

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

АРАВІЦЬКИЙ ЄВГЕН ОЛЕГОВИЧ



УДК: 611.43:612.65:[611.43.013:[616-097+615.357]].08

**БУДОВА ТА МОРФОГЕНЕЗ ТИМУСУ В ПОСТНАТАЛЬНОМУ ПЕРІОДІ
ПІСЛЯ ВНУТРІШНЬОУТРОБНОГО ВВЕДЕННЯ СТАФІЛОКОКОВОГО
АНАТОКСИНУ ТА ДЕКСАМЕТАЗОНУ
(анатомо-експериментальне дослідження)**

14.03.01 – нормальна анатомія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Наукові керівники:

- Заслужений діяч науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Волошин Микола Анатолійович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України;
- доктор біологічних наук, професор **Куц Оксана Георгіївна**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри нормальної фізіології.

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор **Довгаль Геннадій Володимирович**, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», завідувач кафедри анатомії людини;
- доктор медичних наук, професор **Гунас Ігор Валерійович**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, професор кафедри анатомії людини.

Захист відбудеться «12» вересня 2019 р. об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, Україна, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 21 » червня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



Т.В. Іваненко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Тимус є ключовим органом у системі імуноендокринної регуляції, виконуючи роль імунного органу й ендокринної залози, здійснюючи при цьому важливі функції, що забезпечує структурне і функціональне дозрівання імункомпетентних клітин [Волошин М.А. та ін., 2010; Wilson S. et al., 2014].

На думку багатьох дослідників, тимус і на теперішній час залишається маловивченим органом, який протягом життя людини зазнає морфологічної трансформації [Кузьменко Л.Г. та ін., 2013; Vegum M. et al., 2010]. Вплив тимусу та його імуноендокринні взаємодії з іншими органами мають особливе значення в дитячому віці, забезпечуючи нормальний розвиток дитини, підтримуючи імунну реактивність та сприяючи адаптації до різних факторів навколишнього середовища [Csaba G., 2016]. За умов антенатального несприятливого впливу на тимус, виникають зміни у темпах і строках розвитку та формування імунної системи та становленні морфо-функціональних одиниць багатьох органів [Волошин Н.А. и др., 2001]. Саме тому останнім часом, в умовах погіршення екологічного оточення, підвищення фармакологічного навантаження, постійного підсилення рівня стресу зростає зацікавленість провідних фахівців до будови та функцій імунної системи [Головацький А.С., 2018, Гумінський Ю.Й., 2015, Гунас І.В., 2015, Пікалюк В.С., 2017, Сирцов В.К., 2014, Чайковський Ю.Б., 2015, Черкасов В.Г., Черкасов Е.В. 2016, Шепітько В.І., 2017, Шиян Д.Н., 2018]. Крім того, проблема антенатального здоров'я і здоров'я в онтогенезі є одним із пріоритетних напрямків і основою Концепції Національного здоров'я України (Загальнодержавна програма «Здоров'я – 2020 український вимір» від 31.10.2011 р. № 1164-р).

Зміни будови тимусу в постнатальному періоді, а також його морфогенез у відповідь на внутрішньоутробну дію антигенів та гормонів вивчені недостатньо. Це обумовлено відсутністю комплексних досліджень даного органу, складністю прижиттєвого морфологічного його вивчення у людини.

Порушення дозрівання й диференціювання основних структур тимусу є провідною ланкою в розвитку імунопатологічних станів [Brozek J. L. et al., 2010; Yuksel N. et al., 2010], а також дезадаптаційного синдрому у новонароджених та дітей першого року життя.

У літературі описані морфо-функціональні особливості тимусу плодів від матерів, вагітність яких була ускладнена гестозом [Dцrnmann R. et al., 2017], інфекційними захворюваннями вірусної етіології, пневмонією [Кулида Л.В. и др., 2010; Ткаченко Ю.П., Леженко Г.О. та ін., 2012]. Вважають, що в основі порушень формування і дозрівання імунної системи плода лежить її пригнічення внаслідок надмірної антигенної стимуляції інфекційними факторами [Волошин М.А. та ін., 2012] та іншими чужорідними антигенами [Шумная Т.Е., 2015; Aydemir I. et al., 2018], що надходять від матері, при порушенні гемато-плацентарного бар'єру. Внаслідок цього великі кількості імунологічно незрілих PNA⁺-лімфоцитів [Волошин М.А. та ін., 2012] надходять у вторинні лімфоїдні органи, що викликає зміни в органогенезі різної тривалості та може бути основою розвитку патології у дорослому віці.

В наш час, існують протиріччя в розумінні як спрямованості спровокованих стресом імунних зрушень, так і механізмів їх формування [Ansari A. R. et al., 2017]. Значне число досліджень демонструє імуносупресивну дію хронічного стресу на організм людини та експериментальних тварин [Moleriu R. D. et al., 2014; Situm K. et al., 2015], проте в ряді робіт показана його здатність потенціювати імунну відповідь [Сорокина И.В. и др., 2016; Gatford K.L. et al., 2017]. Підвищена кількість глюкокортикоїдів в організмі відображає стан стресу та справляє пригнічуючу та руйнівну дію на імунну систему. Вплив стресу, насамперед, спрямований на клітинну ланку імунітету, тому особливої актуальності має розгляд проблеми впливу гормональних препаратів на внутрішньоутробний розвиток тимусу та постнатальне формування адаптивного клітинного імунітету.

Застосування глюкокортикостероїдів під час вагітності може нести не тільки одномоментні негативні наслідки для матері та плоду – народження дітей з низькою масою тіла і тератогенний ефект [Situm K. et al., 2015], але й довготривалі – вплив на захворюваність в дорослому віці.

Таким чином, усе вищезгадане дає підстави сподіватись, що вивчення тимусу в залежності від характеру перебігу вагітності, а саме його морфогенез у відповідь на внутрішньоутробну дію антигенів та гормонів, що приводить до відгуку всієї системи клітинного імунітету у постнатальному періоді, мають важливе теоретичне та практичне значення і є актуальними в даний час.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Тема дисертації є складовою частиною НДР кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету «Реактивність органів новонароджених після дії антигенів та факторів різної природи у внутрішньоутробному періоді» (номер державної реєстрації 0115U003875). Автором проведено дослідження особливостей будови та морфогенезу тимусу щурів. Тема дисертації затверджена проблемною комісією МОЗ та НАМН України «Морфологія людини» (протокол №11 від 03.11.2015 р.)

Мета дослідження: Встановити закономірності будови та морфогенезу тимусу щурів у постнатальному періоді після внутрішньоутробної дії стафілококового анатоксину та дексаметазону.

Завдання дослідження:

1. Вивчити морфометричні показники маси, співвідношення площі коркової та мозкової речовини тимусу щурів в постнатальному періоді в динаміці, в нормі та після внутрішньоутробного впливу дексаметазону та стафілококового анатоксину.

2. Дослідити динаміку клітинного складу субкапсулярної зони, внутрішньої кори та мозкової речовини тимусу щурів у постнатальному періоді в нормі та після внутрішньоутробного гормонального й антигенного впливу.

3. Встановити особливості розподілу рецепторів до лектинів RCA (рицини), PNA (арахісу), LCA (сочевиці), WGA (зародків пшениці) у тимусі в нормі та після пренатального впливу дексаметазону та стафілококового анатоксину.

4. Вивчити розподіл цитокератинів 5/14 у клітинах епітелію коркової речовини у нормі та після пренатального гормонального й антигенного впливу.

Об'єкт дослідження: закономірності морфогенезу тимусу в ранньому постнатальному періоді.

Предмет дослідження: клітинний склад, стан коркової та мозкової речовини, розподіл цитокератинів та рецепторів до лектинів в тимусі в нормі та після внутрішньоплідного введення дексаметазону та стафілококового анатоксину.

Методи дослідження: описовим, макро- та мікроскопічним, органометричним методом визначена абсолютна та відносна маса тимусу; морфометричним методом визначено розподіл відносної кількості клітин, площу морфо-функціональних зон; лектингістохімічним методом описано розподіл рецепторів до лектинів сочевиці (LCA), арахісу (PNA), рицини (RCA), зародків пшениці (WGA); імуногістохімічним методом описано розподіл CK5/14⁺-епітеліальних клітин; математичним методом та за допомогою комп'ютерного аналізу зображень підраховано структурні елементи, площу та інтенсивність імунопозитивного матеріалу; статистичним методом визначена достовірність отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Результати дослідження розширюють сучасні уявлення про морфогенез та будову тимусу щурів у постнатальному періоді розвитку.

Уточнено, що після пренатального гормонального та антигенного впливу відбуваються зміни співвідношення коркової та мозкової речовини за рахунок розширення субкапсулярної зони в ранньому постнатальному періоді та зменшення внутрішньої кори протягом першого місяця життя.

Доповнено уявлення про пренатальний вплив дексаметазону на співвідношення клітин за рахунок зниження кількості лімфоцитів різного діаметру протягом першого місяця життя, та епітеліальних клітин з третього тижня життя, найбільш виражене у корковій речовині, та збільшення кількості клітин з фігурами мітозу й у стадії апоптозу протягом перших десяти діб.

Вперше доведено, що після введення гормону спостерігається збільшення кількості LCA⁺-дендритних клітин та кількості рецепторів до лектину рицини у перші два тижня та зменшення кількості WGA⁺- та CK5/14⁺-епітеліальних клітин у перший місяць та кількості рецепторів до лектину арахісу у перші 2 доби постнатального життя.

Розширено дані відносно пренатального впливу стафілококового анатоксину на співвідношення клітин за рахунок випереджувального збільшення кількості незрілих форм лімфоцитів у ранньому перинатальному періоді, збільшенню кількості гинучих клітин та клітин, що мітотично поділяються у перші три доби життя.

Вперше показано, що у антигенпреміюваних щурів відбувається збільшення кількості LCA⁺-дендритних клітин у перші три доби життя, кількості WGA⁺-епітеліоретикулоцитів та рецепторів до лектину рицини та арахісу у перші п'ять діб, кількості CK5/14⁺-епітеліальних клітин у перший місяць життя.

Практичне значення одержаних результатів. Проведений експеримент дозволить поглибити знання про механізми антигенного та гормонального впливу на постнатальний стан та морфогенез імунної системи. Після пренатальної дії дексаметазону та стафілококового анатоксину спостерігаються зміни темпів і термінів морфогенезу імунних органів, зокрема, тимусу щурів, що проявляється зміною співвідношення коркової та мозкової речовин тимусу та субпопуляцій клітин тимусу в ранньому постнатальному періоді. Порушення формування тимусу

може стати підґрунтям для розвитку аутоімунних, алергічних та інфекційних захворювань у дітей раннього віку. Основні положення та висновки дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі та при проведенні наукових досліджень на кафедрі клінічної анатомії і оперативної хірургії ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», кафедрі морфології медичного інституту Сумського державного університету, на кафедрі гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету, кафедрі анатомії людини ім. М.Г. Туркевича ВДНЗУ «Буковинський державний медичний університет», кафедрі анатомії людини ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійно завершеною науковою працею. Автор самостійно здійснив патентний пошук та аналіз літературних джерел. Здобувачем виконано експеримент із внутрішньоплідного введення стафілококового анатоксину, дексаметазону, виведення експериментальних тварин із експерименту, проведено описове макро- та мікроскопічне, морфометричне, органометричне, гістологічне, гістохімічне, лектингістохімічне, імуногістохімічне дослідження та статистичну обробку отриманих результатів, фотодокументацію. Спільно з науковими керівниками проведено аналіз та узагальнення отриманих результатів, сформульовані основні положення і висновки роботи. Автором написані всі розділи дисертації та автореферат, оформлено наукові публікації (використано фактичний матеріал, отриманий автором у процесі виконання роботи). Дисертант, спільно з співавторами, брав участь у розробці й апробації нового способу моделювання внутрішньоплідної дії глюкокортикоїдів (патент України на корисну модель № 112288).

Апробація результатів дисертації відбулась на засіданні кафедр нормальної фізіології, анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії, патологічної анатомії і судової медицини з основами права, мікробіології, вірусології та імунології, патологічної фізіології, гістології, цитології та ембріології Запорізького державного медичного університету МОЗ України 12.02.2019 р.

Результати досліджень були представлені на Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я», Запоріжжя – 2015; VI конгресі анатомів, гістологів, ембріологів та топографоанатомів України, Запоріжжя – 2015; Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я», Полтава – 2016; Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017», Запоріжжя – 2017; 86 науково-практичній конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю «Інновації в медицині», Івано-Франківськ – 2017; Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я», Запоріжжя – 2017; Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я», Полтава – 2017; Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні наукові інновації», Київ – 2017; 71 міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017», Мінськ, Беларусь – 2017; III міжнародній науково-практичній конференції «Медико-фармацевтичний

форум – 2017», Київ – 2017; Международной научно-практической конференции «Приоритеты современной науки», Киев 2017; Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання сучасної медицини і фармації» (до 50-річчя заснування ЗДМУ), Запоріжжя – 2018.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових праць (з них 6 – без співавторів), у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях, з них 4 у виданнях, що входять до міжнародних наукометричних баз, 8 тез у матеріалах наукових конгресів і конференцій; отримано 1 патент на корисну модель № 112288.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 210 сторінках, складається із анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, 5 розділів власних досліджень, розділу аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку літератури з 242 джерел (з яких 119 написані кирилицею, 123 латиницею) та додатків. Робота ілюстрована 74 рисунками та 42 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріал і методи дослідження. Робота виконана на 192 білих щурах лінії Вістар. При роботі з експериментальними тваринами керувалися «Європейською конвенцією з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 18 березня 1986 р.), положеннями «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених указом МОЗ України №753 від 12 серпня 1997 р., а також «Спільними етичними принципами експериментів над тваринами», затвердженими на I Національному конгресі з біоетики (Київ, 2001р.) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Закон від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV, редакція від 09 грудня 2015 р., підстава 766-19). Об'єктом дослідження був тимус щурів з 1-ї по 30-у добу після народження. Досліджуваних тварин розподілили на 4 групи. Перша група (Int) – інтактна. Плодам вагітних самок другої групи (Dex) на 18-у добу вагітності вводили 0,05 мл 0,4 % розчину дексаметазону у розведенні 1:40. Плодам тварин третьої групи (SA) на 18-у добу вагітності вводили 0,05 мл стафілококового анатоксину (SA) (10-14 одиниць зв'язування у 1 мл), розведеного у 10 разів. Четверта група (K) – контрольна, щурам якої вводили фізіологічний розчин у еквівалентному об'ємі. Датований термін вагітності встановлювали методом вагінальних мазків. Вилучення тимусу здійснювалось з урахуванням добових коливань клітинної популяції лімфоїдних органів, з 13⁰⁰ по 14⁰⁰ на 1-у, 2-у, 3-ю 5-у, 9-у, 14-у, 21-у та 30-у добу після народження.

Новонароджених щурів зважували на аптечних вагах (г), вимірювали тім'яно-куприкову відстань (мм), тимус зважували на торсіонних вагах (мг), вираховували його відносну масу у відсотках до маси тварини, фіксували в рідині Буена при кімнатній температурі протягом 24-х годин, та промивали у проточній воді протягом доби. Надалі зневоднювали у спиртах і заливали у парафінові блоки, орієнтуючи орган апікальною частиною до площини зрізу, товщина зрізів становила 4 мкм. Для оглядового морфометричного дослідження використовували забарвлення ШЙК з дофарбуванням ядер гематоксилином Ерліха.

Вивчали відносну площу, яку займають субкапсулярна зона, внутрішня кора, корково-мозкова зона та мозкова речовина за допомогою програми аналізу графічних зображень AxioVision Rel. 4.8. Підраховували абсолютну та відносну кількість клітин морфо-функціональних зон тимусу з використанням комп'ютерної програми ImageJ на умовній одиниці площі з перерахунком отриманих даних на 1500 мкм².

Вивчення розподілу рецепторів до лектинів проводили з використанням стандартних наборів лектинів НВК «Лектинотест» (м. Львів). Для ідентифікації вуглеводних залишків β -D-галактози, що виявляють PNA⁺-лімфоцити використовували лектин арахісу (PNA); залишків β -D-галактози, екранованою сіаловою кислотою, що виявляють RCA⁺-лімфоцити, застосовували лектин рицини (RCA); залишків N-ацетилглюкозаміну, що виявляють WGA⁺-епітеліоретикулоцити використовували лектин зародків пшениці (WGA); залишків α -D-манози, що виявляють LCA⁺-дендритні клітини застосовували лектин сочевиці (LCA). Для цього попередньо підготовлені зрізи депарафінували, здійснювали регідратацію, з подальшою інкубацією з розчином відповідного лектину, і, надалі, хромогеном (3,3-діамінобензидин) для візуалізації місць зв'язування лектинів з рецепторами, після чого зневоднювали і заключали у бальзам. Контроль специфічності реакції здійснювали шляхом інкубування зрізів з H₂O₄. Вміст рецепторів до лектинів оцінювався за інтенсивністю забарвлення напівкількісним методом: +++ – сильна реакція (коричневий колір), ++ – помірна реакція (жовто-коричневий колір), + – слабка реакція (світло-коричневий колір), 0 – відсутність реакції. Проміжні відтінки кольорів оцінювались відповідно: ++/+++, +/++, тощо. Морфометричний облік клітин, що мають на своїй поверхні пігментну бензидинову мітку здійснювали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ на стандартизованій площі фотоцифрового зображення 1500 мкм².

Для дослідження морфо-функціонального стану клітин тимусу ектодермального походження вивчали розподіл рецепторів до цитокератинів 5 та 14, для чого попередньо підготовлені гістологічні зрізи піддавали депарафінізації та регідратації, з наступним температурним демаскуванням рецепторів, згідно протоколу дослідження. Надалі в умовах вологої камери, інкубували з первинними антитілами у концентрації 3 мкг/мл, в якості яких використовували стандартні набори моноклональних анти-цитокератинових мишиних антитіл 5 та 14 із асцитичної рідини, виробництва Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Комплекси первинне антитіло-цитокератиновий рецептор виявляли за допомогою системи візуалізації «Мишина ABC система зафарбування ImmunoCruz™: sc-2017», виробництва Santa Cruz Biotechnology (California, USA), шляхом інкубування з вторинним антитілом у концентрації 1 мкг/мл, та DAB-хромогеном. Після чого зрізи зневоднювали і заключали у бальзам. Вміст рецепторів до цитокератинів 5 та 14 в цитоплазмі епітеліальних клітин оцінювався за інтенсивністю накопичення хромогену напівкількісним методом: +++ – сильна реакція (коричневий колір), ++ – помірна реакція (жовто-коричневий колір), + – слабка реакція (світло-коричневий колір), 0 – відсутність реакції. Розрахунок площі імунопозитивного матеріалу до цитокератинів 5 та 14 зроблено з використанням програми аналізу зображень Image J на стандартизованій площі фотоцифрового зображення 1500 мкм².

Морфометричне дослідження та мікрофотографування досліджуваних об'єктів проводили за допомогою мікроскопа Primo Star з відеосистемою AxioCam 105 color (Carl Zeiss, Німеччина) та програми аналізу графічних зображень AxioVision Rel. 4.8 на умовній одиниці площі 1500 мкм² при збільшенні x100, x400 та x1000 разів.

Статистичну обробку отриманих числових результатів проводили на персональному комп'ютері з операційною системою Windows 7 з використанням ліцензійної програми «Statistica for Windows 13» (TIBCO Software Inc., №JPZ804I382130ARCN10J) за допомогою методів варіаційної статистики. Дані представлялись у вигляді $M \pm m$ (середнє арифметичне і стандартна помилка середнього). Достовірність відмінності між незалежними вибірками значень оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. В результаті проведеного дослідження встановлено, що у щурів після внутрішньоплідного введення глюкокортикоїдного гормону виявляється достовірне зменшення абсолютної маси тимусу починаючи з 9-ї доби постнатального періоду ($27,67 \pm 4,32$ мг і $49,84 \pm 8,63$ мг в Dex та Int відповідно), а відносної маси – з 14-ї доби життя ($0,29 \pm 0,04$ % і $0,38 \pm 0,02$ % в Dex та Int відповідно), і надалі ця різниця збільшується до кінця періоду спостереження.

У тварин Int та К груп спостерігається хвилеподібна зміна показників відносної площі морфо-функціональних зон тимусу, що пов'язано з процесами імміграції попередників тимоцитів до органу та виходом зрілих Т-лімфоцитів на периферію. Виявлено, що внутрішньоутробне введення дексаметазону в терапевтичних дозах плодам призводить до порушення співвідношення кора/мозкова речовина у перші два тижні після народження та диспропорції у становленні морфо-функціональних зон кори протягом всього періоду спостереження. Антенатальний вплив глюкокортикоїдного гормону викликає достовірне збільшення відносної площі субкапсулярної зони на 2-у (в 1,5 рази) та 3-ю добу життя (в 1,6 рази), та кортико-медулярної зони на 1-у (в 1,1 рази), 2-у (в 1,2 рази), 5-у добу (в 1,4 рази), та з 14-ї доби і до кінця періоду спостереження (в 1,3 рази) порівняно з Int. У тварин експериментальної групи відносна площа внутрішньої кори є достовірно меншою впродовж місяця після народження (максимально в 2,3 рази на 3-ю добу життя) порівняно з групою Int. Відновлення площі внутрішньої кори та коркової речовини в цілому починається на 2 доби пізніше, і до 30-ї доби так і не досягає рівня щурів Int та К груп. Відносна площа мозкової речовини в тимусі тварин після введення дексаметазону достовірно перевищує норму до третього тижня постнатального життя (максимально в 1,9 рази на 5-у добу життя).

Отримані дані вказують на те, що після пренатального введення дексаметазону у всіх морфо-функціональних зонах кори достовірно зменшується частка малих лімфоцитів впродовж всього терміну спостереження (в субкапсулярній зоні максимально на 1-у добу $31,43 \pm 1,61$ %/ $50,06 \pm 1,31$ % й 3-ю добу після народження $27,41 \pm 1,54$ %/ $43,40 \pm 1,23$ % в групах Dex/Int відповідно; та у внутрішній корі найбільше на 1-у добу $40,01 \pm 5,56$ %/ $74,00 \pm 1,45$ % і 3-ю добу життя $36,91 \pm 6,12$ %/ $70,35 \pm 1,14$ % в групах Dex/Int відповідно), що пов'язано з вираженим тимоцитолітичним ефектом глюкокортикоїдних гормонів і співвідноситься з високим рівнем лімфоцитів, що гинуть, це також знаходить підтвердження у ряді робіт [Situm K. et al., 2015]. Відносна кількість лімфоцитів середнього діаметру у щурів після антенатального гормонального впливу

змінюється неоднозначно: в субкапсулярній зоні відмічається зменшення їх кількості до 9-ї доби включно (максимально на 2-у добу $10,42 \pm 1,15$ %/ $21,56 \pm 1,08$ % в групах Dex/Int відповідно), а у внутрішній корі, навпроти, їх кількість достовірно перевищує показники інтактної групи з 9-ї до 30-ї доби, за виключенням 14-ї доби (найбільше на 21-у добу $11,00 \pm 0,84$ %/ $7,51 \pm 0,73$ % в групах Dex/Int відповідно). Виявлено компенсаторне збільшення вмісту великих лімфоцитів та лімфобластів у всіх морфо-функціональних зонах кори майже впродовж всього періоду спостереження, та кількості клітин з фігурами мітозу до 14-ї доби постнатального життя, порівняно з Int групою. В Dex групі тварин спостерігається збільшення частки епітеліоретикулоцитів протягом перших двох тижнів (максимально в 2,2 рази у внутрішній корі на 2-у добу життя) з наступним їх зменшенням до кінця терміну спостереження (найбільше в 1,4 рази в субкапсулярній зоні) порівняно з Int групою.

Після пренатального введення гормону у мозковій речовині до 9-ї доби включно виявлено зменшення відносної кількості малих лімфоцитів (максимально на 1-у добу $28,75 \pm 4,25$ %/ $46,95 \pm 1,25$ % в групах Dex/Int відповідно) та збільшення частки лімфоцитів, що гинуть (найбільше на 2-у добу $19,62 \pm 7,62$ %/ $2,84 \pm 0,48$ % в групах Dex/Int відповідно), зменшення частки середніх – до 3-ї доби включно (максимально на 1-у добу $2,24 \pm 0,28$ %/ $3,55 \pm 0,32$ % в групах Dex/Int відповідно), а великих лімфоцитів – на 1-у та після 14-ї доби постнатального життя, що відображає процеси внутрішньотимічної міграції лімфоцитів різного діаметру, і підтверджує дані про більшу стійкість лімфоцитів мозкової речовини до впливу глюкокортикоїдів [Moleriu R. D. et al., 2014]. В групі Dex прослідковується компенсаторне збільшення кількості лімфоцитів, що мітотично поділяються з 5-ї до 14-ї доби (максимально на 9-у добу $9,56 \pm 1,42$ %/ $5,62 \pm 0,51$ % в групах Dex/Int відповідно). У щурів, яким пренатально вводили дексаметазон спостерігається збільшення відносної кількості епітеліальних клітин мозкової речовини на 1-у (на 30 %) та 2-у добу життя (на 20 %) порівняно з Int групою.

В групі щурів після введення стафілококового анатоксину прослідковується збільшення абсолютної та відносної маси тимусу на 1 – 5-у добу після народження, а достовірне збільшення цих показників на 20 % відмічається після 9-ї доби і до кінця періоду спостереження, у порівнянні з показниками Int та K груп.

Відносна площа морфо-функціональних зон тимусу динамічно змінюється впродовж першого місяця постнатального періоду в залежності від функціонального стану органу. Встановлено, що у тварин після пренатального антигенного впливу спостерігається збільшення відносної площі субкапсулярної зони до 3-ї доби життя (найбільше на 3-у добу $8,87 \pm 1,26$ %/ $4,57 \pm 0,83$ % в групах SA/Int відповідно), а площа кори, навпаки, є достовірно меншою на 10 % на 5-у – 9-у та 30-у добу після народження. Площа внутрішньої кори також достовірно менша за норму до 3-ї доби ($37,62 \pm 1,66$ %/ $49,99 \pm 2,31$ % в групах SA/Int відповідно) та починаючи з другого тижня постнатального періоду, і навпаки, показник відносної площі медулярної зони достовірно вищий на 22 % з 3-ї по 9-у добу та з третього тижня життя у порівнянні з референтними показниками. До кінця періоду спостереження виявлені зміни площ морфо-функціональних зон тимусу в експерименті так і не нівелюються.

Як показали отримані результати, після введення стафілококового анатоксину в антенатальному періоді виявлено достовірне збільшення відносної кількості малих

лімфоцитів у субкапсулярній зоні до 5-ї та після 21-ї доби (максимально на 5-у добу $47,14 \pm 1,53$ %/ $39,13 \pm 1,27$ % в групах SA/Int відповідно), а у внутрішній корі на 30-у добу після народження ($76,10 \pm 0,92$ %/ $74,28 \pm 0,83$ % в групах SA/Int відповідно). При цьому, у SA тварин спостерігається достовірне зменшення вищезазначеного показника на 1-у ($65,52 \pm 1,12$ %/ $74,00 \pm 1,45$ % в групах SA/Int відповідно) і 3-ю добу постнатального періоду ($64,87 \pm 1,25$ %/ $70,35 \pm 1,14$ % в групах SA/Int відповідно) у власне корковій речовині та протягом 1-ї – 9-ї доби (найбільше на 2-у добу $40,35 \pm 1,11$ %/ $47,26 \pm 1,32$ % в групах SA/Int відповідно) у мозковій. Частка лімфоцитів середнього діаметру в тимусі щурів SA групи є достовірно меншою з 2-ї до 9-ї доби та наприкінці періоду спостереження у субкапсулярній зоні та у внутрішній корі, а в мозковій речовині, навпаки, визначається збільшення їх відносної кількості на 2-у ($22,23 \pm 0,70$ %/ $20,29 \pm 0,82$ % в групах SA/Int відповідно) та 3-ю добу життя ($22,36 \pm 0,81$ %/ $20,87 \pm 0,63$ % в групах SA/Int відповідно). Відносна кількість великих лімфоцитів в різних морфо-функціональних зонах тимусу SA групи тварин практично не відрізняється від норми, за виключенням субкапсулярної зони на 5-у – 14-у добу після народження, коли відзначається зменшення їх кількості, та власне коркової і мозкової речовини, де виявлено збільшення цього показника на 1-у – 2-у добу, порівняно з Int та K групами. Спостерігається збільшення частки лімфоцитів, що гинуть в субкапсулярній зоні на 1-у та з 3-ї по 5-у добу, а у власне корковій зоні на 3-ю добу постнатального періоду порівняно з щурами Int та K груп. В групі тварин з пренатальним введенням стафілококового анатоксину виявлено збільшення відносної кількості клітин з фігурами мітозу протягом двох тижнів, за виключенням 3-ї доби, в субкапсулярній зоні (максимально на 1-у добу $7,84 \pm 0,74$ %/ $4,56 \pm 0,52$ % в групах SA/Int відповідно), до 3-ї доби у внутрішній корі включно (найбільше на 1-у добу $6,87 \pm 0,34$ %/ $3,23 \pm 0,22$ % в групах SA/Int відповідно), та протягом 9-и діб, за виключенням 5-ї, у мозковій речовині (максимально на 1-у добу $4,73 \pm 0,52$ %/ $2,17 \pm 0,34$ % в групах SA/Int відповідно). Встановлено збільшення частки епітеліоретикулоцитів протягом перших 3-х діб у корковій (найбільше на 3-ю добу $12,30 \pm 1,09$ %/ $7,86 \pm 0,75$ % в групах SA/Int відповідно), та 9-и діб у мозковій речовині (максимально на 5-у добу $17,44 \pm 0,54$ %/ $13,32 \pm 0,71$ % в групах SA/Int відповідно), порівняно з референтними показниками.

Зазначені вище особливості клітинного складу морфо-функціональних зон тимусу SA групи тварин, напевне, відображають прискорення процесів проліферації і дозрівання тимоцитів і більш раннього виходу на периферію імунокомпетентних клітин.

Також було вивчено особливості розподілу рецепторів до лектинів. У Int щурів інтенсивність відкладення бензидинової мітки до α -D-манози та кількість LCA⁺-дендритних клітин хвилеподібно змінюється протягом першого місяця постнатального життя. Отримані нами результати співставляються з низкою інших досліджень [Волошин Н.А. и др. 2011; Moleriu R.D. et al. 2014].

Нами було визначено, що після введення дексаметазону в антенатальному періоді кількість LCA⁺-дендритних клітин достовірно більша з 5-ї по 14-у добу життя (найбільше на 5-у добу $2,86 \pm 0,34$ клітин/ $1,89 \pm 0,31$ клітин в групах Dex/Int відповідно), а інтенсивність експресії рецепторів до лектину сочевиці більша на 1-у та 5-у – 9-у добу, порівняно з Int тваринами. Виявлені особливості відображають відставання у термінах проходження інтенсивної негативної селекції незрілими лімфоцитами через зниження адгезивних властивостей LCA⁺-дендритних клітин, і

тим самим відстрочення масового заселення лімфоцитами вторинних лімфоїдних органів у тварин Dex групи.

Водночас виявлено, що внутрішньоплідне введення стафілококового анатоксину приводить до збільшення кількості LCA⁺-дендритних клітин протягом перших 3-х діб постнатального життя (максимально на 2-у добу 4,13±0,34 клітин/2,60±0,49 клітин в групах SA/Int відповідно) та до більш інтенсивного відкладення бензидинової мітки до рецепторів сочевиці на 1-у, 30-у та з 3-ї по 9-у добу життя у тварин SA групи, що супроводжується більш інтенсивною еміграцією лімфоцитів до вторинних лімфоїдних органів.

За даними Волошина М.А., Григорьєвої О.А. (2011) частка WGA⁺-епітеліальних клітин поступово збільшується протягом 5 діб після народження залишаючись в подальшому майже однаковою у всіх морфо-функціональних зонах тимусу, та спостерігається помірний (++) та високий (+++) рівень експресії WGA⁺-рецепторів епітеліоретикулоцитами коркової та мозкової речовини, відповідно, зменшуючись до слабого рівня (+) з 21-ї доби життя.

Нами було виявлено, що пренатальне введення дексаметазону приводить до достовірного зменшення кількості WGA⁺-епітеліоцитів після другого тижня життя (на 30-у добу в корковій речовині 2,86±0,35 клітин/3,54±0,31 клітин; та на 14-у добу в мозковій речовині 3,90±0,30 клітин/5,15±0,35 клітин в групах Dex/Int відповідно). Також відмічається високий рівень експресії (+++) рецепторів до лектину зародків пшениці у перші три доби, та на 9-у і 30-у добу після народження у корковій речовині, та на 3-ю і з 21-ї доби у мозковій речовині. Виявлені зміни найвірогідніше відображають дистрофічні дексаметазон-опосередковані зміни у клітинах мікрооточення на тлі компенсаторного підвищення їх функціональної активності.

Після внутрішньоплідного введення стафілококового антигену спостерігається збільшення кількості WGA⁺-епітеліальних клітин протягом перших 3-х та на 30-у добу життя (максимально на 2-у добу як в корковій 2,88±0,32 клітин/1,76±0,42 клітин, так і в мозковій речовині 5,42±0,50 клітин/2,35±0,48 клітин в групах SA/Int відповідно). Також виявлено більший рівень експресії рецепторів до лектину зародків пшениці впродовж перших 3-х тижнів життя у корковій речовині (за виключенням 14-ї доби) та на 3-ю – 5-у та 30-у добу після народження в мозковій речовині у щурів SA групи.

У щурів Int групи в корковій речовині спостерігається слабка (+), а у мозковій – помірна (++) інтенсивність експресії рецепторів до β-D-галактозокон'югатів впродовж місяця після народження, зменшуючись з 9-ї доби життя, що співпадає з даними ряду робіт [Мороз Г.А., 2013].

Було виявлено, що після введення гормону в антенатальному періоді у корковій речовині виявляється слабка інтенсивність (+) експресії рецепторів до лектину рицини, а в мозковій речовині спостерігається збільшення (++) експресії рецепторів до β-D-галактози з другого тижня після народження.

В той же час, у тварин після пренатального антигенного впливу у корковій речовині визначається збільшення інтенсивності експресії рецепторів до лектину рицини впродовж перших 5-и діб, за виключенням 2-ї доби, коли спостерігається, навпаки, зменшення; а в мозковій речовині виявлено більшу експресію RCA⁺-

рецепторів на 3-у добу та з 9-ї по 30-у добу спостереження, за виключенням 14-ї доби, коли спостерігається зменшення експресії порівняно з Int групою.

В роботах Мороза Г.А., 2013 було показано, що у тварин інтактної групи інтенсивність експресії рецепторів до лектину арахісу на лімфоцитах має хвилеподібний характер впродовж 30 діб після народження і більш виражене у корковій речовині.

Нами було визначено, що після введення дексаметазону на 18-у добу вагітності у корковій речовині збільшується інтенсивність експресії рецепторів до β -D-галактози до 14-ї доби після народження, за винятком 1-ї доби, коли спостерігається зменшення, а в мозковій речовині зменшується до 2-ї доби життя. Ці відмінності характеризують поступове збільшення кількості незрілих форм лімфоцитів, як компенсаторну реакцію після гормон-індукованого апоптозу тимоцитів.

Отримані результати також демонструють, що після пренатального введення стафілококового анатоксину у корковій речовині збільшується інтенсивність експресії рецепторів до лектину арахісу протягом перших 3-х діб, та зменшення щільності розподілу рецепторів до β -D-галактози на 5-у – 9-у та 30-у добу життя. У мозковій речовині також спостерігається збільшення експресії рецепторів до 5-ї доби включно, крім 1-ї доби, коли виявляється зменшення. Це може відображати антиген-опосередковані зміни адгезивних властивостей лімфоцитів, процесів дозрівання та диференціації імункомпетентних клітин.

Було вивчено розподіл рецепторів до цитокератинів 5 та 14 в субкапсулярній зоні коркової речовини. Було виявлено, що введення дексаметазону щурам в антенатальному періоді приводить до зменшення рівня експресії рецепторів до СК5/14 у перші три та на 9-14-у доби після народження. Також відмічається достовірне і поступове зменшення площі, що займають епітеліоцити протягом всього періоду спостереження (СК5⁺: на 1-у добу $61,24 \pm 10,42 \text{ мкм}^2 / 91,45 \pm 18,47 \text{ мкм}^2$, на 30-у добу $12,02 \pm 3,72 \text{ мкм}^2 / 32,92 \pm 8,62 \text{ мкм}^2$; СК14⁺: на 1-у добу $57,43 \pm 11,49 \text{ мкм}^2 / 81,81 \pm 15,80 \text{ мкм}^2$, на 30-у добу $13,82 \pm 4,79 \text{ мкм}^2 / 29,89 \pm 6,59 \text{ мкм}^2$ в групах Dex/Int відповідно). Це відображає виражені гормон-викликані порушення у формуванні адекватного мікрооточення для лімфоцитів та свідчить про те, що епітеліоретикулоцити тимусу також є клітинами-мішенями для дексаметазону, і можуть опосередковувати довготривалі наслідки впливу глюкокортикоїдних гормонів на імунну систему плода.

Отримані дані свідчать, що пренатальне введення антигену приводить до збільшення рівня експресії рецепторів до СК5/14 впродовж всього періоду спостереження з максимумом у перші три доби та на 14-у добу життя. Також виявлено достовірне збільшення площі епітеліоцитів у перші 9 діб життя порівняно з Int групою (найбільше на 1-у добу як СК5⁺: $145,56 \pm 17,65 \text{ мкм}^2 / 91,45 \pm 18,47 \text{ мкм}^2$, так і СК14⁺: $139,76 \pm 16,87 \text{ мкм}^2 / 81,81 \pm 15,80 \text{ мкм}^2$ в групах SA/Int відповідно). Це свідчить про інтенсифікацію процесів позитивної селекції у щурів SA групи та свідчить про більш високу функціональну активність епітеліоретикулоцитів ектодермального походження як клітин мікрооточення.

Таким чином, у дисертаційній роботі було виявлено, що введення дексаметазону призводить до прискореного дозрівання епітеліоретикулоцитів коркової речовини та зменшення кількості малих, середніх, великих лімфоцитів та лімфобластів, PNA⁺-лімфоцитів в субкапсулярній зоні, корі та мозковій речовині на тлі великої

кількості клітин у стадії апоптозу. Спостерігається затримка процесів позитивної та негативної селекції до періоду компенсаторного відновлення пулу лімфоцитів з їх попередників, що надходять із кісткового мозку. У подальшому це може викликати розвиток імунодефіцитних станів внаслідок порушення морфогенезу вторинних імунних органів. Отримані результати представлені у вигляді схеми (рисунок 1).

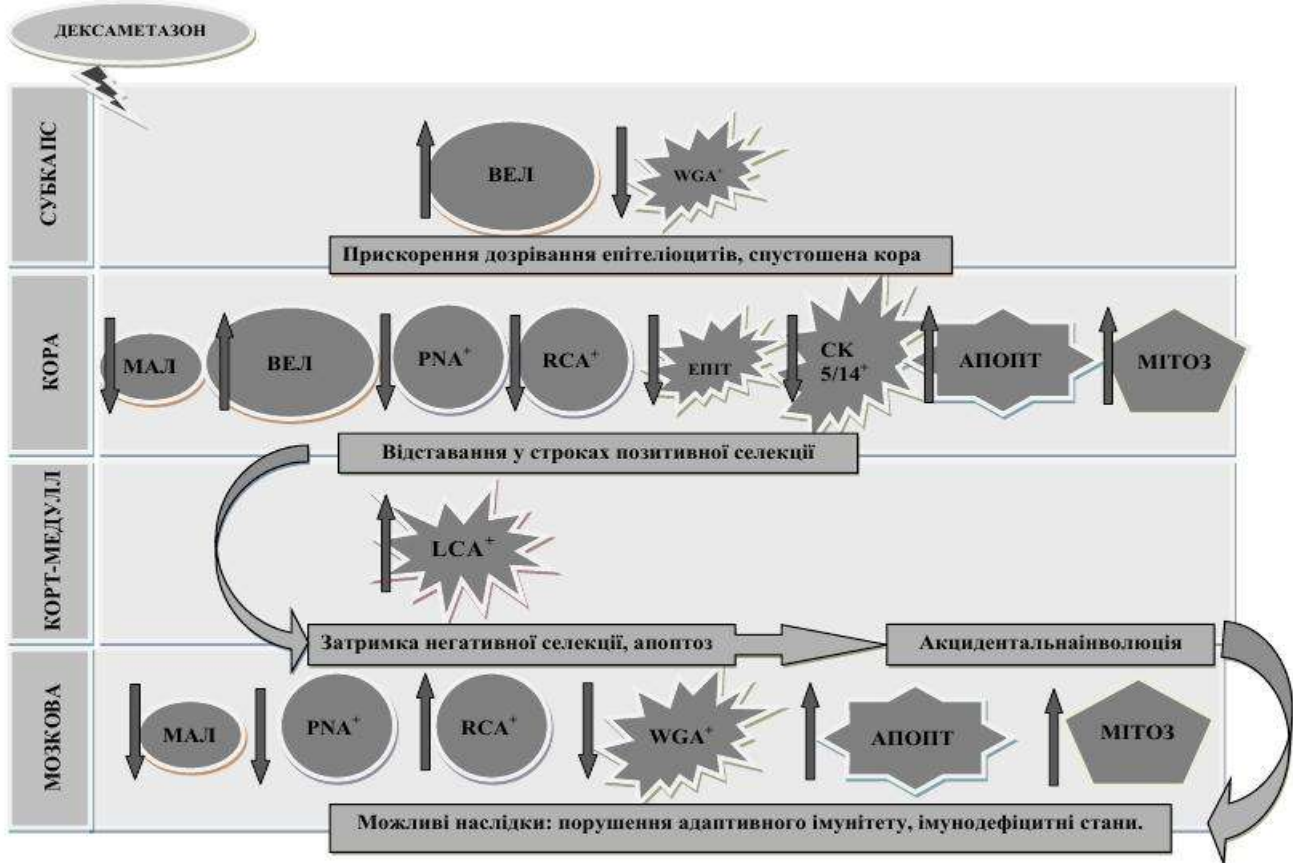


Рисунок 1 – Зміни клітинного складу в тимусі після пренатального введення дексаметазону

Також нами було встановлено, що вплив стафілококового анатоксину на незрілу імунну систему плода призводить до затримки дозрівання епітеліоретикулоцитів кіркової речовини, що супроводжується зростанням інтенсивності проліферації, а значить і кількості клітин з фігурами мітозів і кількості імунологічно незрілих PNA⁺-лімфоцитів різного діаметру. Це призводить до змін у процесах внутрішньотимічної міграції, за рахунок чого виникають зміни у відносній площі морфо-функціональних зон тимусу. Також це виявляється у дезорганізації процесів позитивної та негативної селекції, супроводжуючись збільшенням частки незрілих форм лімфоцитів та їх еміграцією із органу на периферію. Це знаходить підтвердження у роботах вчених Запорізької імуноморфологічної школи по вивченню селезінки [Новосьолова О.А. 1996; Таланова О.С. 2014], шкіри і плаценти [Куц О.Г., 2001, 2008], апендикса [Таврог М.Л., 2012], глотки [Матвейшина Т.М., 2013], кишківника [Світлицький О.А., 2008; Лазарік О.Л., 2012], лімфовузла [Васильчук Н.Г., 2018]. Як наслідок, виникають зміни у морфогенезі лімфоїдних органів, що може призводити до розвитку алергічної та аутоімунної патології у майбутньому. Схематично це представлено на малюнку (рисунок 2).

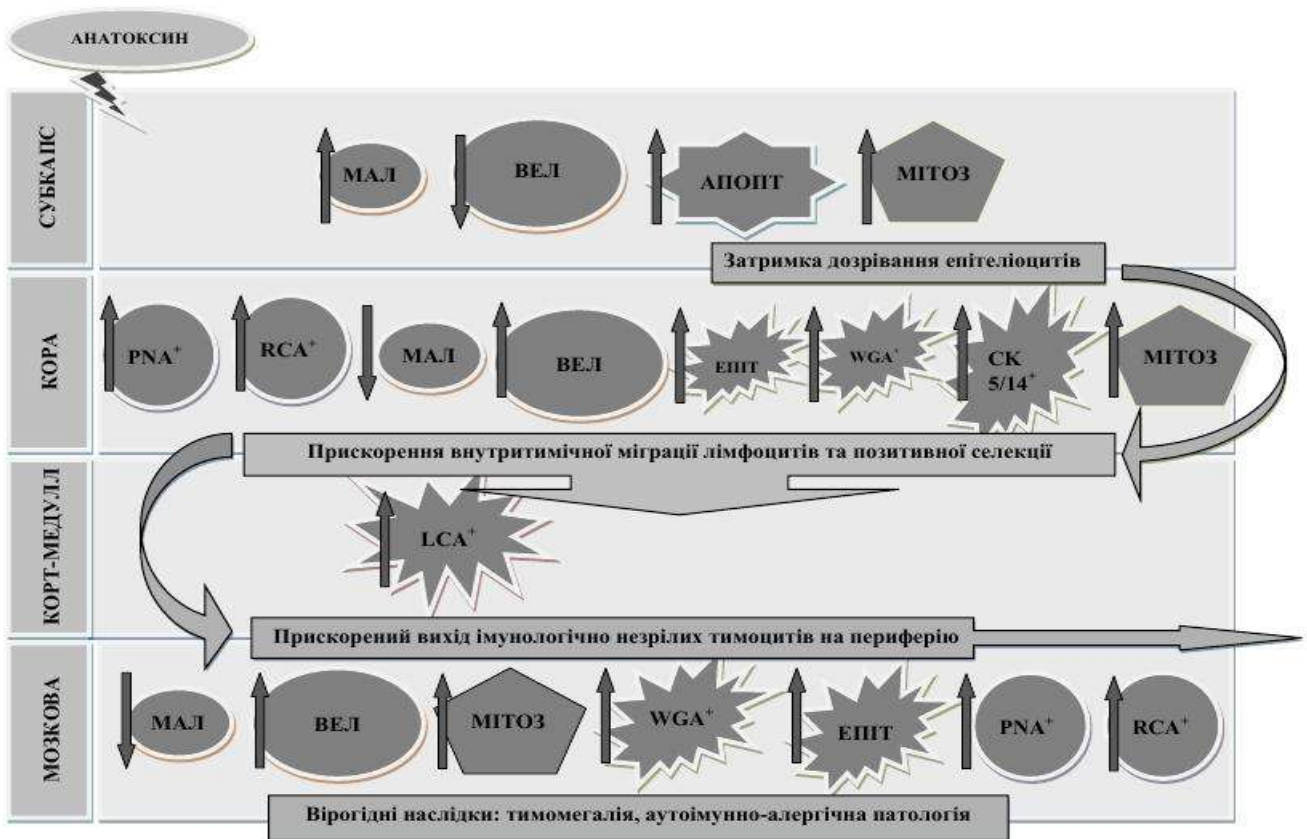


Рисунок 2 – Зміни клітинного складу в тимусі після пренатального введення стафілококового анатоксину

ВИСНОВКИ

Вивчення впливу підвищеного антигенного навантаження на імунну систему у внутрішньоутробному періоді є актуальною проблемою сучасної імуноморфології та медицини в цілому. Застосування глюкокортикоїдів під час вагітності по теперішній час є одним із самих неоднозначних питань акушерської практики, що є доцільною проблемою імуноморфології та педіатрії. Комплексним анатомо-експериментальним дослідженням з використанням анатомічного, гістологічного, гістохімічного, лектингістохімічного та імуногістохімічного методів вирішено актуальне наукове завдання нормальної анатомії, що полягає у встановленні особливостей будови і морфогенезу тимусу в нормі та після дії стафілококового анатоксину та дексаметазону в плідному періоді.

1. Після пренатального введення дексаметазону спостерігається зниження кортико-медулярного співвідношення на 36 % на 1-у добу життя порівняно з тваринами інтактної групи, переважно за рахунок зменшення відносної площі внутрішньої кори (на 44,9 %), й до 30-ї доби цей показник так і не досягає референтних значень. Це супроводжується статистично достовірним зменшенням відносної кількості малих (зокрема, на 45,9 % на 1-у добу) і середніх лімфоцитів (найбільше на 41,7 % на 3-у добу) у корковій речовині тимусу, та підвищенням відносної кількості лімфоцитів у стадії апоптозу (максимально в 13,5 разів на 1-у добу) у порівнянні з показниками групи інтактних тварин протягом перших

30-и днів після народження. Крім того відзначається збільшення частки великих лімфоцитів і лімфобластів внутрішньої кори тимусу з 3-ї по 21-у добу після народження, та збільшення частки лімфоцитів у фазі мітозу у корковій речовині тимусу протягом 9-и днів (найбільше на 3-у добу у 3,2 рази) у тварин експериментальної групи, ($p < 0,05$). Також виявлено статистично достовірне збільшення частки епітеліоцитів у корі тимусу до 14-ї доби життя, максимально у 2,2 рази на 2-у добу, у порівнянні з референтними показниками.

2. Пренатальне введення стафілококового анатоксину приводить до збільшення відносної площі субкапсулярної зони в 1,94 рази до 3-ї доби постнатального життя, та до збільшення відносної площі мозкової речовини в 1,2 рази з 3-ї доби і до кінця періоду спостереження, порівняно з інтактною групою тварин. Разом з тим, спостерігається достовірне збільшення частки малих лімфоцитів субкапсулярної зони протягом перших 5-и днів (максимально на 5-у добу на 20,5 %) у порівнянні з групою інтактних тварин. У той же час, спостерігається зменшення відносної кількості малих лімфоцитів з 1-ї по 9-у добу у мозковій речовині тимусу (найбільше на 2-у добу на 14,6 %) у порівнянні з референтними показниками, ($p < 0,05$). При цьому спостерігається статистично достовірне збільшення частки лімфоцитів у фазі мітозу, зокрема в субкапсулярній зоні з 1-ї по 14-у добу (максимально на 1-у добу у 1,7 рази), у внутрішній корі до 3-ї доби (максимально на 1-у добу у 2,1 рази), а у мозковій речовині до 9-ї доби (максимально на 1-у добу у 2,2 рази) у порівнянні з показниками групи інтактних тварин. Також виявлено збільшення відносної кількості епітеліальних клітин у корковій речовині до 3-ї доби після народження у порівнянні з групою інтактних тварин (максимально на 3-у добу на 56,5 %), ($p < 0,05$).

3. Пренатальне введення дексаметазону призводить до достовірного збільшення експресії рецепторів до лектину сочевиці та кількості LCA⁺-дендритних клітин з 5-ї по 14-у добу, з максимальним збільшенням на 51,3 % на 5-у добу у порівнянні з референтними показниками. Разом з тим, в мозковій речовині тимусу визначається більш інтенсивна експресія рецепторів до β -D-галактози, екранованою сіаловою кислотою з 14-ї по 30-у добу після народження (++) порівняно з групою інтактних тварин (+). Навпроти, кількість WGA⁺-епітеліоретикулоцитів є достовірно меншою на 19,2 % на 30-у добу в корковій речовині та на 24,2 % на 14-у добу – в мозковій, порівняно з референтною групою. Також спостерігається зниження інтенсивності накопичення бензидинової мітки до β -D-галактози (+) в корковій та мозковій речовині тимусу протягом перших двох днів у порівнянні з інтактною групою (++).

4. Після пренатального введення стафілококового анатоксину спостерігається більш інтенсивне накопичення бензидинової мітки до лектину сочевиці з 3-ї до 9-ї доби, й кількість LCA⁺-дендритних клітин є більшою протягом перших 3-х днів з максимальним збільшенням на 58,8 % на 2-у добу у порівнянні з референтними показниками. Крім того спостерігається достовірно більша кількість WGA⁺-епітеліальних клітин в корковій та мозковій речовині тимусу в перші три доби та на 30-у добу постнатального життя, супроводжуючись більш інтенсивною експресією рецепторів до N-ацетил-D-глюкозаміну протягом 9-и днів постнатального періоду у корковій речовині тимусу (+++) та на 3-5-у добу життя у мозковій

речовині (+++) у порівнянні з рівнем експресії (++) в групі інтактних тварин. Також з 9-ї по 30-у добу у мозковій речовині тимусу визначається більш інтенсивна експресія рецепторів до лектину рицини (++) у порівнянні з показниками інтактної групи (+). Разом з тим, відмічається більш інтенсивне накопичення бензидинової мітки на незрілих PNA⁺-лімфоцитах в перші три доби постнатального життя в корковій та мозковій речовині тимусу, причому більша різниця у інтенсивності експресії відзначається у корковій речовині тимусу у порівнянні з референтною групою (+++ проти + відповідно).

5. Введення дексаметазону щурам в антенатальному періоді призводить до зменшення інтенсивності експресії рецепторів до цитокератинів 5/14 у перші два тижня життя та до поступального та прогресивного зменшення площі, що займають СК5/14+-епітеліоретикулоцити протягом всього періоду спостереження (на 1-у добу відносна площа СК5/14+-клітин на 33,1 % менша, а на 30-у добу на 63,5 % менша), порівняно з інтактною групою тварин. В групі антигенпреміюваних тварин спостерігається збільшення рівня експресії рецепторів до цитокератинів 5/14 впродовж всього періоду спостереження з максимумом у перші три доби, а питома площа, що займають СК5/14+-епітеліоретикулоцити є більшою протягом 9-и діб після народження (зокрема на 59,1 % у першу добу), порівняно з інтактною групою тварин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Волошин Н.А., Аравицкий Е.О. Динамика абсолютной и относительной масс тимуса белых крыс в норме и после внутриутробного воздействия дексаметазона и стафилококкового анатоксина. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2016. Т. 16, № 4(56). С. 5–8. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).

2. Волошин Н.А., Аравицкий Е.О. Сравнительная характеристика реактивности морфо-функциональных зон тимуса новорожденных после действия в пренатальном периоде дексаметазона. *Актуальні питання медичної науки та практики*. 2017. Т. 1, Кн. 1, №84. С. 3-11. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).

3. Аравицкий Е.О. Особенности динамики клеточного состава морфо-функциональных зон тимуса белых крыс в ответ на пренатальное гормональное воздействие. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2017. Т. 17, №4(60). С. 13-21.

4. Аравицкий Е.О. Реактивные изменения морфо-функциональных зон тимуса после внутриутробного воздействия стафилококкового анатоксина. *Актуальні питання медичної науки та практики*. 2017. Т. 2, Кн. 1, №84. С. 3-18.

5. Волошин М.А., Аравицкий Е.О., Куш О.Г. Дослідження динаміки кількості та топографії LCA⁺-дендритних клітин в тимусі щурів в ранньому післянатальному періоді в нормі та після пренатального введення дексаметазона. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 3(41). С. 348-352. (Дисертантом самостійно проведено лектингістохімічне дослідження, статистичну обробку даних та підготовку матеріалу до друку).

6. Волошин М.А., Куш О.Г., Аравицький Є.О. Динаміка експресії та кількості СК5⁺-імунопозитивних епітеліоцитів субкапсулярної зони тимуса у щурів раннього постнатального періоду після пренатального введення стафілококового анатоксину. *Морфологія*. 2018. Т. 12, №4. С. 24-30. (Дисертантом самостійно проведено імуногістохімічне дослідження, статистичну обробку даних та підготовку матеріалу до друку).

7. Аравицький Е.О. Особенности изменений субкапсулярной зоны тимуса в раннем постнатальном периоде после пренатального действия дексаметазона. *Сучасні наукові інновації* : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, м. Київ, 15–16 лютого 2017 р. Київ, 2017. С. 24–26.

8. Аравицький Е.О. Особенности изменений субкапсулярной зоны тимуса в раннем постнатальном периоде после пренатального антигенного воздействия. *Інновації в медицині* : матеріали 86 науково-практичної конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю, м. Івано-Франківськ, 23–24 березня 2017 р. Івано-Франківськ, 2017. С. 92.

9. Аравицький Е.О. Становление внутренней коры тимуса в постнатальном периоде после пренатального действия стафилококкового анатоксина. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я* : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів, м. Запоріжжя 23–24 березня 2017 р. Запоріжжя, 2017. С. 10–11.

10. Аравицький Е.О. Особенности формирования внутренней коры тимуса крыс в постнатальном периоде после пренатального действия дексаметазона. *Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2017* : сборник тезисов докладов LXXI Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных, г. Минск, 17–19 апреля 2017 г. Минск, 2017. С. 77.

11. Аравицький Е.О., Аравицкая Дж.Н. Особенности реактивности субкапсулярной зоны тимуса после внутриутробного гормонального воздействия. *Сучасні аспекти медицини та фармації-2017* : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів із міжнародною участю, присвячена дню науки, м. Запоріжжя, 11–12 травня 2017 р. Запоріжжя, 2017. С. 5–6. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).

12. Аравицький Е.О., Путилин Д.А., Аравицкая Дж.Н. Постнатальная реактивность WGA⁺-эпителиоретикулоцитов тимуса после внутриутробного антигенного воздействия. *Пріоритети сучасної науки* : матеріали Міжнародної науково-практичної конференції, м. Київ 27–28 жовтня 2017 р. Київ, 2017. С. 9–11. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та сформульовані висновки, доповідь).

13. Аравицький Е.О., Аравицкая Дж.Н. Иммуногистохимическое выявление СК5⁺-эпителиоцитов тимуса крыс раннего постнатального периода после пренатального гормонального воздействия. *Медико-фармацевтичний форум– 2017, збірник «Science and life»* : матеріали III міжнародної науково-практичної конференції, м. Карлові Вари, Чехія, 22 грудня 2017 р. Карлові Вари, 2017. С.85–91. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).

14. Куш О.Г., Аравицький Е.О. Особенности экспрессии СК5/14⁺-эпителиальных клеток тимуса крыс в норме и после пренатального введения

стафілококкового анатоксина. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ)* : матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції, м. Запоріжжя, 18-25 травня, 30 травня 2018 р. Запоріжжя, 2018. С. 16. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).*

15. Патент на корисну модель. Волошин М.А., Аравіцький Є.О., Богданов П.В., Чернявський А.В. Спосіб моделювання внутрішньоплідної дії глюкокортикоїдів: пат. 112288, Україна, МПК G09B 23/28, A61K 38/22, A61P 37/02. № u201606118; заявл. 06.06.2016; опубл. 12.12.2016 Бюл. № 23. *(Дисертант самостійно провів аналіз даних та розробив еквівалентну дозу дексаметазону для щурів).*

АНОТАЦІЯ

Аравіцький Є.О. Будова та морфогенез тимусу в постнатальному періоді після внутрішньоутробного введення стафілококового анатоксину та дексаметазону (анатомо-експериментальне дослідження). — На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.01 – нормальна анатомія. – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2019.

В результаті роботи було виявлено, що введення дексаметазону призводить до прискороного дозрівання епітеліоретикулоцитів коркової речовини та зменшення кількості малих, середніх, великих лімфоцитів та лімфобластів, PNA⁺-лімфоцитів в субкапсулярній зоні, корі та мозковій речовині на тлі великої кількості клітин у стадії апоптозу, що також дозволяє краще візуалізувати WGA⁺-клітини. Також спостерігається затримка процесів позитивної та негативної селекції до періоду компенсаторного відновлення пулу лімфоцитів з їх попередників, що надходять із кісткового мозку. У подальшому це може викликати розвиток імунодефіцитних станів внаслідок порушення морфогенезу вторинних імунних органів.

Водночас було виявлено, що вплив стафілококового анатоксину на незрілу імунну систему плода призводить до затримки дозрівання епітеліоретикулоцитів кіркової речовини, що супроводжується зростанням інтенсивності проліферації, а значить і кількості клітин з фігурами мітозів і кількості імунологічно незрілих PNA⁺-лімфоцитів різного діаметру. Це призводить до змін у процесах внутрішньотимічної міграції, за рахунок чого виникають зміни у відносній площі морфо-функціональних зон тимусу. Також це виявляється у дезорганізації процесів позитивної та негативної селекції, супроводжуючись збільшенням частки незрілих форм лімфоцитів та їх еміграцією із органу на периферію. Як наслідок, виникають зміни у морфогенезі лімфоїдних органів, що може призводити до розвитку алергічної та аутоімунної патології у майбутньому.

Ключові слова: тимус, дексаметазон, стафілококовий анатоксин, коркова речовина, мозкова речовина, лімфоцити, епітеліоретикулоцити, лектини PNA, WGA, LCA, RCA, цитокератини 5/14.

АННОТАЦИЯ

Аравицкий Е.О. Структура и морфогенез тимуса в постнатальном периоде после внутриутробного введения стафилококкового анатоксина и дексаметазона (анатомо-экспериментальное исследование). — На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – нормальная анатомия. – Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2019.

В результате работы было выявлено, что введение дексаметазона приводит к ускоренному созреванию эпителиоретикулоцитов коркового вещества и уменьшению количества малых, средних, больших лимфоцитов и лимфобластов, PNA⁺-лимфоцитов в субкапсулярной зоне, коре и мозговом веществе на фоне большого количества клеток в стадии апоптоза, что также позволяет лучше визуализировать WGA⁺-клетки. Кроме того наблюдается задержка процессов положительной и отрицательной селекции к периоду компенсаторного восстановления пула лимфоцитов из их предшественников, поступающих из костного мозга. В дальнейшем это может вызвать развитие иммунодефицитных состояний вследствие нарушения морфогенеза вторичных иммунных органов.

В то же время было обнаружено, что влияние стафилококкового анатоксина на незрелую иммунную систему плода приводит к задержке созревания эпителиоретикулоцитов коры, сопровождающейся ростом интенсивности пролиферации, а значит и количества клеток с фигурами митозов и количества иммунологически незрелых PNA⁺-лимфоцитов разного диаметра. Это приводит к изменениям в процессах внутритимической миграции, за счет чего возникают изменения в относительной площади морфо-функциональных зон тимуса. Также это проявляется в дезорганизации процессов положительной и отрицательной селекции, сопровождаясь увеличением доли незрелых форм лимфоцитов и их эмиграцией из органа на периферию. Как следствие, возникают изменения в морфогенезе лимфоидных органов, что может приводить к развитию аллергической и аутоиммунной патологии в будущем.

Ключевые слова: тимус, дексаметазон, стафилококковый анатоксин, корковое вещество, мозговое вещество, лимфоциты, эпителиоретикулоциты, лектины PNA, WGA, LCA, RCA, цитокератины 5/14.

ANNOTATION

Aravitskiy E.O. Structure and morphogenesis of thymus in the postnatal period after prenatal introduction of staphylococcal anatoxin and dexamethasone. (anatomical experimental research) – The manuscript.

The thesis is submitted for a candidate degree in Medical Sciences in specialty 14.03.01 – Normal anatomy – Zaporizhzhya State Medical University of the Health Care Ministry of Ukraine, Zaporizhzhya, 2019.

The thesis is devoted to the clarification of the peculiarities of the thymus structure and morphogenesis in the postnatal period after intrauterine introduction of staphylococcal

anatoxin and dexamethasone with by means of morphometric, histological, lectin histochemical, immunohistochemical and statistical methods.

It was supplemented that after prenatal administration of dexamethasone, a decrease of cortico-medullary ratio by 36% on the 1st day of life was observed, if to compare with the intact animals, mainly due to a decrease in the relative area of the inner cortex (by 44.9%), and up to 30th day this index hadn't reached the reference values. This was accompanied by a decrease in the relative number of small lymphocytes (particularly by 45.9% on the 1st day) and medium lymphocytes (max by 41.7% on the 3rd day) in the cortex, and an increase in the relative number of apoptic lymphocytes (max in 13.5 times on the 1st day) if to compare with intact animals during the first 30 days after birth. In addition, there was an increase in the proportion of large lymphocytes and lymphoblasts of the inner cortex from the 3rd to the 21st day after birth, and an increase in the proportion of lymphocytes in the mitotic phase in the cortex during first 9 days (max on the 3rd day in 3.2 times) in animals after administration of dexamethasone ($p < 0.05$). Also, an increase in the proportion of epitheliocytes in the cortex to the 14th day of life was detected, at max 2.2 times on the 2nd day, in comparison with the reference indexes.

It was specified that the prenatal introduction of staphylococcal anatoxin leads to an increase in the relative area of the subcapsular zone by 1.94 times up to the 3rd day of life, and to an increase in the relative area of medulla by 1.2 times from the 3rd day and up to the end of the observed period, if to compare with the intact animals. However, there was an increase in the proportion of small lymphocytes in the subcapsular zone during the first 5 days (max on the 5th day by 20.5%) compared with intact animals. At the same time, there was a decrease in the relative number of small lymphocytes from the 1st to the 9th day in the medulla (max by 14.6% on the 2nd day), compared with the reference values. Also, there was an increase of lymphocytes in the mitosis phase, particularly in the subcapsular zone from day 1 to day 14 (max in 1.7 times on the 1st day), in the inner cortex up to the 3rd day (max in 2.1 times on the 1st day), and in the medulla until the 9th day (max in 2.2 times on the 1st day) compared with the data of the intact animals. An increase in the relative number of epithelial cells in the cortex was observed up to the 3rd day after birth in comparison with the group of intact animals (max by 56.5% on the 3rd day), ($p < 0.05$).

It's been shown that prenatal administration of dexamethasone results in an increase of receptor expression for lentil lectin and the number of LCA⁺-dendritic cells on day 5–14, with a max increase by 51.3% at day 5, compared to the reference values. However, more intense expression of β -D-galactose receptor shielded with sialic acid was detected from the 14th to 30th day of life (++) in the medulla, compared with the intact animals (+). On the contrary, the number of WGA⁺-epitheliocytes was lower by 19.2% on the 30rd day in cortex and by 24.2% on the 14th day in medulla, if to compare with the reference group. There was also a decrease in the rate of benzidine label accumulation to β -D-galactose (+) in the cortex and medulla during the first 2 days, compared to the intact group (++) .

It's been proved that after prenatal introduction of staphylococcal toxoid there was a more intensive accumulation of the benzidine label to the lentil lectin from the 3rd to the 9th day, and the amount of LCA⁺-dendritic cells is bigger during the first 3 days with a max increase by 58.8% on the 2nd day in comparison with reference indexes. In addition, there was an increase in the number of WGA⁺-epithelial cells in the thymic cortex and medulla during the first 3 days and on the 30th day of postnatal life, accompanied by more

intensive expression of receptors to N-acetyl-D-glucosamine during first 9 days of the postnatal period in cortex (++++) and during 3–5 days of life in the medulla (+++), compared with expression level (++) in intact animals. Also, from the 9th to the 30th day in the medulla a more intensive expression of receptors to ricinic lectin (++) was detected, compared to the intact group (+). At the same time, more intensive accumulation of the benzidine mark on immature PNA⁺-lymphocytes during the first 3 days of postnatal life in cortex and medulla was noted, and a greater difference in the intensity of expression was observed in the cortex, if to compare with the reference group (+++ vs + in accordance).

It was established that administration of dexamethasone to rats in the antenatal period leads to a decrease in the intensity of expression of cytokeratins 5/14 receptors during the first 2 weeks of life and to a progressive decrease in the area occupied by CK 5/14⁺-epitheliocytes throughout the observation period (on the 1st day relative area of CK 5/14⁺-cells is by 33.1% less, and by the 30th day it is by 63.5% less) compared to the intact group of animals.

It was found that in the group of antigen-primed animals there was an increase in the expression of cytokeratins 5/14 receptors during the all period of observation with a maximum in the first 3 days, and the specific area occupied by CK 5/14⁺-epitheliocytes was bigger during first 9 days after birth (particularly by 59.1% on the 1st day), if to compare with intact group of animals.

Key words: thymus morphogenesis, dexamethasone, staphylococcal anatoxin, thymic cortex, thymic medulla, lymphocytes, epithelioreticulocytes, PNA, WGA, LCA, RCA lectins, cytokeratin 5/14.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ,
СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

LCA	–	Lens culinaris agglutinin
PNA	–	Peanut agglutinin
RCA	–	Ricinus communis agglutinin
WGA	–	Wheat germ agglutinin
Int	–	інтактна група
K	–	контрольна група
SA	–	група тварин після введення стафілококового анатоксину
Dex	–	група тварин після введення дексаметазону
CK5/14	–	цитокератини 5/14
ШЙК	–	Шифф-йодна кислота
у.о.п.	–	умовна одиниця площі

Підписано до друку 11.06.2019. Гарнітура Times New Roman
Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,83

Наклад – 100 прим. Замовлення № 8392.

Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.