лимфоидные фолликулы (В-зона)	Плотность клеток	$1608,0 \pm 138,0$	$1921,0 \pm 141,6$	$2021,0 \pm 133,8$
	Количество меченых клеток	117	90	109
	Индекс пролиферации	7,3	4,7	5,4

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

Паракорти- кальная зона (Т-зона)	Плотность клеток	1160,0 $\pm$ 101,5	1394,0 $\pm$ 99,4	1494,0 $\pm$ 101,8
	Количество меченых клеток	78	109	117
	Индекс пролиферации	6,7*	7,8	7,8
Корковое плато (Т-зона)	Плотность клеток	1792,0 $\pm$ 139,0	2313,0 $\pm$ 198,4	2531,0 $\pm$ 190,0
	Количество меченых клеток	127	130	134
	Индекс пролиферации	7,1*	5,6	5,3
Мозговые тяжи (В-зона)	Плотность клеток	1445,0 $\pm$ 123,4	1553,0 $\pm$ 132,3	1705,0 $\pm$ 162,0
	Количество меченых клеток	101	62	72
	Индекс пролиферации	7,0	4,0	4,2

Примечание: * – различия значений достоверны по сравнению с контролем, $P < 0,05$, (до 14 суток после рождения зоны МЛУ не идентифицируются)

Через 30 дней опытов у крысят, рожденных от самок с экспериментальным гипотиреозом низкие показатели индекса пролиферации сохранились в паракортикальной зоне, а в остальных

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY international scientific conference

структурно-функциональных зонах существенно не отличались от показателей контроля.

Выводы: Проведенные исследования позволили установить уровень пролиферативной активности лимфоидных клеток МЛУ в возрастном аспекте у крысят, полученных от здоровых самок и от самок с экспериментально вызванным гипотиреозом.

Выявлено, что у потомства, полученного от здоровых самок пролиферативная активность лимфоидной ткани узла в изучаемые сроки постнатального онтогенеза претерпевает закономерные изменения, соответствующие процессам развития и становления органа, его структурно-функциональных зон. Высокий уровень пролиферации клеток на 7-14 сутки развития сменяется существенным уменьшением клеточного деления по мере завершения становления (21-30 сутки) органа и его структурно-функциональных зон. Динамическое равновесие между различными популяциями лимфоидных клеток обеспечивает структурно-функциональный гомеостаз лимфатического узла.

Экспериментально индуцированный гипотиреоз у самок приводит к ингибированию пролиферативной активности лимфоидных клеток МЛУ потомства, особенно, в Т-зависимых зонах органа.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Азизова Ф. Х. и др. Структурные механизмы нарушений постнатального морфогенеза органов иммунной системы потомства, рожденного в условиях тиреоидной гипофункции у матери //Oriental Journal of Medicine and Pharmacology. – 2022. – Т. 2. – №. 1. – С. 116-123.
2. Зуфаров К.А., Тухтаев К.Р. Органы иммунной системы (структурные и функциональные аспекты). Ташкент: Фан, 1987. 184 с.;

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

3. Andersen S.L, Olsen J, Laurberg P. Foetal programming by maternal thyroid disease//Clin Endocrinol (Oxf). 2015 Dec;83(6):751-8. doi: 10.1111/cen.12744. Epub 2015 Mar 13.
4. Anne H. van der Spek, Eric Fliers and Anita Boelen. Thyroid hormone metabolism in innate immune cells// Journal of Endocrinology.- 2017, V.236. - R67–R81
5. Grace Mengqin Ge, Miriam T.Y. Leung, Kenneth K.C.Man et all. Maternal thyroid dysfunction during pregnancy and the risk of adverse outcomes in the offspring: a systematic review and meta-analysis//J.Clin. Endocrinol. Metab. - 2020 Dec. 1;105(12):555.
6. Jaeger M., Netea-Maier R. Thyrotrophin and thyroxine support immune homeostasis in humans//Biology, Medicine, Published 17 January 2021.
7. [Leah M. Thornton Hampton](#), [Miranda G. Finch](#), [Christopher J. Martyniuk](#), [Barney J. Venables](#). Developmental thyroid disruption causes long-term impacts on immune cell function and transcriptional responses to pathogen in a small fish model//Scientific Reports volume 11, Article number: 14496 (2021).
8. Khasanov B. Maternal toxic hepatitis, structural and functional formation of the lean intestine of the offspring in the dynamics of early postnatal ontogenesis. The Scientific Heritage. 2021. (78-2), 33-37;
9. María C.O., Henny H., Karen B. et.all. Imprinting of maternal thyroid hormones in the offspring//International Reviews Of Immunology.- 2017.- 36(1):1-16.
10. María del Mar Montesinos, Claudia Gabriela Pellizas. Thyroid Hormone Action on Innate Immunity// Front. Endocrinol., 04 June 2019, Volume 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00350>

UNIVERSAL INSIGHTS CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIETY

international scientific conference

11. Moog N.K., [Entringer](#) S. Influence of maternal thyroid hormones during gestation on fetal brain development// [Neuroscience. - 2017 Feb.7. - 342:68–100.](#)
12. Moreno-Reyes R., Glinioer D., Van Oyen H., Vandevijvere S. High prevalence of thyroid disorders in pregnant women in a mildly iodine-deficient country: a population-based study. I Clin EndocrinolMetab. 2013;98(9):3694-701. doi: 10.1210/jc.2013-2149.
13. Pakkila F., Männistö T., Surcel HM., Ruukonen A. et al. Maternal thyroid dysfunction during pregnancy and thyroid function of her child in adolescence/J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013 Mar;98(3):965-72.
14. [Sawyer Huget-Penner, Denice S. Feig](#) Maternal thyroid disease and its effects on the fetus and perinatal outcomes// [Prenatal Diagnosis.- First published: 17 March 2020.- <https://doi.org/10.1002/pd.5684>](#)
15. Zhang C, Yang X, Zhang Y, Guo F, Yang S, Peeters RP, Korevaar TIM, Fan J, Huang HF.J. Association Between Maternal Thyroid Hormones and Birth Weight at Early and Late Pregnancy// J Clin Endocrinol Metab. 2019 Dec 1;104(12):5853-5863.
16. Zhang F., Chen J. [et al.] Subclinical hypothyroidism in pregnant rats impaired learning and memory of their offspring by promoting the p75NTR signal pathway // Endocrine Connections. –2018 (7), – P. 688-697.