

АДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ

На правах рукописи
УДК: 616.981.49-097

ЮСУПОВА ЛУТФИ ЮЛДАШЕВНА

**МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИНТЕГРАЦИИ ИММУННОЙ
И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНО-ВСАСЫВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИЙ
В ТОНКОЙ КИШКЕ**

14.00.36 – аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Ташкент-2011

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний Министерства здравоохранения Республики Узбекистан

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
ГУЛЯМОВ Нариман Гулямович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
УРАЗМЕТОВА Маиса Дмитриевна

доктор медицинских наук
МАВЛЯН-ХОДЖАЕВ Равшан Шухратович

Ведущая организация: **Ташкентская медицинский
педиатрический институт**

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2011 г. в _____ часов на заседании Специализированного совета Д 015.89.01 при Институте иммунологии АН РУз по адресу: 100060, г. Ташкент, ул. Я. Гулямова, 74.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института иммунологии АН РУз.

Автореферат разослан «_____» _____ 2011 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета,
доктор медицинских наук

УМАРОВА А.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность работы. Иммунная система слизистой оболочки (ИССО) тонкой кишки является наиболее развитой и важной частью лимфоидной ткани, связанной с другими слизистыми оболочками. Она взаимодействует с центральными органами иммунитета, осуществляет модуляцию их деятельности, устанавливает динамическое равновесие во взаимоотношениях макро- и микроорганизмов, интегрирует свою деятельность с другими функциональными регуляторными системами организма, защищает внутреннюю среду от антигенов.

Современные представления об ИССО тонкой кишки сложились на основании фундаментальных представлений И.И.Мечникова, А.М.Безредка, Р.В.Петрова, М.В.Войно-Ясенецкого, К.А.Зуфарова, Р.М.Хайтова, Bienenstock и др. об иммуноцитах, врожденном и приобретенном, общем и местном иммунитете.

Однако, несмотря на установление общих закономерностей функционирования ИССО, представления об афферентном и эфферентном ее звеньях, формировании и интеграции ее с другими функциональными системами носят фрагментарный характер, не выяснены кинетика и механизмы рециркуляции лимфоцитов в лимфоидных узелках, взаимоотношения с лейкоцитами и клетками рыхлой соединительной ткани в собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки (Г.А.Игнатьева, 2003; Р.М.Хайтов, 2005; В.Т.Ивашкин, Н.Л.Денисов, 2009 и др.).

Несмотря на то, что просвет кишки млекопитающих при рождении заселяется микроорганизмами, количественный и качественный состав которых закономерно меняется на протяжении жизни и имеет существенное значение для развития и становления ИССО тонкой кишки, процесса пищеварения и всасывания (И.М.Воронцов, Е.М.Фатеева, 1998; А.И.Хавкин, 2006, 2009; О.К.Нетребенко, 2005-2009; И.Я.Конь, 1999-2009; С.В.Бельмер, 2009 и др.), данные о влиянии кишечной микрофлоры, индигенных ее представителей на ИССО немногочисленны. Между тем, изучение их морфо- и иммуногенности, влияния на интеграцию различных ее уровней, установление механизмов адаптации при безмикробном и контаминированном микроорганизмами состояниях имеет важное фундаментальное и прикладное значение для раскрытия взаимоотношений приобретенного и врожденного иммунитета (Е.М.Булатова, Е.А. Богданова, 2007; Е.А.Богданова с соавт., 2008; Е.М.Булатова с соавт., 2009; S.S.Ogra et al., 1998; W.A.Walker, 2000; Dobois V. et al., 2005 и др.).

Степень изученности проблемы. J.Bienenstock (1980) на основании анализа результатов собственных исследований, а также данных литературы впервые сформулировал представление об ИССО организма, афферентной и эфферентных ее звеньях, М-клетках. Последующие исследования И.М.Белякова (1997), Р.М.Хайтова и П.В.Пинегина (1997), А.А.Ярилина (2003), Ogra с соавт.(2002), Р.М.Хайтова (2005) и А.Ю.Юлдашева с соавт. (2008) внесли значительный вклад в ее изучение в норме и при некоторых заболеваниях. В результате сложились отчетливые представления о роли и значении эпителия,

структурно-функциональных зон лимфоидных узелков, Т- и В-зависимых зонах, рециркуляции лимфоцитов, дифференцировке, регуляции иммунного ответа, синтезе и секреции IgA и других классов иммуноглобулинов. Однако, наряду с этим к настоящему времени недостаточно изученными являются вопросы взаимосвязанного развития и становления пищеварения, всасывания и иммунной системы после рождения, до периода полового созревания; при отсутствии микрофлоры (стерильные условия), после ассоциации индигенными кишечными микроорганизмами. Рассмотрение целесообразности интеграции пищеварительно-транспортного конвейера и иммунной системы слизистой оболочки, определяющих гомеостаз, имеет важное как фундаментальное, так и клиническое значение. На основании полученных результатов будут раскрыты механизмы пищевых аллергий, атопических и других заболеваний, увеличивающихся ежегодно (О.Т.Камилова, 2001; И.И.Балаболкин, 2007; Н.Ш.Мачарадзе, 2007; Е.М.Булатова с соавт., 2009; Е.А.Корниенко с соавт., 2009; В.М.Бондаренко, Е.В.Рябченко, 2010; О.К.Нетребенко, 2010 и др.).

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Тема диссертационной работы входит в план научно-исследовательских работ НИИЭМИЗ МЗ РУз.

Цель исследования: Изучение формирования иммунной системы слизистой оболочки тонкой кишки и механизмов ее интеграции с пищеварением и всасыванием при регуляции гомеостаза.

Задачи исследования:

1. Изучить развитие и становление ИССО тонкой кишки в постнатальном оттогенезе крыс при естественном вскармливании и нормальном микробиоценозе в ней.
2. Изучить структурные особенности ИССО тонкой кишки у безмикробных крыс.
3. Изучить структурные особенности ИССО тонкой кишки безмикробных крыс при ассоциации лактобактериями, нормальной кишечной микрофлорой через 1, 14 суток и 3 месяца.
4. Изучить механизмы организации пищеварительно-транспортного конвейера и регуляции гомеостаза в слизистой оболочке тонкой кишки крыс в периоды грудного вскармливания и дефинитивного питания.

Объект и предмет исследования: Белые беспородные крысы различного возраста (n=187), безмикробные породы OFA и линии F-344 Фишер (n=3); безмикробные, ассоциированные лактобактериями (n=9), кишечной микрофлорой (n=9); слизистая оболочка тонкой кишки, грудное молоко, бычий сывороточный альбумин, пейерова бляшка.

Методы исследования: Иммунологические, морфологические, биохимические, автордиографические, статистические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Аффферентная и эфферентная звенья ИССО тонкой кишки развиваются и формируются в течение периода естественного вскармливания и воздействия нормальной кишечной микрофлоры.
2. У стерильных крыс аффферентное звено ИССО тонкой кишки почти не развивается, эфферентное слабо активировано. Ассоциация их

лактобактериями или нормальной кишечной микрофлорой оказывает соответственно слабое или выраженное морфогенное и иммуногенное влияние на ИССО тонкой кишки.

3. Лимфобласты структурно-функциональных зон лимфатического узелка пейеровой бляшки взаимосвязаны между собой и рециркулирующим их пулом в крови. Лимфоидные клетки, инфильтрирующие эпителий, макрофаги с полиморфными лизосомами, взаимодействующие с Т- и В-лимфобластами в зоне купола, являются морфологическим эквивалентом стимуляции антигенами дифференцировки иммуноцитов.
4. Иммунная и пищеварительно-всасывательная системы слизистой оболочки тонкой кишки формируются взаимосвязанно и их интеграция регулирует в ней расщепление, транспорт и гомеостаз.

Научная новизна. Впервые экспериментально у крыс при естественном вскармливании показано формирование ИССО тонкой кишки, кинетика лимфоцитов структурно-функциональных зон лимфатического узелка пейеровой бляшки, взаимосвязь их с рециркулирующим пулом в крови. Интеграция иммунной и пищеварительно-всасывательной функций в слизистой оболочке тонкой кишки является адаптацией к дефинитивному питанию и регулирует гомеостаз. У стерильных крыс афферентное звено ИССО находится в гипоплазированном состоянии, структуры эфферентного звена слабо активированы: макрофаги почти не выявляются, плазматические клетки единичны, функционально не активны. Лактобактерии и нормальная кишечная микрофлора, введенные стерильным крысам, обладают различной иммуногенностью. Впервые в эфферентном звене ИССО тонкой кишки показано интегрирование лейкоцитов и клеток рыхлой соединительной ткани.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Работа носит как фундаментальный, так и прикладной характер. На основании изучения динамики формирования и интеграции пищеварительно-всасывательной и иммунной систем в слизистой оболочке тонкой кишки при грудном вскармливании и адаптации при переходе на дефинитивное питание научно обоснованы системообразующие свойства грудного молока. Они могут быть положены в основу практических рекомендаций рационального вскармливания, гармоничного развития детей, профилактики аллергических, гастроэнтерологических и других заболеваний. Комплексными методами исследования в тонкой кишке в динамике возраста, кроме иммунной, возможно изучение интеграции эдокринной и нервной систем, имеющих важное значение при организации пищеварения, всасывания и регуляции гомеостаза. Установленная различная степень иммуногенности и морфогенности кишечной микрофлоры позволяет углубить изучение свойств отдельных их штаммов и использовать при профилактике кишечных заболеваний и дисбактериозов, при патогенетической коррекции нарушений питания, разработке высокоадаптированных искусственных питательных смесей.

Реализация результатов. По материалам диссертации выпущена и внедрена в учебный процесс 1 методическая разработка.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на: VI Республиканском съезде педиатров (Ташкент, 18-19 ноябрь, 2009г.), Республиканской конференции физиологов (Ташкент, 19 ноябрь, 2009), V Республиканском съезде микробиологов, инфекционистов и эпидемиологов (Ташкент, 2010), VII Международном Конгрессе педиатров тюркоязычных народов (Астана, 16-18 сентября 2010), межлабораторном заседании НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний МЗ РУЗ (2010), научном семинаре при Институте иммунологии АН РУЗ (2011).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 3 журнальные статьи.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на русском языке, на 176 страницах компьютерного текста и состоит из введения, глав обзор литературы, материал и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение, а также выводов и списка использованной литературы. Список литературы включает 280 источников на русском и узбекском языках и 119 - на иностранных языках. Работа иллюстрирована 7 таблицами, 63 микрофотографиями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

В главе I анализируются многочисленные данные литературы о формировании иммунной, пищеварительной систем до и после рождения. Отмечается, что до настоящего времени в динамике постнатального онтогенеза не раскрыты интеграция ИССО и пищеварительно-всасывательной функций в слизистой оболочке тонкой кишки, роль и значение кишечной микрофлоры, афферентного и эфферентного звеньев ИССО.

Глава 2, разделы 1-6 описывают материал и методы исследования. 2.1. Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах различного возраст ($n=187$), находящихся в обычных условиях вивария, и безмикробных 3-6 мес. крысах породы OFA линии F-344 Фишер ($n=21$). Сроки исследования нами выбраны на основании данных литературы о периодах вскармливания животных, формировании функциональной системы пищеварения и всасывания (L.Vollrat, 1969; J.Deren, 1998; R.Gossrau, 2005), возрастной периодизации лабораторных животных (В.И.Западнюк, 1971).

Формирование ИССО, функциональной системы пищеварения и всасывания в постнатальном периоде жизни, механизмы его регуляции в тонкой кишке крыс изучены в 2 сериях экспериментов: I (контрольная) - после естественного вскармливания грудным молоком (1, 3, 7, 14 сутки после рождения) и стандартной лабораторной пищей (21 и 90 дни после рождения); II (опытная) – после однократного перорального кормления 0,2-0,4 мл раствором бычьего сывороточного альбумина или гамма-глобулина человека (1, 3, 14, 21 и 90 суток после рождения). Кормление раствором гетерологичного белка осуществлялось после 3-часового голода, с помощью эластичного зонда, прикрепленного к шприцу. Крысы I, II серий забивались в сроки 10, 20, 30, 60 минут, 3,6, 9 часов после кормления.

Морфогенность и степень иммуногенности кишечной микрофлоры, отдельных ее представителей устанавливалась при исследовании слизистой оболочки тонкой кишки и пейеровой бляшки крыс породы OFA и линии F-344 Фишер в следующих группах: 1.- безмикробные (n=3); 2.- безмикробные, ассоциированные *Lactobacillus plantarum* 8P3 и *Lactobacillus fermentum* 90-T-4 (n=9; через 1, 14 и 90 суток); 3.- безмикробные, контаминированные нормальной кишечной микрофлорой (n=9; через 1, 14, 90 суток).

2.2. Иммунологические методы исследования. Иммуноглобулиновые рецепторы на поверхности мембран лимфоцитов и энтероцитов выявлены иммунопероксидазным методом. Криостатные срезы кусочков тонкой кишки или пейеровой бляшки после фиксации в 1% растворе глутар-альдегида (рН 7,3; 30 мин.) и промывки фосфатным буфером (60 мин.) инкубировали с антисывороткой к IgA, IgG, IgM, конъюгированной пероксидазой хрена. Контрольные срезы обрабатывали только пероксидазой хрена. После окончания инкубации срезы обрабатывали раствором 3,3-диаминбензидина (10 мин.) и промывали в фосфатном буфере. После фиксации в 1% растворе осмиевой кислоты (60 мин.) и обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации заливали в аралдит. Ультратонкие срезы просматривали без контрастирования или после обработки уранил-ацетатом и цитратом свинца. Продукт реакции на пероксидазу, конъюгированную с иммуноглобулинами А, выявляется в составе надэпителиального слоя слизи, в виде своеобразной каймы на мембранах микроворсинок энтероцитов, плазматических клеток (В-лимфоцитов). Продукт реакции выявляется также на поверхности эндоцитозных образований энтероцитов, что связано с неспецифической сорбцией иммуноглобулинов Fc-рецепторами. Идентичность белка (человеческий гамма-глобулин), введенного перорально крысам различного возраста и абсорбированного ворсинками тощей кишки, устанавливали после получения криостатных срезов, которые покрывали флуоресцирующей антисывороткой (И.М. Михайлов, 1968). Срезы просматривали в люминисцентном микроскопе МЛ-2.

2.3. Морфологические методы исследования. Морфологические исследования слизистой оболочки фундальной части желудка, двенадцатиперстной, тощей, подвздошной кишки и поджелудочной железы белых беспородных крыс проведены в сроки 1, 3, 7, 14, 21 и 90 дней после рождения крыс. Для общеморфологических, гистохимических и морфометрических исследований кусочки тканей фиксированы в 12% нейтральном растворе формалина и жидкости Карнуа. После проводки по спиртам возрастающей концентрации и заливки в парафин срезы толщиной 5-6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Учитывая, что бокаловидные клетки и надэпителиальный слой слизи вдоль всей поверхности тонкой кишки принимают активное участие в адаптивных реакциях, формировании пищеварительно-транспортного конвейера, интеграции ферментов и иммуноглобулина А, регуляции гомеостаза, защите внутренней среды от микроорганизмов и антигенов, срезы окрашены ШИК- и Хейл-реакцией (для подсчета числа бокаловидных клеток и выявления свойств надэпителиального слоя слизи). На ориентированных срезах тонкой кишки, окрашенных гематоксилином и эозином (парафиновые срезы), основным фуксином и

метиленовым синим (полутонкие срезы) окуляр-микрометром МОВ-15х измеряли высоту ворсинок, глубину крипт, толщину слизистой оболочки, диаметр кишки. На основании соотношения линейных параметров ворсинок и крипт выводился индекс слизистой оболочки, который характеризует взаимоотношения в структурно-функциональной системе крипта-ворсинка, пространственно и топографически разобщенных пулах эпителия: пролиферирующих и дифференцирующихся - в криптах, функционирующих и экструзирующихся - с поверхности ворсинок. Этот же показатель определяет становление системы крипта-ворсинка в динамике возраста, формирование проксимо-дистального градиентов пищеварения и всасывания.

У крыс в динамике возраста вдоль тонкой кишки под микроскопом МБС-9 осуществлен подсчет числа пейеровых бляшек; на полутонких срезах, проходящих через ее середину, установлены число лимфатических узелков, линейные параметры, взаимоотношения в них стромальных и иммунных клеток.

Для электронномикроскопических исследований кусочки тканей тонкой кишки и пейеровой бляшки фиксировали в забуференном 2,5% растворе глутар-альдегида (20 мин.), 1% растворе осмиевой кислоты (1,5 часа) при рН 7,2-7,3. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации кусочки заливали в аралдит. Полутонкие (1-2 мкм толщиной) и ультратонкие (600 А) срезы получены на ультрамикротоме LKB-4800. Полутонкие срезы окрашены основным фуксином и метиленовым синим; ультратонкие – контрастированы уранил-ацетатом и цитратом свинца (E.Reynolds, 1963). Электронномикроскопическое выявление активности кислой фосфатазы в лизосомах энтероцитов ворсинок тонкой кишки осуществлено по Гомори после инкубации срезов толщиной 30-40 мкм с субстратом. Дальнейшая обработка кусочков тканей и подготовка к просмотру – общепринятым способом. Просмотр ультратонких срезов произведен в микроскопе JEM-100S.

2.4. Авторадиографические исследования. В связи с тем, что лимфатические узелки пейеровых бляшек представляют собой афферентное звено ИССО, с эфферентным звеном связаны обратной связью, осуществляют иммуномодуляцию, имеют структурно-функциональные зоны, различающиеся пулами рециркулирующих лимфоцитов и уровнем пролиферации, проведено изучение кинетики лимфоидных клеток и эпителия через 1, 2, 3, 7 и 24 часа (после однократной инъекции) и 1, 2, 3 и 24 часа (двух- и трехкратных инъекций Нз-тимидина). Интервал между инъекциями 5-6 часов. Благодаря этому достигается насыщение крови предшественником ДНК и максимальное мечение пула лимфоидных клеток, находящихся в синтетической фазе клеточного цикла (О.И.Епифанова, В.В.Терских, 1977). Кусочки тканей тонкой кишки и пейеровой бляшки фиксированы в жидкости Карнуа. Гистологические срезы толщиной 5-6 мкм после депарафинизации покрывали жидкой фотоэмульсией и через 20-22 дня проявляли и окрашивали гематоксилином. Индекс меченых ядер (ИМЯ) эпителия и лимфоидных клеток выводился после просмотра 3-4 тыс. клеток и выражен в промиллях.

2.5. Биохимические исследования. Для установления механизмов пищеварения и всасывания, интеграции с иммунной системой слизистой

оболочки тонкой кишки, медленных (в динамике возраста) и быстрых (после однократного кормления, в динамике пищеварения и всасывания) адаптаций биохимически в гомогенате слизистой оболочки изучены активности кислой фосфатазы (КФ 3.1.3.2.), катепсина Д (КФ 3.4.23.5) в проксимальном и дистальном отделах тонкой кишки в периоды грудного вскармливания и дефинитивного питания. Активность ферментов сравнительно изучена после однократного вскармливания грудным молоком или 7% бычьим сывороточным альбумином (3- и 14-дневные крысы, I серия) и после перехода на дефинитивное питание (21- и 90-дневные крысы, II серия). Для определения активности кислой фосфатазы и катепсина Д в качестве субстратов использованы соответственно бета-глицерофосфат натрия и гемоглобин (А.М.Уголев, Н.Н.Иезуитова, 1969). Активность изучаемых ферментов выражена в мкмольях соответствующего продукта в мин. на мг белка; белок определен по O.Lowry с соавт. (1951).

При проведении биохимических исследований тонкая кишка после осторожного отделения от брыжейки помещалась на поверхность охлажденного льдом стекла, разрезалась вдоль всей ее длины. Затем она делилась на 2 части. Соскоб слизистой оболочки гомогенизировался. На каждый срок исследования использовано не менее 6 крыс.

2.6. Статистические исследования. Статистическая обработка всех количественных результатов производилась с учетом критериев Г.Ф.Лакина (1990) на персональном компьютере Pentium 4 с применением пакета программ. При этом вычисляли среднюю арифметическую (M), ее ошибку (m) и достоверность (P); различия считались достоверными при $P < 0,05$.

Глава III посвящена результатам собственных исследований. В разделе 3.1. показано формирование иммунной системы слизистой оболочки (ИССО) тонкой кишки крыс в динамике возраста при естественном вскармливании, ее особенности у стерильных крыс до и после ассоциации лактобактериями, нормальной кишечной микрофлорой.

У 3 мес. крыс с нормальной кишечной микрофлорой она состоит из 2 частей: афферентной (до 5-6 лимфатических узелков пейеровой бляшки) и эфферентной (собственная пластинка слизистой оболочки, межэпителиальные лимфоциты и мезентериальные лимфоузлы). Структурно и функционально каждый лимфатический узелок имеет зародышевый (герминативный, В-бласты) центр; фолликулярную (В-лимфобласты); парафолликулярную (Т-лимфобласты) зоны и купол (Т- и В-лимфоциты, бласты). На поверхности купола находятся М- и единичные нейрорецепторные клетки, инфильтрированные многочисленными Т-лимфоцитами. Согласно литературным данным, М-клетки рецептор-опосредованным эндоцитозом транспортируют антигены из просвета кишки к межэпителиально расположенным антиген-связывающим Т-лимфоцитам (Bienenstock, 1980; А.А.Ярилин, 2003; Р.М.Хайтов, 2005; В.Т.Ивашкин, 2008 и др.), которые регулярно мигрируют в зону купола лимфатического узелка и, взаимодействуя с макрофагами, стимулируют Т- и В-лимфобласты. Если Г.В.Пинегин, М.М.Карсонов (2009) характерной особенностью макрофагов организма считают высокофункциональную активность, слабую способность

синтезировать провоспалительные кинины, то в зоне купола их деятельность зависит от свойств антигенов, и, несомненно, регулирует дифференцировку Т- и В- бластов.

Зоны лимфатического узелка имеют характерный состав клеток и он существенно не различается при сравнении с данными других авторов (М. Р. Сапин с соавт., 1986; З. С. Хлыстова с соавт., 1996; Ogra et al. 2002 и др.). При автораддиографическом изучении кинетики лимфоидных клеток через 1 час после однократного введения Нз-Т ИМЯ герминативной, фолликулярной, парафолликулярной зон и купола равен соответственно $0,29 \pm 0,003$, $0,52 \pm 0,004$, $2,04 \pm 0,03$ и $0,57 \pm 0,005\%$. Это свидетельствует о различном уровне пролиферативной активности лимфоидных клеток в них. Через 2 часа ИМЯ лимфоидных клеток в герминативной, фолликулярной, парафолликулярной зонах и куполе возрастает соответственно в 9; 9,3; 4,6; 1,3 раза в среднем. За это время ИМЯ эпителия вырос в 1,75 раза. Если изменение ИМЯ эпителия вызвано его митотическим делением, то существенный прирост ИМЯ в зонах лимфатического узелка объясняется миграцией в них из кровотока Т- и В-лимфобластов. Через 3 часа прирост ИМЯ в герминативной, фолликулярной, парафолликулярной зонах и куполе составляет соответственно 2,2; 2,5; 1,6 и 6 раз в среднем по сравнению с предыдущим сроком опыта. ИМЯ эпителия практически остался без изменения. Значительный прирост меченых лимфоидных клеток в куполе и умеренный – в других зонах, на наш взгляд, происходит вследствие их миграции из всех зон лимфатического узелка в купол и из него в кровь. Поэтому через сутки в куполе обнаруживаются лишь единичные меченные лимфоидные клетки. Следовательно, зоны лимфатического узелка афферентного звена ИССО тонкой кишки отличаются уровнем пролиферации, скоростью миграции бластных клеток из крови, Т- и В-зависимых зон в купол.

При двух- и трехкратном введении Нз-Т с интервалом 5-6 часов ИМЯ лимфоидных клеток в герминативном центре через 1 час в 16 и 35 раз соответственно больше, чем после однократной инъекции. В фолликулярной зоне эта разница составляет соответственно 50 и 150 раз в среднем. В парафолликулярной Т-зависимой зоне ИМЯ после 2- и 3-кратного введения Нз-Т больше, чем после однократного, соответственно в 6 и 9 раз в среднем. Это свидетельствует о преимущественной миграции из кровотока в афферентное звено ИССО тонкой кишки В-бластов, чем Т-клеток.

Если у 3 мес. крыс количество пейеровых бляшек вдоль тонкой кишки варьирует от 17 до 28 (в среднем $24,5 \pm 1,8$), то у односуточных крыс они едва выявляются в каудальной части 12-типерстной и подвздошной кишки. Среди диффузно расположенных лимфобластов доля митотически делящихся составляет $2,4 \pm 0,2\%$. В динамике возраста (1,3,7,14,21,90 дней после рождения) число пейеровых бляшек в слизистой оболочке тонкой кишки постепенно увеличивается. Через 2 недели после рождения крыс, ко времени перехода на смешанное питание их число возрастает до $10,5 \pm 1,4$. В лимфатических узелках тощей кишки различается герминативная зона, где концентрируются в основном бластные и делящиеся клетки. Макрофаги выявляются редко, содержат в цитоплазме умеренное число полиморфных лизосом. После

перехода на окончательное питание вдоль тонкой кишки насчитывается в среднем 24-28 пейеровых бляшек с различным числом лимфатических узелков, отчетливыми структурно-функциональными зонами. Эпителий, выстилающий пейеровы бляшки, инфильтрируется лимфоцитами.

Таким образом, формирование афферентного звена ИССО тонкой кишки завершается в основном после рождения, ко времени перехода на окончательное питание.

В афферентном звене ИССО тонкой кишки также с конца 3 недели после рождения вместо ранее выявляемых бластных клеток отмечаются дифференцированные плазматические, тучные и другие клетки рыхлой соединительной ткани, единичные макрофаги с мелкими вторичными лизосомами. С ними тесно взаимодействуют Т- и В-лимфоциты. Между энтероцитами крипт меньше, ворсинок больше, обнаруживаются Т-лимфоциты.

На структуру и функцию слизистой оболочки, афферентное и афферентное звенья ИССО тонкой кишки существенное влияние оказывают кишечные микроорганизмы. У стерильных животных лимфатические узелки в пейеровых бляшках почти не различаются: определяются лишь единичные мелкие скопления малых лимфоцитов, лимфобластов и ретикулярных клеток. Призматический эпителий над ними типичной структуры, инфильтрирован единичными лимфоцитами. Через 1 и 14 дней после введения стерильным крысам лактобацилл в скопления лимфоидной ткани кишки видимых структурных изменений не обнаружено. В мезентеральных лимфатических узлах к концу 2 недели образуются корковое и мозговое вещества, возникают единичные фолликулы с характерными структурно-функциональными зонами. В мякотных шнурах около посткапиллярных венул выявляются группы плазматических клеток.

Если стерильных крыс контаминировать кишечной микрофлорой, то через 2 недели в слизистой оболочке тонкой кишки отчетливо различаются пейеровы бляшки со всеми структурно-функциональными зонами и соответствующими клетками в них.

Кишечные микроорганизмы обладают различной иммуногенностью не только при формировании афферентного звена ИССО. Они оказывают выраженные морфо- и иммуногенное влияние на слизистую оболочку, на афферентное звено ИССО тонкой кишки. У стерильных 3 мес. крыс ворсинки тонкой кишки тонкие и длинные, уменьшаются от тощей к подвздошной кишке от 785 ± 35 до 660 ± 45 мкм; крипты от 210 ± 19 до 190 ± 16 мкм (Индекс слизистой 3,74). Энтероциты ворсинок узкие, высокие, микроворсинки тоньше и длиннее, комплекс Гольджи чаще гипоплазирован, межэпителиальные лимфоциты единичны. На дне крипт клетки Панета содержат относительно много секреторных гранул, часть которых в состоянии кристаллизации. После контаминации стерильных крыс нормальной кишечной микрофлорой через 2 недели ворсинки становятся короче и толще, в проксимо-дистальном направлении изменяются от 560 ± 45 до 310 ± 30 мкм; крипты - от 260 ± 19 до 180 ± 17 мкм (Индекс слизистой 1,90). Секреторные гранулы клеток Панета в основном электроннопрозрачны, в состоянии постоянной секреции; увеличивается инфильтрация эпителия лимфоцитами.

Микроорганизмы и их антигены оказывают также выраженное влияние на соотношение и функциональное состояние клеток собственной пластинки слизистой оболочки. У стерильных крыс она истончена, содержит мало соединительнотканых клеток и лейкоцитов, секреторные гранулы тучных клеток плотные, крупные, эозинофильные клетки, контактирующие с ними, без отростков, с небольшим числом секреторных гранул. Нервные терминалы имеют значительное число светлых и темных пузырьков. У конвенциональных крыс собственная пластинка утолщена, тучные клетки со светлыми секреторными гранулами, эозинофилы многоотростчатые с варьирующим числом секреторных гранул. Плазмциты располагаются группами по 3-4 клетки, функционально активны, часто взаимодействуют с крупными макрофагами, содержащими полиморфные лизосомы. Нервные терминалы содержат единичные секреторные гранулы.

Лактобациллы, которые при рождении первые заселяют стерильную тонкую кишку, способствуют формированию нормального микробиоценоза, колонизационной резистентности (Б.А.Шендеров, 1995; А.И.Хавкин, 2006) На 1-14 сутки после их введения стерильным крысам слизистая оболочка тощей и подвздошной кишки незначительно утолщается, кровеносные и лимфатические капилляры расширяются. В эпителии ворсинок подвздошной кишки на 150% увеличивается инфильтрация лимфоцитами, возрастает доля эозинофилов, функциональная активность плазматических, тучных и эозинофильных клеток.

Следовательно, структурно-функциональные перестройки в афферентном и эфферентном звеньях ИССО тонкой кишки после введения стерильным крысам лактобацилл, нормальной микрофлоры следует рассматривать как закономерные, адаптивные, генетически детерминированные. Они оптимальны и, надо полагать, в полном объеме реализуются при естественном вскармливании и формировании нормального микробиоценоза в тонкой кишке в раннем постнатальном онтогенезе млекопитающих.

В разделе 3.2. приводятся данные о формировании функциональной системы пищеварения, всасывания и регуляции гомеостаза в слизистой оболочке тонкой кишки крыс в постнатальном онтогенезе.

У новорожденных 1-3 суточных крыс фундальные железы желудка редкие, короткие, находятся на ранней стадии развития. Поджелудочная железа имеет единичные сформированные ацинусы. На поверхности слизистой оболочки тонкой кишки имеются сформированные и формирующиеся ворсинки, крипты - на начальной стадии образования, редкие. Энтероциты ворсинок высокодифференцированные, имеют многочисленные микроворсинки и тубуло-везикулярные эндоцитозные образования. Гидролитически-транспортные ферменты в них в течение первой недели жизни крыс не определяются. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями (А.И.Клиорин, 1980; И.Я.Конь, 2006; О.Н.Нетребенко, 2007; Г.Ф.Коротько, 2009; К.Е.Webb, 1990; U.Walker, 1997; Robberecht, 2001; L.R.Jonston, 2006 и др.). Однако, при так называемой «незрелости» функциональной системы пищеварения в период грудного вскармливания отмечается высокая совершенство процессов пищеварения, всасывания и

регуляции гомеостаза. Полостное пищеварение у них осуществляется ферментами, которые содержатся в составе грудного молока, а также образуются микроорганизмами, заселившими желудочно-кишечный тракт при рождении (А.И.Хавкин, 2006). Фермент-субстратная адаптация предполагает переваривание пластических нутриентов молока и сохранение содержащихся в нем биологически активных веществ (иммуноглобулины, гормоны, факторы роста и т.д.).

Электронномикроскопически уже через 10 минут после однократного кормления 1-3 дневных крысят почти все многочисленные тубуло-везикулярные образования, имеющие на своей поверхности Fc-рецепторы, отделяются от основания микроворсинок энтероцитов ворсинок 12-типерстной и тощей кишки и перемещаются к структурам комплекса Гольджи над ядром. На этом основании число Fc-рецепторов и объем тубуло-везикулярных образований рассматривается нами как мера регуляции количества и качества абсорбируемого энтероцитами как биологически активных, так и пластических субстратов, содержащихся в грудном молоке млекопитающих. Комплекс Гольджи наряду с аккумуляцией абсорбированного субстрата с помощью везикул транспортирует их в межэпителиальное пространство. Согласно исследованиям К.А.Зуфарова (1983); К.А.Зуфарова, А.Ю.Юлдашева (2001), Е.С.Снигиревской с соавт. (2006); Ш.У.Турдикуловой (2008), рецепторы мембраны комплекса Гольджи, взаимодействуя с «сигнальными» локусами абсорбированного субстрата непосредственно или через Fc-рецептор, определяют пути его транспорта: к латеральной или апикальной плазмолемме, лизосомам. Если энтероцитами абсорбированы ингредиенты грудного молока, то его везикулы выгружают их в межэпителиальное пространство в течение 2-3 часов. Из них и интерстиция абсорбированные вещества транспортируются в лимфатические и кровеносные капилляры в среднем в течение 6 часов.

Активности кислой фосфатазы и катепсина Д в гомогенате слизистой оболочки проксимального и дистального отделов тонкой кишки крыс 3,14 (грудное молоко), 21 и 90 (дефинитивное питание) дней после рождения через 1-3 часа после однократного кормления достоверно не увеличиваются.

Если в идентичных условиях, т.е. после 3-часового голода, 1-3-дневным крысятам *per os* ввести около 0,2 мл 7% раствора бычьего сывороточного альбумина или раствор человеческого гамма-глобулина, то через 10 мин. в энтероцитах ворсинок изучаемых отделов тонкой кишки наблюдается процесс всасывания эндоцитозом. Однако через 0,5 часа комплекс Гольджи не только аккумулирует абсорбированный субстрат, но и переносит его часть в сформированные лизосомы, межэпителиальное пространство и интерстицию. Между энтероцитами ворсинок появляются моноцитоподобные клетки. При вскармливании грудным молоком этого не наблюдалось. Через 1 час после начала всасывания в интерстиции транспортируемый субстрат переваривается также во вторичных лизосомах макрофагов. Транспорт гетерологичного белка через слизистую оболочку тонкой кишки завершается в среднем через 9 часов после однократного его перорального введения. Через 14 дней после рождения крыс ультраструктурные особенности слизистой оболочки тонкой кишки, абсорбирующей альбумины или гамма-глобулины, почти аналогичны

описанным выше. Активности кислой фосфатазы и катепсина Д в гомогенате проксимального и дистального отделов тонкой кишки крыс 3- и 14-суточных крыс после однократного введения бычьего сывороточного альбумина возрастают в 2 раза ($P < 0,01$); они почти не изменяются у 21- и 90-суточных животных. Идентичность белка, введенного *per os* и абсорбированного энтероцитами ворсинок слизистой оболочки тонкой кишки, установлена иммунофлуоресцентным методом.

Через 3 недели после рождения переход крыс на definitivo питание завершает структурно-функционального становления желудка, поджелудочной железы и тонкой кишки. В фундальных железах желудка различаются зоны, щечные, париетальные, главные и эндокринные клетки. В поджелудочной железе выявляются многочисленные ацинусы с высокодифференцированными экзокриноцитами. В слизистой оболочке вдоль тонкой кишки формируется система крипта-ворсинка, на поверхности **энтероцитов ворсинок** - несколько барьерно-защитных уровней, которые взаимосвязанно и согласованно осуществляют пищеварение, всасывание и регуляцию гомеостаза. Первым из них является просвет кишки, где пищеварение **осуществляют ферменты поджелудочной железы, желчи, собственно энтеральные, экструзированных энтероцитов и лейкоцитов, нормальной кишечной микрофлоры.**

Вторым уровнем гидролиза нутриентов, защиты слизистой оболочки и внутренней среды является надэпителиальный слой слизи. Он надежно, по периметру и вдоль всей кишки относительно надежно отделяет просвет органа от поверхности ее слизистой оболочки. В его состав входят ферменты панкреатические, энтеральные, нормальной микрофлоры, экструзированных энтероцитов и лейкоцитов. В нем в интегрированном состоянии находятся также субстрат-связывающие белки, sIgA, бактерии резидентной флоры (Ю.М.Гальперин, П.И.Лазарев, 1986; И.А.Морозов, 1998; А.Б.Петров с соавт., 2004; А.И.Хавкин, 2006; Johnson, 2006). Процессы, протекающие в надэпителиальном слое слизи, просвете кишки и на поверхности ворсинок интегрированы между собой.

III- водно-электролитный слой расположен под слоем слизи и сбалансирован по составу электролитов, pH. Он стерилен, содержит энтеральные ферменты, высокую концентрацию sIgA, электролиты (Ю.М.Гальперин, П.И.Лазарев, 1986).

IV, заключительный, этап пищеварения осуществляется на поверхности мембран микроворсинок. Он пространственно (топографически) сопряжен с первой фазой всасывания – через плазмолемму микроворсинок в энтероциты. Электронномикроскопически в нем различают гликокаликс, плазмолемму микроворсинок и единичные эндоцитозные впячивания. Он также стерилен и включает гидролитические и транспортные ферменты, sIgA. Ферменты мембранного пищеварения, находясь на границе раздела внешней и внутренней сред организма, сопряжены с ферментами, которые транспортируют образующиеся конечные продукты гидролиза через плазмолемму в цитоплазму энтероцитов (А.М.Уголев, 1972; 1985; И.А.Морозов с соавт., 1988; И.А.Морозов, 1998; С.Т. Метельский, 2009 и др.]. SIgA, который определяется на каждом из рассматриваемых этапов пищеварения и I фазе всасывания,

интегрирован с ферментами. Он, связывая антигены (пища, экзо- и эндотоксины микроорганизмов), увеличивает их массу, препятствует прохождению через гликокаликс, способствует перевариванию при перемещении к поверхности всасывающих клеток.

Однако и после перехода на окончательное питание у крыс, как и у людей (И.А.Морозов с соавт., 1988; И.А.Морозов,1998; Л.И.Аруин,1998; Johnson,2006 и др.), между основаниями микроворсинок энтероцитов ворсинок тощей кишки сохраняются единичные эндоцитозные образования. При пероральном введении крысам 3-недельного или 3-месячного возраста пероксидазы хрена через 1 час в надъядерной цитоплазме энтероцитов тощей кишки обнаруживаются везикулы с электронноплотным содержимым. Эти данные объясняют единичные лизосомы в энтероцитах, полиморфные лизосомы в макрофагах интерстиция, многочисленность иммуноцитов, интегрирующихся с клетками рыхлой соединительной ткани в эфферентном звене ИССО тонкой кишки.

Таким образом, несмотря на формирование высокоадаптированной совершенной функциональной системы пищеварения, всасывания после перехода на окончательное питание, эндоцитозный механизм транспорта антиген-значимых субстратов из просвета тонкой кишки в энтероциты ворсинок и интерстиция сохраняется. Рецепторный эндоцитоз энтероцитов ворсинок тонкой кишки, функционирующий наряду с мембранным пищеварением и всасыванием мономеров, с одной стороны, предотвращает потерю негидролизированных нутриентов; с другой стороны, поддерживает напряженность иммунного потенциала в слизистой оболочке органа. Независимо от афферентного звена ИССО тонкой кишки, стимуляция Т- и В-бластов в интерстиция ворсинок способствует, на наш взгляд, гармоничному функционированию ее эфферентного звена. Это эволюционно сохранившееся свойство эфферентного звена ИССО тонкой кишки, при структурном и топографическом обособлении лимфоидных узелков увеличивает надежность ее функционирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы:

1. Афферентное и эфферентное звенья ИССО и функциональная система пищеварения, всасывания формируются и интегрируются в раннем постнатальном онтогенезе для адаптации к дефинитивному питанию.
2. Лактобациллы и кишечная микрофлора при введении стерильным крысам через 2 недели вдоль тонкой кишки в различной степени изменяют структуру афферентного и эфферентного звеньев ИССО, параметры ворсинок и крипт, повышают пролиферативную активность эпителия крипт, секреторную активность клеток Панета, тучных, эозинофильных, плазматических клеток, нервных терминалей.
3. Изучение динамики и степени возрастания ИМЯ лимфоидных клеток структурно-функциональных зон лимфатического узелка пейеровых бляшек тонкой кишки через 1,2,3,7 и 24 часа (однократная инъекция) и 1,2,3 и 24 часа (2- и 3-кратная инъекция Нз-тимидина) выявляет

различный в них уровень пролиферации, степень миграции бластов из крови; перемещение Т- и В-бластов из всех зон в купол, где взаимодействие с макрофагами определяют их дифференцировку.

4. В течение 3-недель, ко времени перехода на окончательное питание. взаимосвязанно происходит становление фундальных желез желудка, дифференцировка его железистых клеток; экзокринной части поджелудочной железы, системы крипта-ворсинка, афферентного и эфферентного звеньев иммунной системы слизистой оболочки тонкой кишки и их интеграция.
5. В динамике возраста всасывание гомологичных (грудное молоко) и гетерологичных белков (бычий сывороточный альбумин или человеческий гамма-глобулин) происходит рецепторным эндоцитозом и регулируется при транспорте через энтероциты и интерстицию ворсинок тонкой кишки.
6. Переход на окончательное питание с конца 3 недели после рождения крыс характеризуется формированием в слизистой оболочке тонкой кишки интегрированной функциональной системы, в которой пищеварение в полости, слое слизи, на поверхности энтероцитов ворсинок, всасывание протекают взаимосвязанно и при содействии афферентного и эфферентного звеньев ИССО.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Юлдашев А.Ю., Рахманов Р.Р., Нишанова А.А., Юсупова Л.Ю. Механизмы регуляции гомеостаза при всасывании белка из тонкой кишки в кровь //Мед.журнал Узбекистана.-Ташкент, 2009.-№5.-С. 79-87
2. Нишанова А.А., Юлдашев А.Ю., Юсупова Л.Ю. и др. Грудное вскармливание как основа формирования совершенных функциональных систем организма //Тез. VI съезда педиатров.-Ташкент, 2009.-С. 330-331
3. Шодыев Х.К., Мананов А.М., Пигарев В.Я., Юсупова Л.Ю., Юлдашев М.А. Совершенствование методов коррекции дисфункции желудочно-кишечного тракта у детей первого года жизни с атопическим дерматитом //Тез. VI съезда педиатров.-Ташкент, 2009.-С. 497
4. Гулямов Н.Г., Юсупова Л.Ю., Нишанова А.А. Развитие и становление интегративных отношений ИССО тонкой кишки //Врач-аспирант.-Воронеж, 2010.-№2.1 (39).-С. 149-153
5. Юсупова Л.Ю., Исламова Г.Р., Рахматова М.Х. Морфо- и иммуногенное влияние кишечной микрофлоры //Инфекция, иммунитет и фармакология.- Ташкент, 2010.-№1-2.-С. 213-216
6. Гулямов Н.Г., Юсупова Л.Ю., Нишанова А.А., Исламова Г.Р. Интеграция пищеварительно-всасывательной и иммунной функций тонкой кишки //Актуальн.пробл.совр. физиол. и биофизики.-Ташкент, 2010.-С. 44-45

7. Юлдашев А.Ю., Юсупова Л.Ю., Нишанова А.А., Князева Л.С. Формирование функциональной системы пищеварения, всасывания и регуляции гомеостаза и закономерности системогенеза //Актуальн.пробл.совр. физиол. и биофизики.-Ташкент, 2010.-С. 192-193
8. Ахмедова Х.Ю., Юсупова Л.Ю., Исламова Г.Р., Рахматова М.Х. Особенности развития становления иммунной системы слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта //Матер.IX Респуб.съезда эпидемиологов, гигиенистов, сан.врачей и инфекционистов.-Ташкент, 2010.-С. 29-30
9. Рахматова М.Х., Юсупова Л.Ю., Исламова Г.Р. Системообразующие свойства грудного молока //Матер.IX Респуб.съезда эпидемиологов, гигиенистов, сан.врачей и инфекционистов.-Ташкент, 2010.-С. 128-129
- 10.Юлдашев М.А., Исламова Г.Р., Ахмедова Х.Ю., Юсупова Л.Ю. Эффективность патогенетически обоснованной терапии атопического дерматита у детей-искусственников //Матер. IX Респуб. съезда эпидемиологов, гигиенистов, сан.врачей и инфекционистов.-Ташкент, 2010.-С. 178
- 11.Юсупова Л.Ю. Регуляция пищеварения и всасывания в тонкой кишке новорожденных //Матер.IX Респуб.съезда эпидемиологов, гигиенистов, сан.врачей и инфекционистов.-Ташкент, 2010.-С. 181-182
- 12.Исламова Г.Р., Юсупова Л.Ю. Симбионтное пищеварение и рецепторный эндоцитоз в тонкой кишке новорожденных //Матер.IX Респуб.съезда эпидемиологов, гигиенистов, сан.врачей и инфекционистов.-Ташкент, 2010.-С. 67
- 13.Juldashev A.Ju., Nishanova A.A., Islamova G.K., Jusupova L.Ju. Didestion absorption and intestinal microflora in children during the first postnatal year of life //Abstract the Threth Turkish World Congress of pediatrics.-September 16-17, 2010, Astana, Kazakhstan, 2010.-P. 272-273
- 14.Юлдашев А.Ю., Князева Л.С., Исламова Г.Р., Таринова М.В., Юсупова Л.Ю. Кон яратувчи ва иммун аъзолари /Тиббиёт олий укув юртлари I ва II курс талабалари учун кулланма .-Тошкент, 2009.-46 б

Тиббиёт фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Юсупова Лутфи Юлдашевнанинг 14.00.36 – аллергология ва иммунология ихтисослиги бўйича «Ингичка ичакни иммун ва ҳазм қилиш–сўрилиш функцияларининг интеграция механизмларини шаклланиши» мавзусидаги диссертациянинг

РЕЗЮМЕСИ

Таянч сўзлар: иммун тизим, шиллик парда, ингичка ичак, лимфатик тугунча, сўрилиш, ёш.

Тадқиқот объектлари: каламушлар оқ наслсиз (n=187) ва стерил (n=3), стерил лактобактерия (n=9) ва нормал ичак микрофлораси (n=9) билан ассоциацияланган.

Ишнинг мақсади: ингичка ичак шиллик пардасининг иммун тизими шаклланишида гомеостаз регуляциясини таъминлаш учун ҳазм қилиш-сўрилиш билан интеграциялланиш механизмларини ўрганиш.

Тадқиқот услублари: иммунологик, биокимёвий, морфологик, автордиографик, статистик.

Олинган натижалар ва уларнинг янгиликлари: Илк бор тажрибада постнатал онтогенезда ичакда бир-бирига боғлиқ шиллик пардани иммун тизимининг афферент ва эфферент қисмлари ҳазм қилиш ва сўрилиш функционал тизими билан гомеостазни, юқори даражада иммун потенциални таъминлаш учун кўкрак сути ва дефинитив озикланиш даврларида шаклланиши аниқланган. Кўкрак сути билан озикланиш даврида энтероцитларни сўрилишига рецепторли эндоцитоз хос; у дефинитив овқатланиш даврида нормада деярли кузатилмайди. Лактобактериялар ва нормал ичак микроорганизмлари билан стерил ҳайвонлар ассоциацияланганда уларни морфо- ва иммуноген хусусиятлари турли эканлиги аниқланган. Автордиография усули ёрдамида нишонланган ядролар индекси асосида пейер пиллакчани лимфоид тугунчасининг структур-функционал зоналарини пролифератив фаоллиги фарқланиши, уларга асосан В-бластлар қондан келиши, Т- ва В-бластларни полиморф лизосомага эга макрофаглар билан мулоқатда бўлиши кўрсатилган.

Амалий аҳамияти: Ингичка ичакда иммун ва ҳазм қилиш-сўрилиш тизимларини интеграцияси болаларни атопик ва гастроэнтерологик касалликларини даволаш ва профилактикасида, функционал тизимларни илмий асосланган равишда шакллашда фойдаланиши мумкин. Ичак микроорганизмларини турли даражада иммуногенлиги аллергия ва дисбактериозларни олдини олишда ва даволашда қўллаш тавсия этилади. Ҳазм қилиш ва сўрилиш, гомеостазни регуляция қилиш илмий асосланган равишда мослаштирилган озуқа аралашмаларни яратишда қўллашга имконият беради.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: Ишнинг асосий ҳолатлари ТМАнинг микробиология ва иммунология, гистология ва тиббий биология кафедраларида қўлланиляпти.

Кулланиш соҳалари: тиббиёт

РЕЗЮМЕ

диссертации Юсуповой Лутфи Юлдашевны на тему «Механизмы формирования интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной функций тонкой кишки» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.36 – аллергология и иммунология

Ключевые слова: иммунная система, слизистая оболочка, тонкая кишка, лимфатический узелок, всасывание, возраст.

Объект исследования: крысы белые беспородные различного возраста (n=187), стерильные (n=3), стерильные, ассоциированные лактобактериями (n=9), нормальной кишечной микрофлорой (n=9).

Цель работы: изучение формирования иммунной системы слизистой оболочки (ИССО) тонкой кишки и механизмов ее интеграции с пищеварением и всасыванием при регуляции гомеостаза.

Методы исследований: иммунологические, биохимические, морфологические, автордиографические, статистические.

Полученные результаты и их новизна: Впервые в эксперименте в постнатальном онтогенезе установлено взаимосвязанное формирование афферентного и эфферентного звеньев ИССО и функциональной системы пищеварения и всасывания тонкой кишки для регуляции гомеостаза, поддержания напряженного иммунного потенциала в периоды грудного вскармливания и дефинитивного питания. Всасывание энтероцитами рецептор-опосредованным эндоцитозом характерно для периода грудного вскармливания и почти не выражено в норме после перехода на дефинитивное питание. При ассоциации стерильных крыс лактобактериями и нормальной кишечной микрофлорой установлена различная их морфо- и иммуногенность. Автордиографически по индексу меченых ядер выявлена различная пролиферативная активность лимфоидных клеток структурно-функциональных зон лимфатического узелка пейеровой бляшки, преимущественная миграция в них В-бластов из крови, взаимодействие Т- и В-бластов с макрофагами, содержащими полиморфные лизосомы.

Практическая значимость: Механизмы интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной функциональных систем тонкой кишки могут быть использованы при профилактике и лечении atopических, гастроэнтерологических заболеваний у детей, оптимального научно-обоснованного формирования функциональных систем организма. Различная степень иммуногенности кишечных микроорганизмов рекомендуется использовать для целенаправленной профилактики дисбактериозов, пищевых аллергий. Раскрытие механизмов пищеварения и всасывания и регуляции гомеостаза позволят научно обоснованно осуществить разработку адаптированных питательных смесей.

Степень внедрения и экономическая эффективность: Основные положения работы внедрены в учебный процесс кафедр микробиологии и иммунологии, гистологии и медицинской биологии ТМА.

Область применения: медицина

R E S U M E

Thesis of Yusupova Lutfi Yuldashevna on the scientific degree competition of the doctor of sciences in medical speciality 14.00.36 –allergology and immunology subject “ Mechanisms of formation of the immune and digestive absorbent functions of small bowel on specialty’

Key words: immune system, mucous tunic, small bowel, lymph node, absorption, age.

Subject of the inquiry: white pedigreeless (n=187) sterile rats (n=3), associated with lactobacteriums (n=9), usual gut organisms (n=9).

Aim of the inquiry: study of the mucous tunic immune system (MTIS) of small bowel and mechanisms of its integration with digestion and absorption at hemostasis regulation.

Methods of inquiry: morphological, immunological, biochemical, autoradiographic, statistic.

The results achieved and their novelty: For the first time in the experiment in postnatal ontogenesis has been defined correlated formation of afferent links of MTIS and functional system of digestion and absorption of the small bowel for homostasis regulation, maintenance of tense immune potential during breast feeding, artificial and definitive feeding. Absorption made by erythrocyte of receptor mediated endocytosis is typical for breast feeding and is slightly expressed in norm after passing to the definitive feeding. The model of association of sterile rats by lactobacteriums and normal intestinal flora has shown their different morpho- and immunogenity. Different proliferative activity of lymphoid cells of aggregate gland structural functional zones has been revealed autoradiographically by the index of marked nucleus as well as preferential migration of B-blasts to them from the blood, interaction of T and B-blasts with antigenconnecting and antigenpresenting cells in cupola zone before migration into the lymph flow.

Practical value: Mechanisms of integration of immune and digestive absorbent functional systems of the small bowel could be used at prevention and treatment of atopic, gastroenterologic diseases of children of the optimal scientifically based formation of the organism functional systems. Various grades of immunogenity of intestinal microorganisms is recommended to be used for purposeful prevention of disbacteriosis, food allergy. Discovery of the mechanisms of digestion and absorption and regulation of homostasis would allow to ground scientifically development of adapted feeding formulas.

Degree of embed and economic effectivity: the basic provisions of the work have been introduced to the academic process of microbiology, immunology, histology and medical biology departments of the Tashkent Medical Academy.

Sphere of usage: medicine

УТВЕРЖДАЮ»
Директор Института Иммунологии
АН РУз, д.м.н., профессор Арипова Т.У.

«_____» _____ 2011 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Апробационного совета Института Иммунологии АН РУз на диссертационную работу соискателя Юсуповой Лутфи Юлдашевны на тему « Механизмы формирования интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной функций в тонкой кишке», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.36 – аллергология и иммунология

от 19 мая 2011 года, протокол № 17

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ : д.м.н., профессор М.В.Залялиева М.В.

СЕКРЕТАРЬ : к.м.н. Набиева У.П.

Присутствовали : д.м.н., проф. А.А.Батырбеков, - председатель апробационного совета; д.м.н., проф. Арипова Т.У., д.б.н., проф. Залялиева М.В., Набиева У.П.- к.м.н., секретарь апробационного совета; д.м.н., проф. Гариб В.Ф., д.м.н. Камалов З.С., д.м.н., проф.Исмаилов Ш.И., д.м.н. Аскарров Т.А., проф. Бабаходжаев С.Н., д.м.н. Умарова А.А., к.м.н. Джапаров А.К., к.м.н. Джамбекова Г.С., к.м.н. Ходжаева А.Ш., к.м.н. Алимова М.Т., к.м.н. Суяров А.А., к.б.н. Мусаходжаева Д.А., к.б.н. Петрова Т.А., к.м.н.Файзуллаева

ПОВЕСТКА ДНЯ : Обсуждение диссертационной работы соискателя Юсуповой Л.Ю. на тему :» Механизмы формирования интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной функций в тонкой кишке», представляемой на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.00.36 – аллергология и иммунология.

Научный руководитель : д.м.н., профессор ГУЛЯМОВ Н.Г.

Рецензенты :

1. Заведующий лаборатории иммуноцитоккинов Института иммунологии АН РУз, д.м.н. Камалов З.С.

2. Профессор кафедры гистологии и медицинской биологии ТПМИ, д.м.н. Садритдинов А.Ф.

Соискатель Юсупова Л.Ю. коротко изложила основные положения диссертационной работы.

В ходе заседания были заданы следующие вопросы:

Проф. Батырбеков Акрам Анварович:

1 вопрос: Какие органы входят в состав пищеварительной системы, и какие органы Вами рассмотрены в диссертационной работе?

Ответ: В состав функциональной системы пищеварения и всасывания входят органы ротовой полости, пищевод, желудок, поджелудочная железа, печень, тонкая и толстая кишка. Однако в выполненной нами работе рассмотрены только желудок, поджелудочная железа и тонкая кишка. При этом мы исходили из того представления, что указанные органы не только анатомически располагаются рядом, но и осуществляют последовательно переваривание и всасывание.

2 вопрос: Как осуществлялось изучение процесса всасывания грудного молока и искусственное питание?

Ответ: Известно, что крысы, как и новорожденные дети, вскармливается молозивом, зрелым грудным молоком. Исходя из этого, механизмы всасывания молозива изучены у одно – и трехсуточных крыс в динамике после кормления через 10, 20, 30 минут, 1, 3 часа. Аналогично всасывание грудного молока изучено у 7- и 14- суточных крыс. В эти же сроки с помощью зонда вместо молозива или грудного молока вводился 7% раствор бычьего сывороточного альбумина или гамма-глобулин. После однократного введения 0,2-0,4 мл свето- и электронномикроскопически изучена слизистая оболочка тонкой кишки.

3 вопрос: Какие кишечные микроорганизмы первыми колонизируют тонкую кишку?

Ответ: При рождении ребенка бифидо- и лактобактерии родовых путей первыми колонизируют просвет тонкой и толстой кишок. Они обеспечивают колонизационную резистентность, переваривание ингредиентов грудного молока, постепенно активируют иммунную систему, формируют функциональную систему.

Д.н.м. Камалов Зайнитдин Сайфутдинович:

1 вопрос: Как осуществлялся подсчет меченых клеток?

Ответ: Парафиновые срезы после покрытия жидкой фотоэмульсией экспонировались 22-25 дней и в последующем проявлялись и окрашивались гематоксилином. Это позволяло визуализировать ядра эпителия и лимфобластов, включившие и не включившие Нз-тимидин. Нз-тимидин

после его интраперитонеального введения включается только в ядра, которые синтезируют ДНК. Если рассматривается лимфоидная ткань лимфатических узелков пейеровой бляшки, то определяется доля меченых лимфобластов из всей рассматриваемой массы немеченых лимфобластов в той или иной ее структурно-функциональной зоне. Для установления ИМЯ определенной зоны лимфатического узелка пейеровой бляшки подсчитывается около 10-12 тысяч лимфоидных клеток. Этот метод позволяет топографически четко установить степень пролиферативной активности, миграцию меченых клеток из одной зоны в другую, миграцию из крови и в кровь, интенсивность рециркуляции лимфоидных клеток.

2 вопрос: Существует ли другой способ определения интенсивности включения Нз-тимидина?

Ответ: Для определения особенностей функционирования афферентного и эфферентного звеньев ИССО тонкой кишки, различий включения Нз-тимидина достаточно взять кусочки ткани пейеровой бляшки и слизистой оболочки и поместить в бета-радиометр. Естественно, мы не сможем определить зональных различий по ИМЯ.

3 вопрос: Как создавались стерильные условия для крыс?

Ответ: При помощи специальной технологии (это описано в соответствующих руководствах), первая партия крыс получена путем кесарева сечения. Затем они находились в специальных пластиковых изоляторах. В них через фильтры подавался стерильный воздух. Пища стерилизовалась и только затем через систему шлюзов вносилась внутрь. Микробиологический контроль производился регулярно как воздуха, так и пищи, а также испражнений.

4 вопрос: Имеются ли данные о субпопуляционном составе лимфоцитов собственной пластинки слизистой оболочки тонкой кишки?

Ответ: В собственной пластинке слизистой оболочки тонкой кишки основная масса лимфоцитов – это В-лимфоциты. Они в динамике дифференцируются в плазматические клетки, вырабатывающие иммуноглобулин А.

Проф. Залялиева Марьям Валиевна:

1 вопрос: Как различить типы клеток в эфферентном и афферентном звеньях ИССО тонкой кишки?

Ответ: Препараты с полутонкими срезами, окрашенные основным фуксином и метиленовым синим, позволяют различить отдельные типы клеток при увеличении окуляра 10, объектива 40 или 90.

2 вопрос: Какие отличия имеют эпителиальные клетки ворсинок и ассоциированные с лимфоидной тканью пейеровых бляшек?

Ответ: Если на поверхности ворсинок тонкой кишки имеются всасывающие, эндокринные и бокаловидные клетки, то на поверхности лимфоидной ткани – М-клетки, нейрорецепторы. Бокаловидные различаются лишь у основания

пейеровых бляшек. Между указанными эпителиальными клетки выявляются многочисленные лимфоциты, совершающие непрерывно миграцию в зону купола пейеровой бляшки и обратно.

Профессор Гариб Виктория Ферузовна:

1 вопрос: Макрофаги выявляются во всех структурно-функциональных зонах лимфатических узелков пейеровой бляшки?

Ответ: Макрофаги сосредоточены в основном в зоне купола. Именно здесь происходит взаимодействие антигенов с макрофагом, Т-и В-бластами, регуляция иммунного ответа.

2 вопрос: Какие преимущества имеют безмикробные животные по сравнению с обычными лабораторными белыми крысами?

Ответ: Нами стерильные крысы использовались для установления свойств кишечных микроорганизмов. Введение отдельных представителей кишечной микрофлоры позволяет определить характер иммуногенного их влияния, сравнить степень морфо - иммуногенности отдельно взятого представителя кишечной микрофлоры. Именно благодаря таким опытам была установлена эффективность использования отдельных представителей бифидо-и лактобактерий для лечения и профилактики дисбактериозов.

Проф. Бабаходжаев Сирожитдин Насырович:

1 вопрос: Какое происхождение имеют лимфоциты, которые находятся в слизистой оболочке тонкой кишки?

Ответ: Основная масса лимфоцитов, инфильтрирующих собственную пластинку и эпителий слизистой оболочки тонкой кишки, имеют костномозговое и тимусное происхождение. Лишь небольшая часть продуцируется в периферических кроветворных органах.

2 вопрос: Согласно данным литературы и Вашим, В-лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки. Естественно, возникает вопрос об их судьбе?

Ответ: Плазматические клетки, как и другие клетки организма, через определенный отрезок времени гибнут и тогда они поглощаются макрофагами в собственной пластинке тонкой кишки или регионарном лимфатическом узле. В кровоток они после естественной смерти не попадают.

3 вопрос: Почему основная масса лимфоидной ткани, ассоциированной с эпителием, находится в слизистой оболочке тонкой кишки?

Ответ: Как отметили мы в своем докладе, слизистая оболочка тонкой кишки взаимодействует со всеми антиген-значимыми субстратами – пищевыми и микробными. Однако именно это вызвало в эволюции формирование механизмов защиты внутренней среды – химическую деградацию вдоль пищеварительной трубки и образование нескольких барьеров, где интегрированы ферменты и иммуноглобулины. Наиболее высокая концентрация антигенов в просвете тонкой кишки и постоянное взаимодействие, всасывание их в небольшом количестве для формирования

надежных барьеров – являются основными причинами наибольшего скопления лимфоидной ткани в слизистой оболочке тонкой кишки.

К.м.н. Джапаров Адыл Каримович:

1 вопрос: При развитии и становлении тонкой кишки какие факторы имеют определяющее значение?

Ответ: Согласно данным литературы и нашим результатам, естественное вскармливание, формирование нормального микробиоценоза являются основными факторами формирования пищеварительно-всасывательной функции тонкой кишки.

2 вопрос: Коррелирует ли субпопуляционный состав лейкоцитов крови и инфильтрирующих слизистую оболочку тонкой кишки?

Ответ: Между обеими популяциями лейкоцитов имеется тесная взаимосвязь. Рециркулирующий пул лимфоцитов и нейрогуморальная система поддерживает обратную связь между указанными субпопуляциями лейкоцитов.

Слово предоставляется первому рецензенту, д.м.н. Садритдинову А.Ф.

Д.м.н. Садритдинов в своем выступлении дал подробную характеристику всех глав рецензируемой диссертационной работы, высказал некоторые пожелания относительно литературного обзора и обсуждения полученных результатов.

Соискатель: Глубокоуважаемый Асомитдин Фаязович! Позвольте поблагодарить Вас за рецензирование нашей работы. Разрешите ответить на Ваши пожелания. Цитируемые в литературном обзоре работы имеют прямое отношение к разрабатываемой теме. Поэтому они более подробно проанализированы. Их, естественно, можно перенести в раздел обсуждения. Однако в обсуждении диссертации рассматриваются вопросы интеграции и узловые проблемы формирования функциональных систем, регуляции гомеостаза. Вследствие этого ряд актуальных проблем рассмотрены поотдельности. По второму вопросу о качестве отдельных фотоснимков, они будут улучшены при окончательном оформлении диссертации.

Слово предоставляется второму рецензенту, д.м.н. Камалову З.С.

Д.м.н. Камалов З.С.: - Сделал подробный анализ содержания и представленного фактического материала. Высказал пожелания о расшифровке некоторых методических подходов, обоснования применения морфологического метода при рассмотрении вопросов иммунологии.

Соискатель: Глубокоуважаемый Зайнитдин Сайфутдинович! Позвольте поблагодарить Вас за рецензирование нашей диссертационной работы. Разрешите ответить на некоторые из них. По первому вопросу: отдельные методы, использованные в диссертационной работе, нами будут раскрыты более подробно.

По второму вопросу: место и значение морфологического метода при решении актуальных проблем аллергологии и иммунологии. Ввиду того, рассматриваются фундаментальные проблемы интеграции, формирования функциональных систем пищеварения, всасывания и иммунной,

пространственно разобщенных, но интегрирующихся в динамике возраста, метод морфологии позволяет на срезах общеморфологических и электронно-микроскопических увидеть во взаимосвязи, при функционировании в естественных физиологических условиях.

Председатель: Нам необходимо провести открытое голосование для вынесения заключения по рассматриваемой диссертационной работе. На заседании апробационного совета из 21 члена присутствовало 17 членов. За представление работы в Специализированный совет подано голосов: за – 17, против – нет, воздержавшихся - нет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Представленная на обсуждение диссертационная работа Юсуповой Л.Ю. на тему: «Механизмы формирования интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной функций в тонкой кишке» ставит цель: изучение формирования иммунной системы слизистой оболочки тонкой кишки и механизмов ее интеграции с пищеварением и всасыванием при регуляции гомеостаза в эксперименте.

Научная новизна: Впервые в эксперименте у крыс изучено взаимосвязанное формирование афферентного и эфферентного звеньев иммунной системы слизистой оболочки тонкой кишки при естественном вскармливании и нормальном микробиоценозе в ней. У стерильных крыс при отсутствии кишечных микроорганизмов афферентное звено иммунной системы слизистой оболочки тонкой кишки гипоплазировано, структуры эфферентного звена слабо активированы. Интеграция формирующейся иммунной и пищеварительно-всасывательной систем в постнатальном онтогенезе протекает взаимосвязано и обеспечивает совершенную адаптацию, регуляцию гомеостаза внутренней среды организма. Впервые дана характеристика различия механизмов всасывания грудного молока и искусственных питательных смесей. Впервые при различном микробиоценозе в тонкой кишке, в собственной пластинке ее слизистой оболочки показаны особенности лейкоцитов и клеток рыхлой соединительной ткани.

Практическая значимость результатов. Естественная и закономерная интеграция иммунной и пищеварительно-всасывательной функций в раннем постнатальном онтогенезе млекопитающих имеет важное значение для педиатрии, профилактики нарушений формирования обеих систем организма, гармоничного развития органов и систем организма, организма в целом. Познание механизмов интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной систем в тонкой кишке, совершенности адаптации при естественном вскармливании, функционирования лимфоидных образований имеет решающее значение при разработке питания детей различного возраста, при пищевых аллергиях и атопических заболеваниях, при организации искусственного вскармливания детей. Материалы диссертации используются в медицинских вузах при преподавании темы «Органы кроветворения и иммунологической защиты».

Публикации: По материалам диссертации опубликованы 14 работ, в том числе 3 журнальные статьи, 1 учебное пособие. Опубликованные работы соответствуют содержанию работы.

Обсуждение: Д.м.н., профессор Залалиева М.В., подводя итог обсуждению диссертационной работы, отметила, что научная работа Юсуповой Л.Ю. полностью отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Тема диссертации утверждена на Ученом совете УзНИИЭМИЗ от 13 января 2010 года протокол № 1 и опубликована в «Бюллетени ВАК» № 2 2010 году.

Научная работа на тему «Механизмы формирования интеграции иммунной и пищеварительно-всасывательной функций в тонкой кишке» по специальности 14.00.36 – аллергология и иммунология рекомендуется для представления в Специализированный совет Д.015.89.01 при Институте Иммунологии АН РУз.

Председатель Апробационного Совета,
д.м.н., профессор

Залалиева М.В.

Секретарь Апробационного Совета,
к.м.н.

Набиева У.П.

СОИСКАТЕЛЬ ЮСУПОВА ЛУТФИ ЮЛДАШЕВНА

ТЕМА: МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИНТЕГРАЦИИ ИММУННОЙ И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНО-ВСАСЫВАТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИЙ В ТОНКОЙ КИШКЕ

Работа выполнена в УзНИИЭМИЗ

Научный руководитель: профессор д.м.н. проф.ГУЛЯМОВ Н.Г.

Апробация диссертации: 19 мая 2011 г.

Рецензенты: д.м.н. Садритдинов А.Ф.

Д.м.н. Камалов З.С.

Эксперты специализированного Совета : проф.Батырбеков А.А.

Д.м.н. Умарова А.А.

Д.м.н. Закирходжаев Ш.Я.

