

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПУТІЛІН ДЕНИС АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 616.428:616.37]-018.1+616.37-031.64-018.26]:616.379-008.64]-092-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕХАНІЗМИ ЗМІН ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КЛІТИН
ПАНКРЕАТИЧНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ТА
ПАРАПАНКРЕАТИЧНОЇ ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПІСЛЯ
ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

22 Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело


_____ Д.А. Путілін

Науковий керівник – **Камишний Олександр Михайлович**, доктор медичних наук, професор

Запоріжжя – 2018

АНОТАЦІЯ

Путілін Д.А. Механізми змін функціонального стану клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової клітковини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія» (222 Медицина). – Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, 2018.

Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, 2018.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню особливостей змін функціонального стану лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну з допомогою імуофлюоресцентних і молекулярно-генетичних методів.

Встановлено, що ЕСІЦД викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* (в 9,9-28,9 разів) і протеїнкінази *mTOR* (в 5,3-3,3 рази) в клітинах ПЛВ, не впливає на загальну кількість $mTOR^+$ -клітин в ПЛВ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу і призводить до їх зростання на 5-й тиждень ЕСІЦД – на 24 % в паракортикальній зоні та на 34 % в м'якотних тяжках переважно за рахунок збільшення ЩП $mTOR^+$ -малих і середніх лімфоцитів.

Доведено, що введення метформіну щурам з цукровим діабетом призводить до зростання рівня мРНК гену *AMPK1 α* на 87 % на 3-й тиждень та майже в 38 разів на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД та пригнічення експресії *mTOR* (в 3-14,7 разів) і *Glut 1* (в 2-5,7 разів) в ПЛВ. При цьому кількість $mTOR^+$ -клітин знижувалась на 40 % лише у м'якотних тяжках ПЛВ у тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД. Введення метформіну знижували концентрацію мішені рапаміцину в $mTOR^+$ -імунопозитивних клітинах ПЛВ.

Результати проведених експериментальних досліджень показали, що розвиток діабету супроводжується зростанням кількості $TLR2^+$ - (на 59 % – в

3,1 рази), TLR4⁺ (на 61 % – в 2,1 рази), NOD2⁺ (на 38 % – в 2 рази) і RIGI⁺-лімфоцитів (в 2,4 рази – на 77 %) у паракортикальній зоні і TLR4⁺ (на 60 % на 3-й тиждень) та RIGI⁺-лімфоцитів (на 58 % – в 3,7 рази) у м'якотних тяжках ПЛВ щурів, змінює щільність PRR на імунних клітинах. Ефекти по зростанню кількості клітин, експресуючих рецептори вродженого імунітету залежали від тривалості патологічного процесу – збільшення терміну ЕСІЦД викликало сильнішу дію по відношенню до TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺ лімфоцитів в паракортикальній зоні і RIGI⁺-лімфоцитів у м'якотних тяжках ПЛВ щурів. Отримані результати свідчать, що ЕСІЦД призводить до значної активації вродженої імунної системи і це, в свою чергу, може суттєво впливати на рівень активації адаптивної імунної відповіді, диференціювання субпопуляцій хелперних Т-клітин в ПЛВ.

Продемонстровано, що введення метформіну щурам з цукровим діабетом зменшує чисельність в ПЛВ лімфоцитів, експресуючих PRR, за винятком NOD2, впливає на щільність мембранних і концентрацію цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету. При цьому кількість клітин, експресуючих мембранні TLR2 і TLR4 зменшувалась більш активно у паракортикальній зоні (в 2,1 рази та на 41 % – в 2,5 рази відповідно), а цитоплазматичних сенсорів вірусних РНК RIGI – у м'якотних тяжках ПЛВ щурів на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (в 3,5 рази). Таким чином, метформін гальмує рівень активації компонентів вродженої імунної системи в ПЛВ.

Відмічено, що в умовах діабету в ПЛВ щурів знижується рівень транскрипційної активності регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів Aire та Deaf1. Зокрема, експресія Deaf1 зменшилась в 4,2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-х тижневим ЕСІЦД і в 2,5 рази ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД порівняно з контрольною групою. Експресія Aire зменшилась в 2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-х тижневим ЕСІЦД і в 50 разів ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД.

Встановлено, що розвиток ЕСІЦД супроводжується змінами розподілу субпопуляцій Т-хелперів в ПЛВ щурів: сумарна щільність Tbet⁺-лімфоцитів у

паракортикальній зоні ПЛВ зросла на 56 %-87 %, у м'якотних тяжках ПЛВ ці ж показники збільшилися в 2,3 рази і на 68 % у порівнянні з контрольною групою; загальна кількість Т-хелперів 17 типу у паракортикальній зоні ПЛВ підвищувалась в 2,6 рази на 3-й тиждень і на 46 % на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД, у м'якотних тяжках ПЛВ – на 65 %-69 % відповідно. Тобто, зростання чисельності Th1 більш виразним було у м'якотних тяжках, Th17 – у паракортикальній зоні ПЛВ. Діабет різноспрямовано впливає на концентрацію транскрипційних факторів Tbet і ROR γ t в імунних клітинах. Це супроводжується зменшенням сумарної щільності субпопуляції Т-регуляторних клітин в ПЛВ на 3-й тиждень ЕСІЦД на 25 %-28 %, на 5-й – на 50 % лише в м'якотних тяжках, призводить до змін розподілу окремих класів Treg-лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію транскрипційного фактору Foxp3 в імунопозитивних клітинах м'якотних тяжків.

Отримані результати демонструють здатність метформіну збільшувати кількість Treg в ПЛВ, причому ці ефекти виражені на 3-й тиждень розвитку діабету (в 2 рази) і нівелюються до 5-го тижня перебігу патологічного процесу. Введення метформіну майже не впливає на розподіл Th1-клітин у ПЛВ, за винятком паракортикальної зони у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД, де їх сумарна щільність знижується на 48 %, зменшує чисельність Th17-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 3-й тиждень (на 48 %), а у м'якотних тяжках – на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (на 27 %).

З'ясовано, що індукція діабету збільшує кількість TLR2⁺- (на 3-й тиждень ЕСІЦД – в 2,5 рази, на 5-й – на 77 %) та TLR4⁺-адипоцитів (на 3-й тиждень ЕСІЦД – в 1,9 разів), переважно підвищує щільність TLR2- і TLR4-рецепторів на їх мембрані, що свідчить про активацію прозапальної сигналізації в ПЖТ. Введенням метформіну щурам з цукровим діабетом знижають загальну кількість TLR2⁺-адипоцитів на 16 %-24 %, TLR4⁺-адипоцитів на 36 % лише на 3-й тиждень ЕСІЦД, супроводжуються зменшенням щільності їх рецепторів на поверхні жирових клітин.

Доведено, що стрептозотоцин-індуковані метаболічні зміни викликають транскрипційну активацію гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЖТ: розвиток діабету призводить до зростання вмісту мРНК *mTOR* в 6,8 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та в 3,6 разів ($p < 0,05$) на 5-й тиждень патологічного процесу. Ці зміни не впливають на експресію мРНК транскрипційного регулятора диференціювання Т-регуляторних клітин *Foxp3* на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижують її в 4,6 разів ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСЦД порівняно з контрольною групою щурів.

Активація ПРР на мембрані жирових клітин у парапанкреатичній жировій клітковині закономірно підвищує рівень експресії мРНК прозапального цитокіну *IL1 β* – в 77,7 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та 51,3 рази ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД, і Th17-залежного цитокіну *IL17A* – відповідно у 23,5 ($p < 0,05$) та 5,5 разів ($p < 0,05$). Введення метформіну щурам з цукровим діабетом пригнічують експресію мРНК *mTOR* в ПЖТ у 4,5-5,9 разів ($p < 0,05$). Транскрипційна репресія *mTOR* призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Treg-клітинах ПЖТ – на 80 % ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та в 3,1 рази ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД.

Наукова новизна. В результаті роботи за допомогою сучасних молекулярно-генетичних і імуофлюоресцентних методів виявлено комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСЦД: зміни імунометаболізму лімфоцитів; порушення формування периферичної імунологічної толерантності; активація ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах ПЛВ і адипоцитах ПЖТ; зміни розподілу ефektorних Т-клітин в ПЛВ; посилення прозапальної сигналізації в ПЖТ на тлі зменшення рівня мРНК *Foxp3*.

Вперше виявлено, що метаболічні зміни, які розвиваються в умовах ЦД, здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів ПЛВ. Доведено, що гіперглікемія викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* та протеїнкінази *mTOR* в імунних клітинах ПЛВ, що є важливим тригером їх диференціювання в ефektorні прозапальні субпопуляції Th1 і Th17.

Вперше встановлено, що в умовах ЕСІЦД знижується рівень ектопічної експресії в клітинах ПЛВ генів-регуляторів периферичної імунологічної толерантності *Deaf1* та *Aire*, що супроводжується зменшенням кількості Treg в ПЛВ.

Експериментально доведено активацію компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЦД і зростання кількості TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ щурів, забезпечуючи нове розуміння молекулярного патогенезу ЦД 1-го типу.

Розширені наукові поняття щодо ролі жирової тканини у прогресії діабету. З'ясовано, що в умовах ЕСІЦД зростає кількість TLR2⁺- та TLR4⁺-адипоцитів у парапанкреатичній клітковині, що індукує прозапальну сигналізацію в жировій тканині і підвищує рівень експресії мРНК IL1 β і IL17A на тлі транскрипційної репресії Foxp3.

Обґрунтована доцільність застосування метформіну для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД. Вперше продемонстрована здатність метформіну впливати на транскрипційну активність генів *AMPK1 α* і *mTOR*, зменшувати чисельність лімфоцитів, експресуючих PRR, змінювати розподіл Treg і Th17-клітин у ПЛВ щурів з цукровим діабетом.

Практичне значення. Проведені дослідження становлять практичний інтерес для сучасної діабетології, ендокринології, імунології і доводять, що порушення функціонування клітин ПЛВ і ПЖТ грають важливу роль в імунопатогенетичних механізмах розвитку цукрового діабету і можуть бути одними з факторів, які підтримують розвиток і прогресування патологічного процесу. Експериментально обґрунтована доцільність застосування метформіну для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД. Встановлення характеру змін імунометаболізму лімфоцитів і коригуючого впливу метформіну на патогенез ЕСІЦД поглиблює існуючі уявлення про молекулярні механізми змін в імунній системі і жировій тканині при даному захворюванні.

Ключові слова: експериментальний стрептозотоцин-індукований цукровий діабет, лімфоцити, адипоцити, метформін, панкреатичні лімфатичні вузли, парапанкреатична жирова тканина, імунометаболізм.

ANNOTATION

Putilin D.A. Mechanisms of the changes in the functional state of the pancreatic lymph nodes' cells and the parapancreatic adipose tissue in the experimental diabetes mellitus and after the metformin's introduction. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis is submitted for a candidate degree in Medical Sciences (doctor of philosophy) in specialty 14.03.04 "Pathological physiology" (222 – Medicine). – Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, 2018.

Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, 2018.

The thesis is devoted to the clarification of the features of changes in the functional state of lymphocytes of the pancreatic lymph nodes and the parapancreatic adipose tissue in the experimental diabetes mellitus and after the metformin's introduction by means of immunofluorescence and molecular genetic methods.

It is determined that the ESIDM causes transcriptional induction of Glut1 glucose transport genes (in 9.9-28.9-times) and protein kinase mTOR (in 5.3-3.3-times) in PLN cells, doesn't affect the total number of mTOR⁺-cells in PLN on the 3rd week of the pathological process's development and leads to their growth on the 5th week of ESIDM – in 24 % in the paracortic area and in 34 % in the pulpy bands, mainly due to the PD increase of the mTOR⁺ mild and middle lymphocytes.

It has been shown that the introduction of metformin to the diabetic rats leads to the increase of mRNA of the gene's level of AMPK1 α in 87 % on the 3rd week and almost in 38 times on the 5th week of the ESIDM development and the suppression of mTOR expression in the PLN (in 3-14.7 times) and Glut 1 (in 2-5,7 times) in PLN. At the same time, the number of mTOR⁺ -cells decreased in 40 % only in the pulpy bands, in the PLN in the animals with a 5-week ESIDM. The

introduction of metformin reduced the concentration of rapamycin target in mTOR⁺ - immunopositive PLN cells.

The results of the experimental studies have shown that the development of diabetes is accompanied by an increase in the number of TLR2⁺ (in 59 % – in 3.1 times), TLR4⁺ (in 61 % – in 2.1 times), NOD2⁺ (in 38 % - in 2 times) and RIGI⁺ lymphocytes (in 2.4 times – in 77 %) in the paracortic area and TLR4⁺ (in 60 % on the 3d week) and RIGI⁺-lymphocytes (in 58 % – in 3.7 times) in the pulpy bands of the rats' PLN, changes the PRR density on the immune cells. Effects on the growth of the number of cells expressing receptors of congenital immunity depended on the duration of the pathological process – an increase of the ESIDM caused a stronger effect in relation to TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺ lymphocytes in the paracortic area and RIGI⁺ lymphocytes in the pulpy bands of the PLN of the rats. The obtained results indicate, that the ESIDM leads to the significant activation of the congenital immune system, and this, in turn, can significantly affect the level of the adaptive immune response's activation, the differentiation of the subpopulations of the helper T-cells in the PLN.

It has been shown that the metformin's introduction to the diabetic rats reduces the number of lymphocytes in the PLN expressing PRR with the exception of NOD2, affects the density of membrane and the concentration of cytoplasmic receptors of congenital immunity. At the same time, the number of cells expressing the membrane TLR2 and TLR4 decreased more actively in the paracortic area (in 2.1 times and in 41 % – in 2.5 times, respectively), and the cytoplasmic sensors of RIGI viral RNA-in the pulpy bands of the PLN of the rats on 5th week of the ESIDM development (in 3.5 times). Thus, metformin inhibits the level of activation of the components of the congenital immune system in the PLN.

It was noted, that the level of transcriptional activity of the regulators of expression of the peripheral tissue-specific antigens Aire and Deaf1 is decreased in the rats in the conditions of diabetes. In particular, the Deaf1 expression has decreased in 4.2 times (p<0.05) in the rats' PLN with 3-week ESIDM and in 2.5-times (p<0.05) in rats with the 5 week the ESIDM in comparison to the control

group. Aire expression has decreased in 2-times ($p < 0.05$) in FLV in the rats with 3-week ESIDM and in 50-times ($p < 0.05$) in the rats with 5-week ESIDM.

It has been established that the ESIDM development is accompanied by the changes in the distribution of T-helper cells subpopulations in the PLN of the rats: the total density of Tbet⁺ lymphocytes in the PLN paracortic area has increased in 56 % - 87 %, in the pulpy bands of the PLN, the same indices have increased in 2.3 times and in 68 % in comparison to the control group; the total number of 17 type T-helpers in the paracortic area of the PLN have increased in 2.6 times on the 3rd week and in 46 % on the 5th week of the ESIDM development, in the PLN of pulpy bands – in 65 %-69 %, respectively. That is the increase of Th1 growth was more pronounced in the pulpy bands, Th17 – in the paracortic area of the PLN. Diabetes has a different effect on the concentration of Tbet and ROR γ t transcription factors in the immune cells. This is accompanied by a decrease in the total density of the T-regulatory cells subpopulation in the PLN on the 3rd week of the ESIDM in 25 %-28 %, and on the fifth week – in 50 % only in the pulpy bands, which leads to changes in the distribution of the Treg-lymphocytes separate classes, preferably increases the concentration of the transcription Foxp3 factor in immunopositive cells of the pulpy bands.

The obtained results demonstrate the metformin's ability to increase the amount of Treg in PLN, by the way, these effects are expressed on the 3d week of diabetes development (in 2-times) and leveling up to the 5th week in the period of the pathological process. The metformin's introduction has almost no effect on the distribution of Th1 cells in the PLN, with the exception of the paracortic area in the rats with the 5th-week ESIDM, where their total density is decreased in 48 %, reduces the number of Th17-lymphocytes in the paracortic area of the PLN on the 3rd week (in 48 %), and in the pulpy bands- on the 5th week of the ESIDM development (in 27 %).

It was found that the diabetes induction increases the number of TLR2⁺ (on the 3d week of ESIDM – in 2.5 times, on the 5th ones – in 77 %) and TLR4⁺-adipocytes (ESIDM on the 3d week – in 1.9 times), mainly increases the density of

TLR2 and TLR4 receptors on their membrane, indicating the activation of anti-inflammatory signaling in PAT. The metformin's introduction to the diabetic rats reduces the total amount of TLR2+- adipocytes by 16 %-24 %, TLR4+- adipocytes in 36 % only on the 3rd week of ESIDM. It is accompanied by a decrease in the density of their receptors on the surface of the adipose cells.

It is proved that Streptosotocin-induced metabolic changes cause transcriptional activation of the mTOR protein kinase gene in the PAT cells: the development of diabetes leads to the increase of mTOR mRNA content in 6.8-times on the 3d week and in 3.6-times ($p<0.05$) on the 5th week of the pathological process. These changes do not affect the expression of the mRNA of the transcriptional regulator of the differentiation of Foxp3 T-regulatory cells on the 3rd week of the pathological process and reduce it in 4.6-times ($p<0.05$) with 5-week ESIDM in comparison to the control group of rats.

The PRR activation on the membrane of adipose cells in parapancreatic adipose tissue naturally increases the level of mRNA expression of proinflammatory cytokine IL1 β – in 77.7 times ($p<0.05$) on the 3d week and in 51.3 times ($p<0.05$) on the 5th week of ESIDM development, and Th17-dependent cytokine IL17A - respectively in 23.5 ($p<0.05$) and in 5.5 times ($p<0.05$). The metformin's introduction to the diabetic rats suppresses the mTOR mRNA expression in the PAT in 4.5-5.9 times ($p<0.05$). Transcriptional mTOR repression leads to an increase in the level of transcriptional activity of the Foxp3 gene in Treg-cells PAT in 80 % ($p<0.05$) on the 3d week and in 3.1 times ($p<0.05$) on the 5th week of the ESIDM development.

Scientific novelty. As a result of work by means of modern molecular-genetic and immunofluorescence methods the complex of key pathophysiological and functional changes in the PLN and the PAT cells in the ESIDM conditions was revealed: changes in lymphocyte immune metabolism; violation of the formation of peripheral immunological tolerance; activation of PRR of the congenital immune system on the PLN lymphocytes and the PAT adipocytes; changes in the distribution

of effector T cells in the PLN; increase of pro-inflammatory signaling in the PAT on the background of the mRNA Foxp3 level's reduction.

It was first discovered that metabolic changes developing in conditions of DM can directly affect the immune metabolism of the PLN lymphocytes. It is proved that hyperglycemia causes transcriptional induction of Glut1 glucose transporters and mTOR protein kinase in the immune PLN cells, that is an important trigger for their differentiation in the Th1 and Th17 effector proinflammatory subpopulations.

For the first time, it has been established that the level of ectopic expression in the PLN cells of the genes- regulators of peripheral immunological tolerance Deaf1 and Aire is reduced in the ESIDM conditions which is accompanied by a decrease of Treg in the PLN.

It is experimentally proved the activation of the congenital immune system's components in the DM development and the growth of TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺ and RIGI⁺ lymphocytes in the PLN of rats, providing a new understanding of the molecular pathogenesis of DM type 1.

The scientific concepts are extended due to the role of adipose tissue in the progression of diabetes. It has been determined that in the ESIDM conditions the number of TLR2⁺ and TLR4⁺ -adipocytes in parapancreatic fiber increases, which induces proinflammatory signaling in the adipose tissue and increases the mRNA expression of IL1 β and IL17A on the background of the transcriptional Foxp3 repression.

The expediency of the metformin's use for the correction of immune disorders developing in the DM is substantiated. For the first time, the metformin's ability has been shown to influence on the transcriptional activity of the AMPK1 α and mTOR genes, to reduce the number of lymphocytes expressing PRR, to alter the distribution of Treg and Th17 cells in the PLN of the diabetic rats.

Practical meaning. The conducted researches are of practical interest for the modern Diabetology, Endocrinology, Immunology and prove that the violations of the PLN and the PAT cells' functioning play an important role in the immunopathogenetic mechanisms of the diabetes mellitus and may be one of the

factors that support the development and progression of the pathological process. The expediency of the metformin's use for the correction of immune disorders developing in the DM is substantiated. The establishment of the nature of the changes in the immune metabolism of lymphocytes and the correction of the influence of metformin on the pathogenesis of the ESIDM deepens the existing perceptions of the molecular mechanisms of changes in the immune system and the adipose tissue in the given disease.

Key words: experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus, lymphocytes, adipocytes, metformin, pancreatic lymph nodes, parapancreatic adipose tissue, immune metabolism.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Путілін Д.А., Камишний О.М., Коновалова О.О., Камишна В.А. Особливості експресії TLR2 і TLR4 адипоцитами парапанкреатичної клітковини при експериментальному цукровому діабеті. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2014. №22. С. 121-126. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).

2. Путилин Д.А. Камышный А.М. Влияние введения метформина на уровень экспрессии TLR2 и TLR4 адипоцитами парапанкреатической клетчатки при экспериментальном сахарном диабете. *Российский иммунологический журнал*. 2014. №2(1). С.70-73. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).

3. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M. Distribution of FoxP3⁺ regulatory T-cells in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration. *Патологія*. 2015. №1. С. 39-43. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані, проведено їх статистичну обробку та сформульовані висновки).

4. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M., Kamyshna V.A. Reduced deaf1 mRNA expression during STZ-induced diabetes mellitus inhibits Foxp3⁺ regulatory T-cells differentiations in rat's pancreatic lymph nodes. *Mediterranean Journal of*

Biosciences. 2016. № 1(1). С. 20-26. (Дисертантом самостійно проведено імунофлюоресцентне дослідження, обробка даних та підготовка матеріалу до друку).

5. Путілін Д.А., Камишний О.М. Особливості імунометаболізму лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введень метформіну. *Морфологія*. 2016. № 2. С.61-68. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

6. Путилин Д.А. Камышный А.М. Изменения уровня экспрессии генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1 α* лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Медицинская иммунология*. 2016. № 4. С. 349-356. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

7. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M., Kamyshna V.A. Breakdown in peripheral immune tolerance in experimental diabetes mellitus. *Journal of Molecular Pathophysiology*. 2016. №3. P.31-36. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

8. Камишний О.М., Путілін Д.А., Сухомлінова І.Є., Камишна В.А. Імунометаболізм лімфоцитів і його зміни при експериментальному цукровому діабеті. *Патологія*. 2016. №3 (38). С. 102-108. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та сформульовані висновки).

9. Путілін Д.А., Камишний О.М., Камишна В.А., Сухомлінова І.Є. Зміни експресії генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у парапанкреатичній жировій тканині щурів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введень метформіну. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2016. №4 (15). С 92-97. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

10. Путілін Д.А., Камишний О.М., Камишна В.А., Сухомлінова І.Є. Експресія рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та

після введення метформіну. *Проблеми ендокринної патології*. 2017. №1. С 63-70. (Дисертантом самостійно проведено імунофлюоресцентне дослідження, обробка даних та підготовка матеріалу до друку).

11. Камишний О.М., Жеребятъев О.С., Топол І.О., Деген А.С., Тарасевич Ю.В., Прозорова Т.М., Путілін Д.А., Камишна В.А. Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин: пат. 102400, Україна, МПК G01N 21/00. № u201504559; заявл.12.05.15; опубл. 26.10.15 Бюл. № 20. (Дисертант співвиконавець розробки методики виділення РНК).

12. Kamyshny A.M., Putilin D.A. Chebotareva L.K. Influence of experimental diabetes mellitus on the expression of TLR2 and TLR4 adipocytes in peripancreatic adipose tissue. Сучасні аспекти медицини та фармації: матеріали Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю (Запоріжжя, 15-16 травня 2014р.). Запоріжжя, 2014. С. 46. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та сформульовані висновки, доповідь).

13. Kamyshny A.M., Putilin D.A. Distribution characteristics of Toll-like receptors of innate immunity in adipocytes of parapancreatic adipose tissue at an experimental diabetes mellitus and metformin administration. Abstracts of the VIIth meeting of the association of endocrinologist of Ukraine (Kyiv, October 20-22, 2014). *Endokrynologia*. 2014. №4. P. 341. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).

14. Камышный А.М., Путилин Д.А., Деген А.С., Камышная В.А. Влияние экспериментального стрептозотоцинового диабета на дифференцировку Т-хелперов в панкреатических лимфатических узлах и кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани. Сборник тезисов VII Всероссийского диабетологического конгресса. (Москва, 24-27 февраля 2015). Москва, 2015. С. 56. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).

15. Putilin D.A., Kamyshny A.M. Changes in the expression level of transcription factor Foxp3 in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration. *Endocrine Abstracts* 18th European

Congress of Endocrinology (Munich, Germany, 28 - 31 May 2016). Munich, 2016. P.265. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).*

16. Kamyshny A., Putilin D. Immunometabolism of lymphocytes of pancreatic lymph nodes during experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus and after introduction of metformin. Abstracts 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, Germany, 27-30 September 2016). Hamburg, 2016. P.221-222. *(Дисертантом особисто проведено аналіз даних та написання тез).*

17. Putilin D.A., Kamyshny A.M., Kamyshna V.A. Study of expression of genes *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* and *IL17A* in parapancreatic adipose tissue of rats with streptozotocin-induced diabetes and after metformin administrations. Endocrine Abstracts 19th European Congress of Endocrinology (Lisbon, Portugal, 20 - 23 May 2017). Lisbon, 2017. P.455. *(Дисертантом особисто проведено аналіз даних та написання тез).*

ЗМІСТ

	стор.
Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.....	18
Вступ.....	20
Розділ 1 Роль панкреатичних лімфатичних вузлів і жирової тканини у розвитку і прогресії діабету (огляд літератури).....	27
1.1 Функціональний стан клітин ПЛВ і розвиток діабету.....	27
1.2 Роль вроджених і адаптивних компонентів імунної системи у розвитку діабету	30
1.3 Периферична імунологічна толерантність до панкреатичних антигенів і імунометаболізм лімфоцитів при діабеті.....	33
1.4 Роль жирової тканини в прогресії діабету.....	42
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження.....	45
2.1 Експериментальні тварини	45
2.2 Групи експериментальних досліджень	45
2.3 Експериментальні моделі	46
2.3.1 Моделювання ЕСІЦД	46
2.3.2 Корекція ЕСІЦД метформіном.....	48
2.4 Методи імуофлюоресцентного дослідження.....	49
2.4.1 Дослідження експресії TLR2 і TLR4 рецепторів за допомогою реакції прямої імуофлюоресценції у ПЛВ та ПЖТ.....	49
2.4.2 Дослідження розподілу NOD2 ⁺ , RIGI ⁺ , T-bet ⁺ , mTor ⁺ , RORγt ⁺ і Foxp3 ⁺ лімфоцитів за допомогою реакції непрямой імуофлюоресценції у ПЛВ.....	52
2.5 Методи молекулярно-генетичного дослідження.....	53
2.5.1 Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін.....	53
2.5.2 Виділення тотальної РНК.....	54
2.5.3 Зворотна транскрипція (виділення кДНК).....	55
2.5.4 Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.....	56

2.6	Методи статистичних досліджень	59
Розділ 3 Зміни рівня експресії генів <i>GLUT1</i> , <i>mTOR</i> , <i>AMPK1α</i> і розподілу <i>mTOR</i> ⁺ -клітин в ПЛІВ в умовах розвитку ЕСЦД та після введень метформіну тваринам з цукровим діабетом		
3.1	Дослідження експресії мРНК генів <i>GLUT1</i> , <i>mTOR</i> , <i>AMPK1α</i>	61
3.2	Дослідження розподілу <i>mTOR</i> ⁺ -клітин в ПЛІВ.....	66
Розділ 4 Особливості впливу ЕСЦД і введень метформіну на експресію рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами ПЛІВ.....		
4.1	Характер розподілу TLR-2 ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ.....	75
4.2	Характер розподілу TLR-4 ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ.....	79
4.3	Зміни розподілу NOD2 ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ.....	84
4.4	Зміни розподілу RIGI ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ.....	86
Розділ 5 Аналіз рівня мРНК генів <i>Aire</i> та <i>Deaf1</i> і динаміки клітинного складу T-bet ⁺ (Th1), Ror γ t ⁺ (Th17) і Foxp3 ⁺ -лімфоцитів (Treg) в ПЛІВ при ЕСЦД і після введень метформіну		
5.1	Дослідження експресії мРНК генів <i>Aire</i> та <i>Deaf1</i>	90
5.2	Аналіз клітинного складу T-bet ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ.....	93
5.3	Аналіз клітинного складу Ror γ t ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ	98
5.4	Аналіз клітинного складу Foxp3 ⁺ -лімфоцитів в ПЛІВ	102
Розділ 6 Аналіз експресії TLR-2 і TLR-4 адипоцитами і рівня транскриптів генів <i>mTOR</i> , <i>Foxp3</i> , <i>IL1β</i> і <i>IL17A</i> у ПЖТ при ЕСЦД і після введень метформіну.....		
6.1	Розподіл TLR-2 і TLR-4 серед адипоцитів ПЖТ.....	111
6.2	Дослідження експресії мРНК генів <i>mTOR</i> , <i>Foxp3</i> , <i>IL1β</i> і <i>IL17A</i>	117
Розділ 7 Аналіз та узагальнення результатів дослідження.....		
Висновки.....		
Список використаних джерел.....		
Додатки.....		

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

ЦД	– цукровий діабет
ЕСЦД	– експериментальний стрептозотоцин-індукований цукровий діабет
ПЛВ	– панкреатичні лімфатичні вузли
ПЖТ	– парапанкреатична жирова тканина
ПАМП	– патоген-асоційовані молекулярні образи (патерни)
ППР	– патерн - розпізнаючі рецептори
Th	– Т хелпери
TLR	– Toll – подібні рецептори
NLR	– NOD– подібні рецептори
RLR	– RIG – подібні рецептори
NOD2	– (nucleotide binding oligomerization domain containing 2), рецептор групи NLR
RIGI	– (retinoic acid-inducible gene 1), рецептор групи RLR, фермент хеліказа
mTOR	– мішень рапаміцину, серин/треонінова протеїнкіназа ссавців
АМРК	– 5'АМФ-активуєма протеїнкіназа
GLUT1	– глюкозний транспортер 1 типу
Aire	– аутоімунний регулятор
Deaf1	– (deformed epidermal autoregulatory factor 1), транскрипційний регулятор експресії периферичних антигенів
ПТА	– периферичні тканиноспецифічні антигени
IL1 β	– інтерлейкін 1 β
IL17A	– інтерлейкін 17A
Th1	– Т-хелпери 1 типу
Th17	– Т-хелпери 17 типу

Treg	–	T-регуляторні клітини
Foxp3	–	(forkhead box P3) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання T-лімфоцитів у напрямку Treg
T-bet	–	(T-box transcription factor) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання T-клітин у напрямку Th1
ROR γ t	–	(ретиноїд-орфан рецептор γ t) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання T- клітин у напрямку Th17
VAT Tregs	–	(visceral adipose tissue CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ regulatory T cells), T-регуляторні клітини вісцеральної жирової тканини
STZ	–	стрептозотоцин
eTACs	-	екстратимічні клітини, що експресують Aire
LNSCs	-	стромальні клітини лімфатичних вузлів
ДК	-	дендритні клітини
АПК	-	антиген-презентуючі клітини
GAPDH	-	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
ЛПС	-	ліпополісахариди
PBI	-	рецептори вродженого імунітету

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Цукровий діабет (ЦД) є одним з найпоширеніших неінфекційних захворювань у світі. За даними ВООЗ на нього хворіє близько 3 % населення Землі, а за даними Центру медичної статистики МОЗ України станом на 1 січня 2016 року загальна кількість хворих на ЦД в Україні становила понад 1 млн. 223 тис. осіб.

В останні роки стало зрозуміло, що саме в панкреатичних лімфатичних вузлах (ПЛВ), які дрениують підшлункову залозу, а також окремі сегменти кишечника відбувається початкова активація діабетогенних $CD8^+$ та $CD4^+$ Т-клітин до їх міграції в панкреатичні острівці [1]. Антиген-презентуючі клітини ПЛВ містять острівцеві антигени (Аг) і активують про-діабетогенні субпопуляції Т-лімфоцитів [2, 3], посилюють Т-клітинну відповідь після початкової зустрічі з панкреатичними Аг в панкреатичних острівцях [4], а у людей з ЦД 1 типу порушена цитоархітектоніка ПЛВ [5]. Між тим, роль ПЛВ в прогресії діабету вимагає додаткових уточнень і доповнень.

Метаболічні зміни, які розвиваються в умовах ЦД, насамперед гіперглікемія, здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів [6-8]. Т-клітини експресують низку транспортерів глюкози, основним із яких є Glut 1 [9-11]. Продіабетогенні Th1 і Th17-клітини характеризуються високим рівнем експресії Glut 1 і схильністю до гліколізу [12, 13], у супресорних Treg – навпаки, низький рівень експресії Glut 1 і висока швидкість окислювального метаболізму [14, 15]. В свою чергу, важливим регулятором імунометаболізму лімфоцитів є протеїнкіназа mTOR [16, 17], а одним із її блокаторів – метформін, який діє через АМФ-активуєму протеїнкіназу (АМПК) [18-20]. Висока активність mTOR здатна посилювати прогресію діабету через активацію ефекторних прозапальних субпопуляцій лімфоцитів [21, 22], і навпаки, низька сприяє диференціюванню Treg [23, 24], блокуючих інсуліт. Тим не менш, про рівень транскрипційної активності генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α* в ПЛВ при

розвитку експериментального стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету (ЕСЦД) майже нічого невідомо.

Критичну роль в прогресії діабету можуть грати і зміни експресії паттерн-розпізнаючих рецепторів (ППР) вродженого імунітету, зокрема мембранних толл-подібних рецепторів 2 і 4 типу (TLRs), цитоплазматичних NOD-подібних рецепторів (NLR), сенсорів вірусних РНК RIG-подібних рецепторів (RLRs) [25-27]. У мишей, дефіцитних за рецепторами NOD2, ЕСЦД не розвивається [28], порушена індукція Th1 і Th17-клітин в ПЛВ, а про ефекти метформіна на експресію ППР лімфоцитами ПЛВ взагалі нічого не відомо. Не менш важливу роль в розвитку діабету можуть грати порушення периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних Аг [29], яка в ПЛВ регулюється генами *Aire* [30] та *Deaf1* [31]. Зміни їх активності, в свою чергу, здатні впливати на розподіл ефекторних Т-клітин в ПЛВ [32, 33], а функціональні дефекти Treg разом з експансією Th17-лімфоцитів є основними ознаками порушень в ПЛВ у пацієнтів з ЦД 1-го типу та експериментальних тварин [34-36]. Резидентні до ПЛВ і панкреатичних острівців Т-клітини характеризуються низкою функціональних особливостей [37-40].

Парапанкреатична жирова тканина (ПЖТ) також може бути важливим додатковим джерелом прозапальних стимулів в умовах діабету [41], а адипоцити людини та гризунів експресують практично весь спектр відомих Толл-подібних рецепторів [42]. ЖТ містить цілі кластери клітин вродженої та адаптивної імунної систем [43], інфільтруючих адипоцити та від балансу яких залежить рівень продукції низки цитокінів, які чинять як системні, так і паракринні ефекти на функцію підшлункової залози [44]. Treg ЖТ взагалі виділені в окрему субпопуляцію [45, 46].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології»

(державний реєстраційний номер 0112U005642). Дисертант є співвиконавцем теми.

Мета дослідження – з'ясувати особливості змін функціонального стану лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну з допомогою імунофлюоресцентних і молекулярно-генетичних методів.

Завдання дослідження.

1. Визначити особливості імунометаболізму лімфоцитів шляхом з'ясування рівня мРНК генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α* і розподілу *mTOR*⁺-клітин в панкреатичних лімфатичних вузлах в умовах розвитку експериментального цукрового діабету та після введення метформіну тваринам з діабетом.

2. Вивчити розподіл TLR-2⁺-, TLR-4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺-рецепторів вродженого імунітету серед лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів щурів в цих же експериментальних групах.

3. З'ясувати відносний рівень мРНК регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів *Aire* та *Deaf1* і динаміку клітинного складу T-bet⁺ (Th1), Ror γ t⁺ (Th17) і Foxp3⁺-лімфоцитів (Treg) в панкреатичних лімфатичних вузлах щурів в цих же експериментальних групах.

4. Оцінити характер експресії TLR-2 і TLR-4 адипоцитами і рівень транскриптів генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у парапанкреатичній жировій тканині щурів в цих же експериментальних групах.

Об'єкт дослідження. Експериментальний цукровий діабет і його патогенетична корекція, імунометаболізм лімфоцитів.

Предмет дослідження. Морфо-функціональний стан клітин ПЛІВ та ПЖТ в умовах ЕСЦД і після введення метформіну.

Методи дослідження: патофізіологічні (моделювання стрептозотоцинового діабету), біохімічні (визначення рівня глюкози), морфометричні (визначення площі і периметру клітин), імунофлюоресцентні

(реакція прямої або непрямой імунофлюоресценції з використанням моноклональних або поліклональних антитіл для ідентифікації TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺-, RIGI⁺-, T-bet⁺-, RORγt⁺-, Foxp3⁺- і mTor⁺-клітин), метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) (оцінка відносного рівня мРНК генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1α*, *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *IL-1β*, *IL-17A*), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз (розрахунок абсолютної і відносної щільності розподілу різних імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах ПЛВ і ПЖТ, а також щільності рецепторів на ідентифікованих імунопозитивних клітинах), методи статистичного аналізу отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. В результаті роботи за допомогою сучасних молекулярно-генетичних і імунофлюоресцентних методів виявлено комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСЦД: зміни імунометаболізму лімфоцитів; порушення формування периферичної імунологічної толерантності; активація ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах ПЛВ і адипоцитах ПЖТ; зміни розподілу ефекторних Т-клітин в ПЛВ; посилення прозапальної сигналізації в ПЖТ на тлі зменшення рівня мРНК Foxp3.

Вперше виявлено, що метаболічні зміни, які розвиваються в умовах ЦД, здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів ПЛВ. Доведено, що гіперглікемія викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* та протеїнкінази *mTOR* в імунних клітинах ПЛВ, що є важливим тригером їх диференціювання в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1 і Th17.

Вперше встановлено, що в умовах ЕСЦД знижується рівень ектопічної експресії в клітинах ПЛВ генів-регуляторів периферичної імунологічної толерантності *Deaf1* та *Aire*, що супроводжується зменшенням кількості Treg в ПЛВ.

Експериментально доведено активацію компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЦД і зростання кількості TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і

RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ щурів, забезпечуючи нове розуміння молекулярного патогенезу ЦД 1-го типу.

Розширені наукові поняття щодо ролі жирової тканини у прогресії діабету. З'ясовано, що в умовах ЕСЦД зростає кількість TLR2⁺- та TLR4⁺-адипоцитів у парапанкреатичній клітковині, що індукує прозапальну сигналізацію в жировій тканині і підвищує рівень експресії мРНК IL1 β і IL17A на тлі транскрипційної репресії Foxp3.

Обґрунтована доцільність застосування метформіну для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД. Вперше продемонстрована здатність метформіну впливати на транскрипційну активність генів *AMPK1 α* і *mTOR*, зменшувати чисельність лімфоцитів, експресуючих PRR, змінювати розподіл Treg і Th17-клітин у ПЛВ щурів з цукровим діабетом.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження становлять практичний інтерес для сучасної діабетології, ендокринології, імунології і доводять, що порушення функціонування клітин ПЛВ і ПЖТ грають важливу роль в імунопатогенетичних механізмах розвитку цукрового діабету і можуть бути одними з факторів, які підтримують розвиток і прогресування патологічного процесу. Експериментально обґрунтована доцільність застосування метформіну для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у практику наукових досліджень і навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології ВДНЗ України Буковинського державного медичного університету, Запорізького державного медичного університету, Харківського національного медичного університету, та кафедрі нормальної фізіології Запорізького національного університету.

Дисертант, спільно з співавторами, брав участь у розробці й апробації нового способу виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин (Пат. на корисну модель Україна, МПК09В 23/28, №17281), що дозволяє підвищити ефективність специфічного виділення цільового продукту та знизити матеріальні затрати та час проведення

дослідження.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно здійснив патентно-інформаційний пошуки, провів аналіз вітчизняних і зарубіжних інформаційних джерел відповідно до теми дослідження. Здобувачем виконано експериментальне моделювання досліджуваної патології, проведено статистичний аналіз отриманих результатів, розроблено основні теоретичні та практичні положення роботи. Спільно з науковим керівником здійснено вибір теми дисертаційної роботи, проведено аналіз та узагальнення отриманих результатів, обґрунтування та формулювання висновків. Автором написано всі розділи дисертації, оформлено наукові публікації й автореферат. У всіх наукових працях, що містять результати дисертаційних досліджень, використано фактичний матеріал, отриманий автором у процесі виконання роботи.

Робота виконана у відділі молекулярно-генетичних досліджень навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ, який акредитований на право проведення вимірювань, що знаходяться в сфері державного метрологічного нагляду (Свідоцтво про атестацію № 039/14 від 25 червня 2014р.).

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, оприлюднені на Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні аспекти медицини та фармації” (Запоріжжя, 2014); VIIth meeting of the association of endocrinologist of Ukraine (Kyiv, 2014); VII Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2015); 18th European Congress of Endocrinology (Munich, 2016); 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, 2016); 19th European Congress of Endocrinology (Lisbon, 2017); International conference Novel Concepts in Innate Immunity (Tübingen, 2017).

Публікації. Результати дисертаційного дослідження висвітлено у 17 наукових працях, серед яких 6 статей у фахових виданнях України, 4 статті у

закордонних періодичних виданнях, 6 публікацій у матеріалах і тезах наукових форумів, 1 патент на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел (228 найменувань, у тому числі 9 – кирилицею та 219 – латиницею), додатків. Дисертація викладена на 172 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 31 таблицею та 27 рисунками.

РОЗДІЛ 1

РОЛЬ ПАНКРЕАТИЧНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ І ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ У РОЗВИТКУ І ПРОГРЕСІЇ ДІАБЕТУ

(огляд літератури)

1.1. Функціональний стан клітин ПЛВ і розвиток діабету

В останні роки стало зрозуміло, що важливу роль в механізмах розвитку ЦД відіграють зміни функціонального стану панкреатичних лімфатичних вузлів (ПЛВ), дренуючих панкреатичні островці й екзокринну частину підшлункової залози, а також окремі сегменти кишечника [1]. Цілий ряд даних в наш час вказує на те, що саме в ПЛВ відбувається початкова активація діабетогенних CD8 і CD4 Т-клітин до їх міграції в панкреатичні островці. Важливість ПЛВ в розвитку діабету підтверджена принаймні в двох експериментальних дослідженнях. По-перше, їх хірургічне видалення у мишей лінії NOD перешкоджає розвитку у них діабету із-за відсутності праймування Т-клітин панкреатичними Аг [47]. По-друге, нащадки вагітних NOD-мишей, яким вводили рецептори до лімфотоксину β (lymphotoxin- β), поєднані з людським IgFc, зазнавали порушення формування ЛВ, в тому числі і ПЛВ, що також перешкоджало розвитку діабету [48]. В обох ситуаціях введення активованих діабетогенних Т-клітин призводило до розвитку діабету.

Проліферація діабетогенних CD4 Т-клітин в ПЛВ була показана в експериментах з перенесенням мічених лімфоцитів. Зокрема, введення неактивованих CD4 Т-клітин призводило до їх сильної селективної проліферації саме в ПЛВ [49]. Вивчення цього феномену показало присутність тут дендритних клітин (ДК), що містять панкреатичні антигени, зокрема інсулін [50]. В ПЛВ 56 % Т-хелперів взаємодіяли з антиген-презентуючими клітинами (АПК), презентуючими β -клітинні пептиди [2]. Схожі результати були продемонстровані в дослідженні Tang та ін. [51], які показали в ПЛВ АПК, що містять бета-клітинні антигени із островців, експресуючі GFP (green fluorescent

protein). Діабетогенні CD8 T-клітини, аналогічно T-хелперам, сильно проліферують в ПЛВ [3]. Характерно, що аутореактивні цитотоксичні T-лімфоцити (ЦТЛ) набувають більш високу експресію своїх ефекторних маркерів в панкреатичних острівцях NOD мишей після їх активації в ПЛВ. Зокрема, такі ЦТЛ характеризуються набагато більш інтенсивною експресією гранзиму В, інтерферону γ , і CD107a [52]. Здавалось би, така активація ЦТЛ могла відбутися і в панкреатичному острівці безпосередньо. Проте, роль в цьому процесі ПЛВ підтверджується за допомогою введення агоніста сфінгозин-1-фосфат рецепторів FTY720, блокуючого міграцію лімфоцитів із ПЛВ [52]. Після його застосування острівцеві CD8-лімфоцити не збільшували експресію своїх цитотоксичних молекул. Процес, яким АПК ПЛВ захоплюють і представляють β -клітинні антигени ще не повністю відомий, як і тропність їх міграції в ПЛВ. Є роботи, які демонструють, що при ін'єкції в підшлункову залозу клітин або маркованих білків вони досягають ПЛВ [53], хоча вони виконані в нефізіологічних умовах. Домінують гіпотези про здатність острівцевих ДК захоплювати панкреатичні Аг і селективно мігрувати в ПЛВ, причому цей процес відбувається і в фізіологічних умовах, а в умовах запалення стає більш інтенсивним. Важливо відмітити, що АПК, які оточують панкреатичні острівці і не розміщуються в них, можливо, не володіють здатністю представляти антигени острівця [54]. Так, якщо острівцеві ДК активно захоплювали панкреатичні Аг, то стромальні ДК були вільними від них, і не було виявлено ніякого очевидного транспорту β -клітинних Аг в області пері-острівця [55].

Характерно, що ПЛВ новонароджених мишей і приблизно до третього тижня життя володіють слабкою здатністю праймування острівцевими Аг T-лімфоцитів [56]. Пізніше, вузол стає чутливим до активації переданих T-клітин. Не було виявлено ніяких суттєвих відмінностей в субпопуляціях ДК ПЛВ між молодими або старими мишами [56]. Характерно, що в ПЛВ активна презентація острівцевих Аг спостерігається після пошкодження β -клітин, в тому числі індукованого стрептозотоцином (STZ). Була виявлена залежність і

між звичайною віковою реорганізацією та перебудовою цитоархітекtonіки панкреатичних острівців, що супроводжується природньою загибеллю частини β -клітин і інтенсивністю презентації їх Аг в ПЛВ [56]. Окремі хвилі фізіологічного апоптоза β -клітин були виявлені після народження у щурів, мишей і людини [57, 58]. Відносно недавні дані тестування реактивних до 12-20 сегментів β -ланцюга інсуліну CD4 Т-клітин (*8F10 CD4 Т-клітини*) показали, що не всі β -клітинні Аг презентуються в ПЛВ [54]. В дослідженнях *in vitro* *8F10 CD4 Т-клітини* розпізнають інсулін, що презентується тільки острівцевими АПК, а не АПК панкреатичних лімфатичних вузлів. А недавні дослідження *in vivo* з використанням *8F10 TCR*-трансгенних мишей показали три важливих висновки: 1) наївні *8F10 CD4 Т-клітини* не проліферують в ПЛВ, а тільки в панкреатичних острівцях NOD-мишей після їх адоптивної передачі; 2) *8F10* трансгенні “*nodeless*” миші (у них відсутня більшість лімфатичних вузлів, в тому числі ПЛВ) містили Т-клітини в панкреатичних острівцях уже в віці 5 тижнів; і 3) у *8F10 RAG1^{-/-} - nodeless* мишей розвинувся цукровий діабет з однаковою кінетикою як і у *8F10 RAG1^{-/-}* мишей [4]. Ця інформація можливо свідчить про нову роль ПЛВ в розвитку ЦД, яка може полягати в підсиленні діабетогенної Т-клітинної відповіді після початкової зустрічі з панкреатичними антигенами всередині острівця Лангерганса. Після такої первинної острівцевої активації АПК мігрують в ПЛВ, де відбувається подальша активація наївних Т-лімфоцитів антигенами бета-клітин. Willcox A. et al. (2017) показали порушення цитоархітекtonіки ПЛВ у людей з ЦД 1 типу. Первинні фолікули в них мають більш дифузну структуру, немає чіткого розділення Т- і В-клітинних зон, гермінативні центри у вторинних фолікулах зустрічаються з меншою частотою [5].

Таким чином, роль ПЛВ в прогресії діабету вимагає додаткових уточнень і доповнень. Їх розміщення на дуже своєрідному злитті потоків антигенів із підшлункової залози з однієї сторони й із кишечника та брюшини з іншої, має прямий вплив на характер активації реактивних до β -клітинних антигенів Т-клітин.

1.2. Роль вроджених і адаптивних компонентів імунної системи у розвитку діабету

Особливий інтерес представляє вивчення експресії рецепторів вродженого імунітету клітинами ПЛВ. Так, останні дослідження показують, що в розвитку ЦД 1 типу критичну роль можуть грати зміни експресії цілої низки паттерн-розпізнаючих рецепторів (ППР): мембранних та ендосомальних толл-подібних рецепторів (TLRs), цитоплазматичних NOD-like рецепторів (NLR), сенсорів вірусних РНК RIG-like рецепторів (RLRs). Зокрема, значення TLRs в розвитку ЦД достатньо яскраво висвітлено у сучасних дослідженнях. Так, нокаут по адаптерному білку MyD88, що передає сигнал через TLRs попереджував розвиток діабету у NOD мишей [25], а Devaraj S. et al. (2008) було показано, що експресія TLR2 і TLR4 більш інтенсивна на моноцитах пацієнтів з ЦД 1 типу в порівнянні зі здоровими людьми [59]. Це може свідчити про те, що запалення, запущене через TLR2 та TLR4 може значною мірою впливати на прогресію ЦД 1. Дані про особливості розподілу ППР на клітинах ПЛВ майже відсутні. Лише відомо, що блокада TLR9 специфічними антагоністами перешкоджає активації діабетогенних CD8⁺ Т-клітин в ПЛВ у NOD-мишей і блокує розвиток діабету [3], а застосування в умовах стрептозототин-індукованого діабету у мишей лінії C57BL/6 агоністу TLR2 - Pam3CSK4 – призводить до збільшення у ПЛВ кількості макрофагів, дендритних клітин, прозапальних CD4⁺TNFα⁺, CD4⁺IFNγ⁺ та CD4⁺IL-17⁺-клітин, а також зменшує число регуляторних CD25⁺Foxp3⁺ Т-лімфоцитів [60].

Разом з TLRs, значну роль у виникненні та прогресії аутоімунних захворювань (АІЗ) можуть грати й NOD-like рецептори (NLR), які локалізовані в цитоплазмі та експресуються в декількох типах клітин – від макрофагів, ДК, лімфоцитів до епітеліоцитів [61]. Представник даної родини білок NOD2 є цитоплазматичним сенсором структурних компонентів бактеріального пептидоглікану (PGN) – мураміддипептидів (muramyl dipeptide MDP – N-acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamine), які присутні в PGN практично у всіх

грам позитивних та грам негативних бактерій [62]. Сигналізація через NOD2 призводить до активації NF- κ B, який, імпортуючись до ядра клітини, індукує транскрипцію генів прозапальних цитокінів та хемокінів (TNF α , IL-1 β , IL-18, IL-12, IL6, CXCL8), монооксиду азоту, костимулюючих молекул (CD40, CD80 і CD86), молекул адгезії й індукції розвитку запального процесу [63, 64]. Здатність лімфоцитів безпосередньо експресувати NOD2 була показана в ряді робіт [65], але даних стосовно лімфоцитів ПЛВ немає зовсім.

I, нарешті, ще одним важливим представником системи ПРР, дизрегуляцію якого пов'язують з можливістю розвитку ЦД, є система RIG-like рецепторів (RLRs) [66]. RLRs це система цитоплазматичних сенсорів, які відповідають на вірусну РНК і включають декілька основних компонентів: RIG-I (retinoicacid-inducible gene-I), MDA5 (melanoma differentiated-associated gene-5) та LGP2 (laboratory of genetics and physiology-2), що можуть ініціювати та регулювати вірус-обумовлену продукцію інтерферонів (INF) [67]. Відповідь через RLRs відіграє важливу роль в модуляції адаптивних імунних реакцій та прогресії ЦД, так як сприяє клональному диференціюванню Т-клітин після антигенної стимуляції [68]. Anz et al. виявили, що RIG-I та MDA5 експресуються як ефекторними, так і регуляторними Т-клітинами, а RLR-сигналізація необхідна для регуляції функціонування Treg-клітин протягом пікорнавірус-індукованої інфекції [69]. Зміна рівня експресії RLRs може впливати на баланс субпопуляцій Т-хелперів, впливаючи на рівень утворення прозапальних Th17 і Th1-клітин [70]. Інфікування щурів лінії BBDR вірусом KRV (Kilhamratvirus) збільшує рівень IL-12 та транскриптів мРНК IFN γ в ПЛВ [71].

Активация різноманітних груп ПРР призводить до включення адаптивної імунної системи, впливаючи на баланс субпопуляцій лімфоцитів в ПЛВ. Так, одне з найбільш актуальних питань патогенезу ЦД стосується ролі Treg в його розвитку [72]. Превалювання кількісного проти якісного дефекту в субпопуляції Tregs, яке може сприяти розвитку ЦД 1 типу, також на сьогоднішній день залишається спірним та неясним питанням [73]. В деяких

дослідженнях було показано, що кількість Treg залишалась постійною та не збільшувалась в лімфатичних тканинах до початку діабету [74, 75]. В інших роботах продемонстрована активна міграція Tregs в місцях розвитку запалення, проте, ініціація ЦД 1 типу в цих дослідженнях припускає, що відповідь Treg недостатня, щоб пригнічувати активність прозапальних ефektorних клітин [76]. Частково, ця недостатня відповідь Treg може бути пов'язана зі зменшенням їх супресивної активності з віком [77]. У NOD мишей з генетичним нокаутом костимулюючих молекул (таких як CD40, CD28, і B7-1/B7-2) діабет розвивається швидше та в більш важкій формі, ніж у тих же мишей дикого типу, припускаючи, що дані молекули важливі для генерації клітин Treg [78].

Можливо, більш правильно розглядати роль Treg в розвитку ЦД в контексті їх взаємовідносин з Th17, як відомо, вони також відіграють надзвичайно важливу роль в патогенезі аутоімунних захворювань. Так, Th17 можуть діяти побічно через їх диференціювання в інші ефektorні клітини [79], в тому числі в Tregs у випадку надлишку TGF- β і TNF α [80]. Блокада функцій Th17 за допомогою антитіл anti-IL-17 затримує початок діабету у мишей лінії NOD в тому числі і шляхом збільшення чисельності Treg [81], вказуючи, що клітини Th17 відіграють важливу роль в балансі Treg/T ефektorів.

Незважаючи на певні обмеження ідентифікації Treg у людей, було декілька спроб вивчити їх кількість та функціональні особливості у пацієнтів з ЦД 1 типу [72, 82]. У людей з ЦД 1 типу, як показано в ряді робіт, не спостерігається змін чисельності Treg, але зменшуються їх функціональні відповіді із-за зниження секреції іTreg-залежного супресорного цитокіна IL-10 [83, 84]. Додатково, у дітей з ЦД 1 типу є транзиторне зниження супресорної функції Treg протягом перших 3-6 місяців після постановки діагнозу з подальшим відновленням до рівня контролю [85]. Ще більш невідоме питання про те, що відбувається з балансом Treg/T ефektorів за декілька років або місяців до встановлення діагнозу ЦД 1 типу у людей [86]. Можливо, що ще однією з причин функціональної неспроможності Treg при ЦД є дефектна передача сигналів від дендритних клітин [87]. Так, незрілі ДК із слизової

оболонки кишечника у людей з ЦД 1 типу відповідальні за зниження диференціювання $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Tregs в кишечнику [88]. Ця дефектна *de novo* генерація iTregs в слизовій оболонці кишечника може чинити негативний вплив на баланс Treg/T ефektorів, призводячи до відмови ауто толерантності. Розвиток діабету, індукованого стрептозотоцином у C57BL/6 мишей багато в чому залежить від функціонального стану та кількості $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Treg клітин в ПЛВ. Введення циклофосфаміду, що знижує чисельність $Foxp3^+$ клітин, підсилює гіперглікемію, глюкозурію та інсуліт [89]. Тому, вивчення особливостей диференціювання субпопуляцій Т-хелперів в ПЛВ в умовах експериментального цукрового діабету є важливим практичним завданням.

1.3. Периферична імунологічна толерантність до панкреатичних антигенів і імунометаболізм лімфоцитів при діабеті

ЦД може розвиватися і в результаті порушень формування центральної та периферичної толерантності до острівцевих Аг, зокрема при порушеннях рівня експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів (ПТА) в ПЛВ. В той час як випадкова експресія ПТА в тимусі, що контролюється транскрипційним фактором Aire, є важливим фактором формування ауто толерантності до власних Аг, недавні дані свідчать, що активна експресія ПТА може також спостерігатися і у вторинних лімфатичних органах [30].

Дослідження тканинної експресії Aire продемонстрували, що мРНК і білок Aire експресуються насамперед у лімфоїдних органах, найбільш інтенсивно – у тимусі, дещо слабкіше в селезінці й лімфатичних вузлах [90]. Імуногістохімічні дослідження показали, що серед клітин тимуса Aire найбільш виражений у медулярних епітеліоретикулоцитах (mTEC) і дендритних клітинах [91]. Вивчення внутрішньоклітинної локалізації показало, що AIRE може розташовуватися як у ядрі, так і в цитоплазмі клітин. Крім цього, експресія AIRE була виявлена в тимоцитах і периферичних лімфоцитах [92]. У периферичній крові AIRE був виражений тільки в В-лімфоцитах, дендритних

клітинах і макрофагах, але не в Т-лімфоцитах, а мРНК AIRE була більш інтенсивно виражена в В-лімфоцитах у порівнянні з Т-лімфоцитами. Nagafuchi S. et al. (2006) показали, що AIRE експресується також у людських периферичних CD4⁺ Т-лімфоцитах, і найбільше високо – в антиген- і інтерлейкін 2- стимульованих Т-клітинах [93]. Виділення й очищення mTEC від Aire-нокаутних і від мишей дикого типу з наступною оцінкою їх ген-експресуючого профілю методом ДНК-мікрочипів (DNA-microarray) показало, що Aire дійсно регулює транскрипцію великої кількості тканиноспецифічних антигенів, у тому числі й β-клітинних (зокрема інсуліну). Цікаво, що транскрипція ряду ПТА, наприклад таких як С-реактивний білок і глутаматдекарбоксилаза (GAD67), виявилася незалежною від Aire [94]. Aire також позитивно або негативно регулює транскрипцію в mTEC великого діапазону генів, які не кодують ПТА. Цікавим фактом було виявлення того, що дефіцит Aire викликає збільшену сприйнятливість до стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету. Крім того, макрофаги Aire^(-/-) мишей продукували більш високі рівні продіабетогенного цитокіну TNFα і більш низькі рівні супресорного цитокіну IL-10 після індукції стрептозотоцинового діабету, а Aire^(-/-) миші розвивали більш високу частоту виявлення аутоантитіл до клітин панкреатичних острівців [95].

Ще одним нещодавно відкритим регулятором експресії ПТА є транскрипційний фактор Deaf1, зміни рівня якого в ПЛВ у NOD мишей корелюють з частотою розвитку аутоімунного діабету [96]. Встановлено, що зміна експресії певної ізоформи Deaf1 приводить до розвитку тяжкого інсуліту у мишей лінії NOD. Еквівалентний різновид ізоформи Deaf1 був ідентифікований в ПЛВ і у пацієнтів з ЦД1. Як виявилось, і у NOD мишей, і у людини дана ізоформа уповільнює діяльність канонічного Deaf1 та пригнічує таким чином транскрипцію ПТА, що може сприяти патогенезу ЦД 1 типу [97]. Раніше Lee J. et al. (2007) відкрили, що фібробластні клітини стромы лімфатичного вузла (LNSC) експресують різні ПТАг, зокрема овальбумін, що приводить до делеції адаптивно перенесених специфічних до овальбуміну CD8

T клітин [98]. Так само ендogenous антиген меланоцитів тирозиназа, що експресується стромою лімфатичних вузлів, викликає видалення специфічних до нього CD8 T клітин, які були не еліміновані в результаті негативної селекції в тимусі [99]. Більш свіжа робота описує популяцію екстратимічних Aire-експресуючих клітин (eTACs) в стромі ЛВ, регулюючих транскрипцію в ньому TSAs, які відрізняються від AIRE, що регулюються в тимусі, і чия взаємодія з найвними специфічними до них CD8 T клітинами приводить до їх делеції [100]. Ці результати демонструють, що експресія ПТА в ПЛВ може відігравати важливу роль в патогенезі ЦД. Проте, багато важливих питань залишаються ще не зрозумілими, як то ідентичність Deaf-1 експресуючих клітин іншим раніше охарактеризованим стромальним елементам лімфатичних вузлів, включаючи UEA-1⁺gp38⁺LNCSs [98] і Aire-експресуючими екстратимічними клітинами eTACs [100]. Проте, вже зараз ясно, що Deaf1, на відміну від Aire, експресується у великій кількості тканин.

За останні 5 років відбувся справжній прорив у вивченні метаболізму лімфоцитів, з'явився і почав активно використовуватись термін імунометаболізм. Це пов'язано перш за все з появою дуже чутливих підходів до вивчення метаболізму. Імуноцити з різноманітними функціями використовують декілька різних метаболічних шляхів, щоб генерувати необхідні рівні енергії та підтримувати виживання та проліферацію. Можна виділити 6 ключових метаболічних шляхів, що відіграють вирішальну роль в диференціюванні та виживанні імунних клітин: 1) гліколіз; 2) цикл трикарбонових кислот; 3) пентозо-фосфатний цикл; 4) окислювання жирних кислот; 5) синтез жирних кислот та 6) метаболізм амінокислот, кожен із яких по-різному активний в окремих типах імуноцитів в нормі та при патології.

Не дивлячись на те, що гліколіз – відносно неефективний метаболічний шлях для генерації клітиною АТФ (тільки 2 молекули АТФ на 1 молекулу глюкози), він надає ряд ключових переваг для клітин, так як відіграє ведучу роль у забезпеченні біосинтетичних проміжних ланок для синтезу рибози для нуклеотидів, амінокислот і жирних кислот. Багато ростових сигнальних шляхів,

з участю фосфатиділінозитол-3-кінази (Phosphoinositide 3-kinases – PI3K) і мітоген-активованої протеїнкінази (mitogen-activated protein kinase – MAPK) сприяють використанню клітиною саме гліколізу, тому він є домінуючим шляхом у клітин, що швидко проліферують. Активовані Т-лімфоцити та макрофаги володіють високою спорідненістю до глюкози [101], а використання інгібіторів гліколізу (2-Deoxy-D-glucose) запобігає активації макрофагів *in vitro* і блокує запалення *in vivo* [102]. Парадоксально, але незважаючи на не самий ефективний спосіб виробити АТФ, активовані імунні клітини використовують переважно гліколіз (рис. 1.1). На відміну від цього шляху, окислювальне фосфорилування потребує мітохондріальної біоенергетики, яка є більш складним і ймовірно більш повільним процесом. Також, лімфоцити, які мають генерувати АТФ швидко переключаються на гліколіз. Цілий ряд робіт показав підсилення гліколізу в ліпополісахаридах (ЛПС) – активованих макрофагах і ДК [103, 104], в активованих НК-клітинах [105], Т- і В-лімфоцитах [12]. Ефекторні Т-лімфоцити демонструють збільшення гліколізу після активації, перш за все Th17 [106], Th1 і Th2-клітин, а також активованих ефекторних CD8⁺ Т-лімфоцитів [107]. Підвищення активності mTOR корелює з підсиленням гліколізу та генерацією периферичних Т-регуляторних клітин (pTreg), але негативно відображається на їх довгостроковому виживанні [108]. Посилення гліколізу тому можна вважати ознакою метаболічних змін в імунocyтах, що піддаються швидкій активації, наприклад, у відповідь на стимуляцію ПРР, рецепторів цитокінів або ТКР (Т-клітинний рецептор), що дозволяє імунocyту надати достатньо АТФ для виконання конкретних ефекторних функцій.

В наш час уже існує деяке молекулярне розуміння тих сигнальних шляхів, які ініціюють гліколіз під час активації імунних клітин. Наприклад, ЛПС викликають активацію індукцйбельного гіпоксією фактора 1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha – HIF1 α), транскрипційного фактора, який вкрай важливий для індукції декількох ферментів, залучених в гліколіз [109]. Ядерний фактор κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – NF κ B)

впливає на активацію вкрай важливого для регулювання гліколізу фермента фосфофруктокінази 2 (Phosphofructokinase 2 – PFK2) [103]. ЛПС можуть також швидко викликати гліколіз в ДК через активацію кінази ТВК1 та/або інгібітор кінази NFκB ε (ІККε) і гексокіназу 2 [110]. Ключовий механізм для підсилення гліколізу в ЛПС-активованих макрофагах – індукція ізофермента піруваткінази M2 (PKM2) [111]. Використання інгібіторів гліколізу (2-Deoxy-D-glucose) сприяє перепрограмуванню Th17 в Treg клітини [15]. Ці дослідження підкреслюють зв'язок між метаболізмом і фенотипом лімфоцитів. Другий цікавий аспект індукції гліколізу в активованих імунітах – роль гліколітичного ферменту гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH). В Th1-клітинах було показано, що GAPDH зв'язується з мРНК, котрий кодує один із основних Th1-залежних ефекторних цитокінів interferon-γ (IFNγ) [112], пригнічуючи його трансляцію. Як тільки гліколіз активовано – GAPDH відділяється від мРНК IFNγ, дозволяючи йому транслюватися. В макрофагах інший гліколітичний фермент, гексокіназа 1 (hexokinase 1), здатний взаємодіяти з NLRP3-інфламасомою, викликаючи її активацію й індукцію запалення [113].

На відміну від гліколізу, цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса) – самий ефективний спосіб продукції АТФ, який найбільш активно використовується в клітинах, що заходяться в стані спокою або непроліферуючих клітинах. Не дивлячись на те, що цикл Кребса повністю функціональний у більшій частині Т-лімфоцитів, більш активно його використовують CD8⁺-Т-лімфоцити пам'яті [114], а ефекторні Т-клітини більш тяжіють, як показано вище, до гліколізу. Найбільш вивчено вплив цього шляху на диференціювання 2 підтипів макрофагів. В макрофагах M2 цикл трикарбонових кислот активний, тоді як в M1 пошкоджений в двох місцях – після цитрату та після сукцинату [115]. При цьому надлишкове накопичення цитрату сприяє продукції оксиду азоту, простагландинів і ітаконової кислоти, що спричиняє прямі бактерицидні ефекти на такі мікроорганізми як *Salmonella enterica subsp., enterica serovar Typhimurium* і *Mycobacterium tuberculosis* [116].

Два основних результати пентозофосфатного шляху (ПФ) – вироблення нуклеотидів (інтенсивно використовується клітинами, що активно проліферуються), і продукція NADPH, використаного для генерації АКР (активних кисневих радикалів) макрофагами та нейтрофілами. ДК також активно використовують NADPH, що необхідно для їх активації та секреції цитокінів [117]. Індукція ПФ шляху спостерігається в ЛПС-активованих макрофагах [109], а ключовий фермент для поляризації макрофагів – CARKL (carbohydrate kinase-like protein) [118]. Цей фермент обмежує потік через ПФ шлях і високо активний в M2-макрофагах. Якщо CARKL пригнічений, макрофаги набувають M1-подібний фенотип.

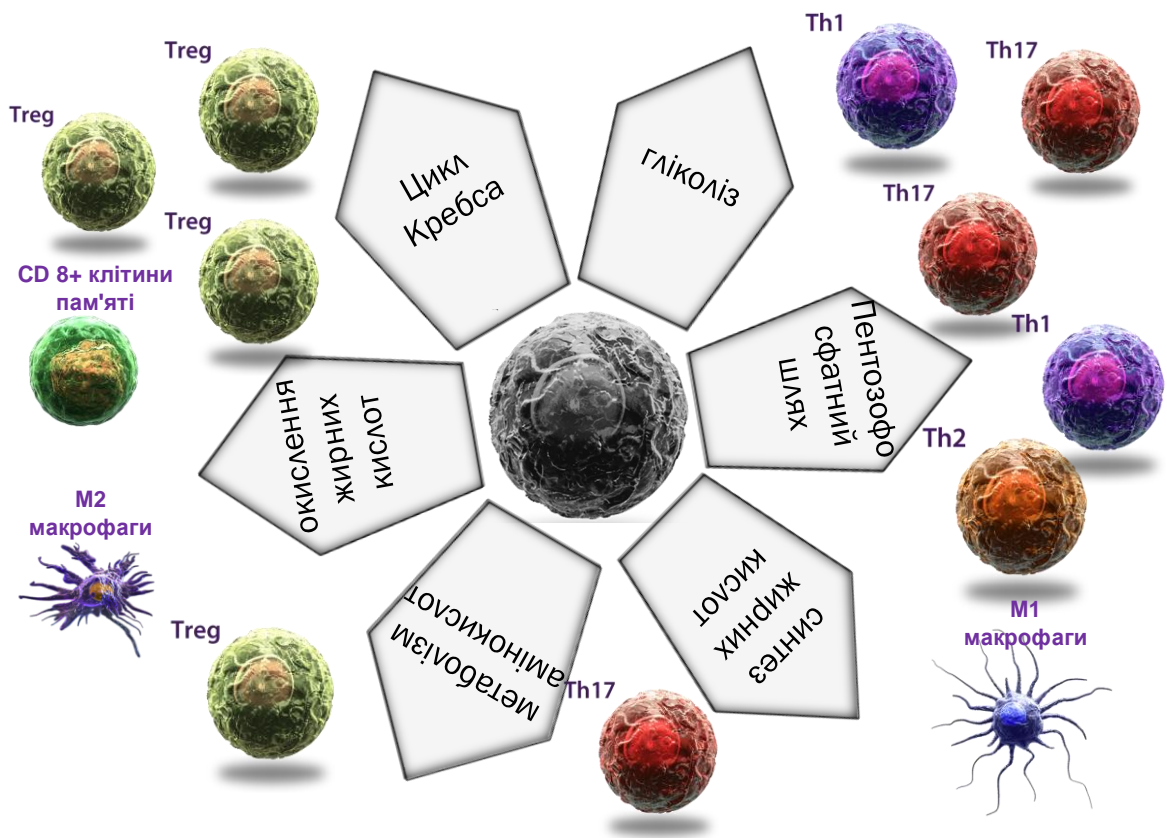


Рис. 1.1 Метаболізм різних типів імунних клітин.

В результаті метаболічного шляху окислення жирних кислот (ОЖК) утворюються численні продукти, які клітина може в подальшому використовувати для продукції енергії, включаючи ацетил-CoA, NADH і FADH₂. ОЖК – один із ключових шляхів регуляції адаптивних та вроджених

імунних реакцій. На відміну від гліколізу, що часто використовується ефекторними та клітинами, які швидко проліферуються, ОЖК спостерігається в багатьох імунocyтах, котрі не є прозапальними за своєю природою та демонструють збільшену тривалість життя, включаючи макрофаги M2, Treg-клітини та Т-клітини пам'яті. Так, посилення ОЖК відмічається в Treg-лімфоцитах і знижено в ефекторних Th1, Th2 і Th17-клітинах [15]. Наступні роботи показали, що в Treg підсилена експресія генів, залучених в окислення жирних кислот, включаючи *Cpt1a* (carnitine palmitoyl transferase I), в порівнянні з Th17-лімфоцитами [119]. Цікаво, що ефекторні Т-лімфоцити демонструють зниження активності ОЖК під час активації [120]. ОЖК відіграє важливу роль і в генерації тривало живучих CD8⁺ Т-клітин пам'яті. Стимуляція CD8⁺ Т-клітин пам'яті з IL15 підсилює в них експресію гена *Cpt1a* і ОЖК, що призводить до збільшення виживання даної популяції [121].

Метаболічний шлях синтезу жирних кислот (СЖК) дозволяє клітинам виробляти ліпіди, які необхідні для клітинного росту та швидкої проліферації. Реалізація цього шляху тісно пов'язана з mTOR-сигналізацією, яка сприяє СЖК посередництвом регулювання багатьох ключових ферментів, відповідальних за *de novo* синтез ліпідів, включаючи SREBP (Sterol regulatory element-binding proteins), FASN (Fatty acid synthase) і ACC (Acetyl-CoA carboxylase). На відміну від окислення жирних кислот, СЖК сприяє генерації прозапальних субпопуляцій імунних клітин, активує вроджені та адаптивні імунні реакції. Декілька досліджень показали, що ЛПС і цитокіни ініціюють збільшення СЖК в макрофагах [122, 123]. СЖК забезпечує зв'язок між вродженим й адаптивним імунітетом через регулювання функцій ДК. Так, TLR-опосередкована активація ДК супроводжується збільшенням СЖК. Цей метаболічний шлях також ключовий для проліферації Т- і В-лімфоцитів після їх активації через антигенні рецептори [124]. Недавня робота продемонструвала, що Т-специфічна делеція ацетил-СоА карбоксилази 1 (ACC1) – обмежувачого СЖК ферменту – приводить до зменшення числа антиген-специфічних CD8⁺- Т-лімфоцитів [125]. Баланс ефекторних і Т-регуляторних клітин також частково залежить від СЖК.

Фармакологічне або генетичне пригнічення ACC1 у CD4⁺-Т-лімфоцитах показало, що СЖК необхідний для диференціювання Th17, але не для функцій Treg [126].

Метаболізм амінокислот залежить перш за все від mTOR-сигналізації. Окремі амінокислоти відіграють важливу роль в імунометаболізмі лімфоцитів. Наприклад, глютамін і аргінін необхідні для активації Т- і В-лімфоцитів [127]. Метаболізм глютаміну також, ймовірно, регулює баланс між ефекторними і Treg-клітинами, так як генетичний нокаут білка транспортера ASCT2 (який відповідальний за поглинання глютаміну в Т-лімфоцитах) призводить до порушення генерації і функцій Th1 і Th17, зниження експресії mTORC1, але не впливає на Treg [128]. Метаболізм аргініну відіграє ведучу роль в регуляції фенотипу M1- і M2-макрофагів [129], а триптофан необхідний для проліферації Т-лімфоцитів [130].

Таким чином, різні типи імунних клітин віддають перевагу різним шляхам метаболізму (див. рис. 1.1). Ефекторні Th1-, Th2-, Th17-клітини і M1-макрофаги використовують переважно гліколіз, ПФШ і СЖК, тоді як Т-регуляторні, CD8⁺-клітини пам'яті та M2-макрофаги – цикл трикарбонових кислот і ОЖК. Зміни в метаболізмі різноманітних амінокислот можуть впливати на генерацію як ефекторних, так і Treg-лімфоцитів.

Лімфоцити чутливо реагують на зміни метаболізму. В якості таких основних лімфоцитарних сенсорів імунометаболізму можна виділити: кіназу mTOR, що сприймає сигнали від амінокислот, ростових факторів та ін., і є одним із центральних регуляторів проліферації та виживання лімфоцитів; ключовий сенсор глюкози та регулятор енергетичного балансу клітин АМФ-активуєма протеїнкіназа (АМРК); рецептори, активуємі пероксисомними проліфераторами PPAR γ , ендогенними лігандами яких є вільні жирні кислоти і ейкозаноїди; патерн-розпізнаючі рецептори вродженого імунітету (TLR, NLR, RLR та ін.), що активуються не тільки мікробними лігандами, але і цілим рядом ендогенних паттернів пошкодження, таких як HSP70, HMGB1; сенсори позаклітинної АТФ пуринергічні рецептори P2XR; сенсори ксенобіотиків арил-

гідрокарбонові рецептори (AHR); рецептори коротколанцюгових жирних кислот FFAR2, лігандами для яких є такі мікробні метаболіти як бутират, ацетат и пропіонат (рис. 1.2).



Рис. 1.2 Лімфоцит як сенсор змін метаболізму. Умовні позначення: mTOR – мішень рапаміцину, AMPK – АМФ-активуєма протеїнкіназа, PPAR γ -рецептори, активуємі пероксисомними проліфераторами, Glut 1 – транспортери глюкози 1 типу, P2XR – пуринергічні рецептори, FFAR2 – рецептори коротколанцюгових жирних кислот, AHR – арил-гідрокарбонові рецептори, PRR – образ-розпізнаючі рецептори вродженого імунитету, PAMP – патоген-асоційовані молекулярні паттерни, DAMP – молекулярні паттерни, асоційовані з ушкодженням.

Метаболічні зміни, що розвиваються в умовах ЦД, перш за все гіперглікемія, здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів [6]. Т-клітини експресують низку транспортерів глюкози, основним з яких є

Glut 1 [9]. Продіабетогенні Th1 і Th17-клітини, що викликають інсуліт, характеризуються високим рівнем експресії Glut 1 і схильністю до гліколізу [12]. У супресорних Treg, навпаки, низький рівень експресії Glut 1 і висока швидкість окислювального метаболізму [14]. Імунні порушення призводять до розвитку ЦД 1 типу, а гіперглікемія, що при цьому розвивається, підсилює автоімунну атаку, призводячи до формування “порочного” кола. В свою чергу, важливим регулятором імунометаболізму лімфоцитів є протеїнкіназа mTOR, яка існує як субодиниця внутрішньоклітинних мультимолекулярних сигнальних комплексів mTORC1 і mTORC2 [131]. У складі цих комплексів mTOR є «провідником» як внутрішньоклітинних так і позаклітинних сигналів і служить одним з центральних регуляторів метаболізму, росту, проліферації та виживання лімфоцитів та інших клітин [16], а одним із її блокаторів є метформін, який діє через АМПК (AMP-activated protein kinase) [19]. Висока активність mTOR здатна посилювати прогресію діабету через активацію ефекторних прозапальних субпопуляцій лімфоцитів [22] і, навпаки, низька активність сприяє диференціюванню Treg [23], блокуючих інсуліт. Тим не менш, в літературі майже відсутні дані про характер змін імунометаболізму лімфоцитів ПЛВ в умовах діабету.

1.4. Роль жирової тканини в прогресії діабету

Картина патогенезу ЦД свідчить про активну участь імунних механізмів в порушенні ендокринної функції панкреатичних острівців [132, 133]. В свою чергу, в останні роки з’являється все більше даних про роль жирової тканини в організмі як одного з регуляторів активності функціонування імунної системи [41, 46]. Жирова тканина є не тільки важливим метаболічним регулятором і ендокринним органом, що синтезує більше 30 білків – “адипокінів”, але і органом імунної системи [134, 135], дисрегуляція якого призводить до морфологічної перебудови – “ремоделювання” адипоцитів, розвитку запалення жирової тканини, та є невід’ємним компонентом в прогресуванні багатьох

захворювань, в тому числі і ЦД [136]. Відомо, що жирова тканина може містити цілі кластери клітин вродженої та адаптивної імунної системи, такі як макрофаги, дендритні клітини, NK- і NKT-лімфоцити, цитотоксичні лімфоцити, T-регуляторні Treg, різноманітні субпопуляції T-хелперів – Th1, Th2, Th17, які інфільтрують адипоцити [137, 138]. Від балансу цих клітин залежить рівень прозапальної сигналізації в жировій тканині та продукція таких цитокінів як IL1 β , IL6, IL17, IL18, TNF α , IFN γ , здатних безпосередньо впливати на прогресію інсуліту [139]. Проте, включення адаптивної імунної системи залежить від рівня сигналізації через PPP спадкової, зокрема толл-подібні рецептори TLR2 і TLR4 [140]. Лігандами TLR2 є ліпопротеїди, ліпотейхоєві кислоти, пептидоглікан, ліпоарабіноманнан, зімозан, хітин практично всіх мікроорганізмів, TLR4 –ЛПС грам-негативних бактерій [141]. Крім того, діабет супроводжується цілою низкою метаболічних порушень, а природніми лігандами TLR-4, здатними їх активувати, є насичені жирні кислоти [142]. В ряді досліджень була показана здатність адипоцитів людини та гризунів експресувати практично весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів, від TLR-1 до TLR-9 [42, 143]. Із них найбільш детально досліджені TLR-2 і TLR-4, представлені в жировій тканині в суттєво більших кількостях в порівнянні з іншими TLRs [144]. Існуючі експериментальні роботи стосуються в основному ролі TLR4 в патогенезі ЦД 2 типу. Так, отримано цілий ряд доказів того, що TLR4 є привабливим кандидатом для зв'язку вроджених імунних реакцій та резистентності до інсуліну: по перше, експресія TLR4 підвищується в адипоцитах при ожирінні [145], по друге, TLR4 – нокаутні миші захищені від викликаного ожирінням інсулінорезистентності [146], по третє, делеція TLR4 в гематопоетичних клітинах покращує індуковану високожировою дієтою резистентність жирової тканини до інсуліну [147]; по четверте, насичені жирні кислоти активують NF-kB в макрофагах жирової тканини TLR4-залежним шляхом [144]. У мишей з цукровим діабетом рівень TLR4 підвищений, а стимуляція ЛПС веде до надмірної активації секреції запальних цитокінів і зниження утворення протизапального цитокіна IL-10 [144]. У хворих на ЦД 2

типу на 76 % підвищений рівень циркулюючих ЛПС, жирова тканина достовірно більше експресує TLR-2, MyD88, NF- κ B, а ЛПС в ізольованих адипоцитах, отриманих із підшкірно-жирової клітковини людей з ЦД 2 типу, в більшій мірі стимулювала експресію TLR-2, TRAF6, NF- κ B в порівнянні з адипоцитами здорових людей [148]. Одноразове введення інсуліну хворим ЦД-2 знижувало експресію мРНК TLR-1, -2, -4, -7 і -9 [148] в моноклеарних клітинах крові. Koenen T. et al. (2011) показали, що вісцеральна жирова тканина (ВЖТ) володіє більш вираженим прозапальним потенціалом в порівнянні з підшкірною (ПЖТ) [149]. Зокрема, процент CD8⁺-Т-лімфоцитів в ВЖТ був значно вищий, ніж в ПЖТ (41,6 проти 30,4 %, $p < 0,05$). Адипоцити ВЖТ характеризувалися більш високою продукцією IL-1 β (у 10 раз, $p < 0,05$), IL-18 (у 3 рази, $p < 0,05$), IL-6 і IL-8 (у 3 і у 4 рази відповідно, $p < 0,05$) у порівнянні з ПЖТ [149]. І нарешті, активність каспази-1 в адипоцитах ВЖТ була у 3 рази вище, що створює умови для активації інфламмасоми та пояснює більш високу “схильність” ВЖТ до розвитку запалення [149]. В свою чергу, контроль рівня глікемії у хворих на ЦД 1 типу призводить до зміни співвідношення ВЖТ до ПЖТ [150]. Так, якщо без лікування це співвідношення складало $0,29 \pm 0,15$ ($p < 0,05$), то нормалізація рівня глюкози призводила до зміни даного індексу до $0,36 \pm 0,18$ ($p < 0,05$) [150]. Загалом, ЖТ може створювати суттєвий прозапальний “фон” в умовах ЦД, особливо це стосується ПЖТ.

Таким чином, проведений аналіз даних наукової літератури вказує на доцільність більш глибокого вивчення ролі ПЛВ і ПЖТ в патогенезі цукрового діабету. Залишається не з’ясованими вплив метформіну на перебіг ЕСЦД і функціональний стан лімфоцитів ПЛВ і адипоцитів ПЖТ. Загалом, невирішеність цих питань і зумовила актуальність даної роботи.

Матеріали, викладені в даному розділі, оприлюднені у наукових працях автора: [151].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини

Дослідження проведені на 100 самцях щурів лінії Вістар масою 110–150 г, віком 2–3 місяці, отриманих з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Щури перебували в умовах природного освітлення при вільному доступі до води та їжі. Акліматизація (карантин) – 7 днів перед початком дослідження. Комісія з біомедичної етики ДУ «Запорізький державний медичний університет» (№ 1 від 15 січня 2018 р.) встановила, що дослідження проведені з дотриманням основних положень «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених указом МОЗ України №753 від 12 серпня 1997р., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових задач (Strasbourg, 18.III.1986), Указу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. «Про заходи по подальшому удосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин» і Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Об'єктом дослідження у експериментальних тварин були панкреатичні лімфатичні вузли, парапанкреатична жирова тканина та периферична кров.

2.2. Групи експериментальних досліджень

Експериментальні тварини були розподілені на п'ять експериментальних груп по 20 щурів (табл. 2.1). Група 1 – контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН=4,5); група 2 – щури з 3-х тижневим експериментальним стрептозотонин-індукованим цукровим діабетом (ЕСЦД); група 3 – щури з 5-ти тижневим ЕСЦД; група

4 – щури з 3-х тижневим ЕСІЦД, яким в/ш щоденно на протязі 3-х тижнів вводили метформін в дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету; група 5 – щури з 5-ти тижневим ЕСІЦД, яким в/ш щоденно на протязі 5-ти тижнів вводили метформін в дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету.

Таблиця 2.1

Розподіл щурів в експериментальних серіях

Серії досліджень	Кількість тварин
1. Контрольні щури	20
2. Щури з 3-х тижневим ЕСІЦД	20
3. Щури з 5-ти тижневим ЕСІЦД	20
4. Щури з 3-х тижневим ЕСІЦД+метформін	20
5. Щури з 5-ти тижневим ЕСІЦД+метформін	20
Всього тварин	100

2.3. Експериментальні моделі

2.3.1. Моделювання експериментального стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету.

Для індукції ЕСІЦД стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг, розчиненого в 0,5 мл 0,1 М цитратному буфері (рН=4,5) перед самим моментом введення. Час, що минув з дня введення препарату, в подальшому викладенні матеріалу інтерпретувався як тривалість перебігу діабету. Визначення концентрації глюкози в крові, яку брали з хвостової вени, проводили глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу «BIONIMERightest™GM 110» (Швейцарія) на 1, 3, 7, 14, 21 і 35 добу після ін'єкції стрептозоточину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 21 та 35 добу після введення STZ тварин виводили з експерименту методом одномоментної

декапітації під наркозом (етамінал натрію 40 мг / кг внутрішньочеревно). Вилучали ПЛВ і ділянки парапанкреатичної жирової клітковини (ПЖК), які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена і після промивки заливали в парапласт.

Селективність дії STZ на β -клітини обумовлена наявністю у складі його молекули глюкози, завдяки якій він зв'язується з переносником глюкози GLUT-2 і транспортується в цитоплазму клітини. Чутливість клітин до STZ залежить від експресії GLUT-2, які у більшості тварин експресуються тільки β -клітинами панкреатичних острівців [152]. STZ руйнує бета-клітини за рахунок різноманітних механізмів – як NO-залежних з подальшим перетворенням оксиду азоту в пероксинітрит і активацією процесів вільно-радикального окислення, так і шляхом прямого метилування залишків гуаніна й аденіна в ДНК з подальшою активацією ферменту репарації полі АДФ-рибозо полімерази (ПАРП). Даний процес репарації енергозалежний і при великій кількості мутацій призводить до виснаження вмісту НАД (Нікотинамідаденіндинуклеотид) і некрозу клітини [153].

За гормонально-метаболічними змінами стрептозотоцин-індукований діабет у щурів багато в чому подібний до ЦД 1 типу у людини (інсулінзалежний цукровий діабет). Як показано в багатьох дослідженнях [154, 155], моделювання діабету вищеописаним способом приводило до поступового розвитку у щурів симптомів, супроводжуваних розвитком ЦД 1 типу у людини: зниження ваги, поліфагію, полідипсію. У підшлунковій залозі щурів спостерігалися ознаки деструкції панкреатичних острівців і загибелі β -клітин, початкові ознаки якої можна було спостерігати вже до кінця 2-го тижня перебігу патологічного процесу, а на кінець 5-го тижня ці зміни були добре виражені. В результаті розвитку патологічного процесу в периферичній крові щурів з цукровим діабетом розвивалися гіпоінсулінемія і гіперглікемія, порушувався тест толерантності до глюкози за діабетичним типом [156].

2.3.2. Корекція експериментального стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету метформіном.

Для фармакологічної корекції нами використовувався метформін (АТ ТЕВА КУТНО, Польща), який вводили щурам внутрішньошлунково (в/ш) в дозі 50 мг/кг. Щурам з 3-х тижневим ЕСЦД на протязі 3-х тижнів щоденно, починаючи з 1 дня індукції діабету; щурам з 5-ти тижневим ЕСЦД на протязі 5-ти тижнів щоденно, починаючи з 1 дня індукції діабету.

Вибір доз для введення визначали на підставі експериментальних даних, наведених в літературі по дослідженню вищевказаного препарату у щурів [157, 158]. Як експерименти без вживання препаратів, так і експерименти із застосуванням препаратів проведені в абсолютно однакових, стандартизованих умовах з використанням перерахованих методик.

Метформіну гідрохлорид є протидіабетичним лікарським засобом групи похідних бігуанідів, котрі знижують концентрацію глюкози натще та після їжі. Не стимулює виділення інсуліну, тому не викликає гіпоглікемії.

Метформіну гідрохлорид має три механізми протидіабетичної дії:

1. Зменшує вироблення глюкози у печінці шляхом гальмування глікогеногенезу та глікогенолізу;
2. Підвищує у м'язах чутливість до інсуліну, посилюючи захоплення і потребу у глюкозі периферійних тканин;
3. Знижує абсорбцію глюкози у кишковому тракті.

Сучасні дослідження свідчать про здатність метформіну пригнічувати експресію TLR4 та його адаптерного білка MyD88 в кардіоміоцитах, знижувати продукцію TLR-залежних прозапальних цитокінів TNF α і IL-6 [159]. Була встановлена здатність метформіну пригнічувати активність NF- κ B і продукцію IL-1 β , IL-6 і IL-8 ендотеліальними клітинами людини [160]. Andrews M. et.al. (2012) продемонстрували здатність метформіну знижувати рівні мРНК TNF- α і TLR 2/4 в моноцитах периферичної крові у хворих з ЦД 2 типу [161]. Проте, значно більший інтерес представляє нещодавно відкрита

здатність метформіну через АМФК впливати на активність ключового регулятора клітинного метаболізму, росту, проліферації та виживання клітин mTOR (mammalian target of rapamycin) [162], і таким чином кардинально змінювати імунометаболізм лімфоцитів.

2.4. Методи імунофлюоресцентного дослідження

2.4.1. Дослідження експресії TLR2 і TLR4 рецепторів за допомогою реакції прямої імунофлюоресценції у панкреатичних лімфатичних вузлах та парапанкреатичній жировій тканині.

Для дослідження TLR2 і TLR4 у гістологічних зрізах ПЛВ застосовували прямий імунофлюоресцентний метод. Структуру популяції імунопозитивних клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. У експериментальних тварин в останній день досліджень, після одномоментної декапітації під наркозом вилучають ПЛВ і ділянки ПЖТ від кожної тварини і поміщають в фіксатор Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після 2-годинного відмивання фіксатора в проточній холодній воді зразки проводять в висхідних концентраціях етанолу 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %-1, 100 %-2, розчинах етанол 100 % + хлороформ 2:1, етанол 100 % + хлороформ 1:1, етанол 100 % + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ($t = + 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), на 1 годину поміщають в рідкий парапласт ($t = + 56\text{ }^{\circ}\text{C}$) і потім укладають в парапластові блоки. Для проведення наступного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) роблять 5-мікронні серійні зрізи ПЛВ і ПЖТ, які потім депарафінують в ксилолі, проводять регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивають у 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4) і інкубують з моноклональними антитілами до TLR2 (див. табл. 2.2) або TLR4 щура, які кон'юговані з флюоресцентним ізотіюціонатом (FITC) впродовж 18 годин у вологій камері ($t = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (табл. 2.2). Після інкубації зрізи тричі по 10 хвилин

промивають у 0,1 М фосфатному буфері (рН=7,4), наносять на зрізи суміш гліцерин / фосфатний буфер у співвідношенні 1:9 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчають за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Зображення, що отримуються на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводять в комп'ютер. В автоматичному режимі визначають області зі статистично значущою флюоресценцією. Основними морфометричними характеристиками клітин були їх площа (AREA), периметр (PERIM), максимальний (Major) і мінімальний (Minor) еліптичні діаметри. Додатковими морфометричними характеристиками клітин були циркулярність (Circularity) та округлість (Roundness). Циркулярність обчислювалась за формулою $Circularity=4\pi*AREA/PERIM^2$. Її значення було рівне 1 для ідеально круглих об'єктів і наближалось до 0 для максимально витягнутих. Округлість обчислювалась як відношення площі до максимального діаметра: $Roundness = 4*Area/\pi*(Major\ axis)^2$. Щільність рецепторів визначали враховуючи інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічну флюоресценцію препарату (так званий «фон»). На підставі цих показників обчислювалась коректована клітинна флюоресценція (в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції $UO_{I\Phi}$): Integrated Density (інтегрована щільність) – (площа виділених клітин * середню флюоресценцію фона). В результаті класифікаційного аналізу ідентифікували імунопозитивні лімфобласти площею (Area) $\geq 30,0$ μm^2 ; середні лімфоцити $16,0 > \text{Area} > 11,0$ μm^2 ; малі лімфоцити $11,0 > \text{Area} > 5,0$ μm^2 . Це дозволило обчислити абсолютну (кількість клітин на 1 mm^2 площі тканини) і відносну (%) щільність розподілу імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах ПЛВ. При інкубації з моноклональними антитілами досліджували TLR2⁺-, TLR4⁺-клітини, розташовані в паракортикальній зоні і м'якотних тяжках ПЛВ.

Також на підставі класифікаційного математичного аналізу всі адипоцити були розділені на великі, середні і малі, які відрізняються площею, периметром та циркулярністю.

Таблиця 2.2

Антитіла використані в імунофлюоресцентному дослідженні

Специфічність	Клон	Ізотип	Кон'югат	Виробник (номер за каталогом)
TLR2	6C2	Rat IgG2b	FITC	Hycult Biotech, Netherlands, HM1047F
TLR4	MTS 510	Rat IgG2a	FITC	Hycult Biotech, Netherlands, HM1029F
NOD2	H-300	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-30199
RIGI	H-300	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-98911
T-bet	H-210	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-21003
mTor	C-19	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-1550-R
ROR γ t	H-190	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-28559
Foxp3	150D/ E4	Mouse IgG ₁ *	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-130666
Anti-rabbit	—	Mouse IgG	FITC	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-2359
Anti-mouse	—	Rabbit IgG	FITC	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-358916

Примітка. (*) — антитіла можуть бути використані у щурів.

2.4.2. Дослідження розподілу NOD2⁺, RIGI⁺, T-bet⁺, mTor⁺, RORγt⁺ і Foxp3⁺ лімфоцитів за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції у ПЛВ .

Для ідентифікації NOD2, RIGI, T-bet, mTor, RORγt і Foxp3 у гістологічних зрізах ПЛВ застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод. Структуру популяції імунопозитивних клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. У експериментальних тварин в останній день досліджень, після одномоментної декапітації під наркозом вилучають ПЛВ від кожної тварини і поміщають в фіксатор Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після 2-годинного відмивання фіксатора в проточній холодній воді зразки проводять в висхідних концентраціях етанолу 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %-1, 100 %-2, розчинах етанол 100 % + хлороформ 2:1, етанол 100 % + хлороформ 1:1, етанол 100 % + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 (t = + 37 °C), на 1 годину поміщають в рідкий парапласт (t = +56 °C) і потім укладають в парапластові блоки. Для проведення наступного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) роблять 5-мікронні серійні зрізи ПЛВ які потім депарафінують в ксилолі, проводять регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивають у 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4) і інкубують з поліклональними антитілами до Foxp3, NOD2, RIGI, T-bet, mTor і RORγt впродовж 18 годин у вологій камері (t = + 4 °C) (див. табл. 2.2). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубують 60 хвилин у вологій камері (t = +37 °C) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. В якості вторинних антитіл використовують антитіла до повної молекули IgG кролика або миші, кон'юговані з FITC. Після інкубації зрізи тричі по 10 хвилин промивають у 0,1 М фосфатному буфері (pH=7,4), наносять на зрізи суміш гліцерин / фосфатний буфер у співвідношенні 1:9 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчають за допомогою комп'ютерної

програми ImageJ (NIH, США). Зображення, що отримуються на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводять в комп'ютер. Подальше вивчення зображення здійснюють за методикою, аналогічною описаній в пункті 2.5.1. При інкубації з антитілами досліджують NOD2⁻, RIGI⁺, T-bet⁺, mTor⁺, RORγt⁺ і Foxp3⁺-клітини, розташовані у паракортикальній зоні і м'якотних тяжках ПЛВ. Для додаткової візуалізації mTor⁺-клітин в ПЛВ ми також ставили імуногістохімічну реакцію з вторинними кролячими антитілами ImmunoCruz™ Staining system (Santa Cruz Biotechnology, США), кон'югованими з пероксидазою хрому.

2.5. Методи молекулярно-генетичного дослідження

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження у експериментальних тварин були ПЛВ та ПЖТ, які були залиті у парафінові блоки після стандартної гістологічної підготовки. Молекулярно-генетичне дослідження проведено на архівному матеріалі віком 3 роки. Дослідження включало декілька етапів.

2.5.1. Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін.

1. Проводять гомогенізацію зразка видаленого з парафінового блоку з 1 мл 100 % ксилолу за допомогою ступки і товкачика. Переносять гомогенат в пробірку типу «Eppendorf» (Axugen, США) і інкубують протягом 5 хв. Перемішують на вортексі і короткочасно (протягом 1 хв) центрифугують для осадження тканини. Видаляють ксилол не порушуючи осаду.

2. Додають 1 мл 100 % ксилолу і інкубують протягом 5 хв. Перемішують на вортексі і нагрівають зразок протягом 3 хв при $T = + 50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, щоб розплавити парафін. Центрифугують зразок протягом 2 хв при кімнатній температурі при максимальній швидкості для осадження тканини. Видаляють ксилол, не порушуючи осаду. Якщо осад нещільний, залишають деяку кількість ксилолу в пробірці, щоб уникнути видалення шматочків тканини.

3. Додають 1 мл 100 % етанолу на зразок протягом 5 хв і перемішують на вортексі. Центрифугують 2 хв при максимальній швидкості для осадження тканини. Етанол буде містити слідові кількості ксилолу і, відповідно, його необхідно акуратно видалити не порушуючи осаду.

4. Додають 1 мл 96 % етанолу на зразок і інкубують протягом 5 хв, перемішують на вортексі. Центрифугують зразок впродовж 2 хв при максимальній швидкості (14000-16000 об / хв) для осадження тканини. Акуратно видаляють супернатант не порушуючи осаду.

5. Додають 1мл 70 % етанолу на зразок і інкубують протягом 5 хв, перемішують на вортексі. Центрифугують зразок протягом 1-2 хв при максимальній швидкості (14000-16000 об / хв) для осадження тканини. Акуратно видаляють супернатант не порушуючи осаду. Висушують на повітрі осад протягом 15-30 хв для видалення залишку етанолу.

2.5.2. Виділення тотальної РНК.

Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («ИЗОГЕН», РФ), який містить наступні реагенти: Trizol reagent та ExtraGene E. РНК виділяють відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1. В пробірки загальним об'ємом 1,5 мл вносять по 100 мкл подрібненої тканини, що досліджується, додають 1 мл Trizol reagent та інтенсивно

перемішують вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкують пробірки при $t = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв.

2. Додають в пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішують вміст пробірок. Пробірки інкують при $t = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв.

3. Центрифугують («СМ-50», Латвія) пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об / хв для розділення фаз. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносять в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл намагаючись не задіти пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

4. Додають в пробірки рівний об'єм ізопропанолу, приблизно 600 мкл.

5. Інтенсивно перемішують вміст пробірок та переносять пробірки в морозильну камеру («LG», Корея) при $t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ на 30 хв.

6. Центрифугують пробірки з сумішшю 15 хв при 14000 об/хв. Повністю видаляють супернатант перевертанням пробірки. Видалення супернатанту відсмоктуванням пов'язано з ризиком втратити осад РНК.

7. Додають в пробірку 1 мл холодного 75 % етилового спирту, перемішують вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугують пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об / хв та обережно видаляють супернатант перевертанням пробірки.

8. Просушують осад при $T = +65\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 3 хв.

9. Додають в пробірки 50-100 мкл реагенту ExtraGene E.

10. Суспендують вміст на вортексі 15-20 с та залишають при кімнатній температурі на 15-20 хв. Потім ще раз суспендують вміст пробірок на вортексі.

2.5.3. Зворотна транскрипція (виділення кДНК)

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували «Набор реагентів для проведення обратной транскрипции (ОТ)» («СИНТОЛ», РФ).

Підготовку та проведення реакції проводили відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1. Готують наступну реакційну суміш в пробірці на льоду: тотальна РНК (2 мкл); Random-6 праймер (1 мкл); деіонізована вода очищена від нуклеаз (11 мкл). Загальний об'єм – 14 мкл. Обережно перемішують.

2. В пробірку додають наступні компоненти в зазначеному порядку: реакційна суміш 2,5x (10 мкл); зворотня транскриптаза MMLV-RT (1 мкл). Загальний об'єм – 25 мкл. Обережно перемішують і центрифугують.

3. Інкують суміш при $T = + 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 45 хв.

4. Зупиняють реакцію прогріванням при $T = + 92\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв. Переносять пробірки на лід.

2.5.4. Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі з використанням набору Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США) за таких умов: ініціююча денатурація $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 10 хв; далі 50 циклів: денатурація – $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15сек., віджиг праймерів – $58\text{-}62\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 сек., елонгація – $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 сек. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу по каналу SybrGreen.

Приготування реакційної суміші проводили відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1. Додають на одну пробірку при кімнатній температурі: 2-кратний Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) – 12,5 мкл; суміш праймерів (прямий і зворотній) по 0,3 мкМ кожного.

2. Ретельно перемішують суміш і розподіляють відповідні обсяги в пробірки для ПЛР.

3. Додають кДНК (≤ 500 нг / реакція). Об'єм доводять до 25 мкл деіонізованою водою.

4. Ретельно перемішують реакційну суміш без утворення бульбашок (не використовувати вортекс). Центрифугують короткочасно, якщо необхідно. Бульбашки будуть заважати детекції флуоресценції.

5. Розміщують зразки в ампліфікаторі й запускають програму.

Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIH, США) та виготовлені фірмами Metabion (Німеччина) і ThermoScientific (США) (табл. 2.3). В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний Ct метод ($\Delta\Delta$ Ct метод). Розрахунки проводили за формулами: Δ Ct (гена-мішені) = Ct (гена-мішені) – Ct (гена-калібратора / ACT1); $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (гена-мішені) – Δ Ct (базисного гена). Відносний рівень експресії виражали в $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Підібрано оптимальні умови ЗТ-ПЛР для досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР. Всі реакції ампліфікації повторювали три рази.

Специфічні праймери використані в ЗТ-ПЛР в режимі реального часу

Ген	Нуклеотидна послідовність праймера	T _{плл} , °C	Довжина продукту ПЛР, п. н.	Екзон-екзонний стик
<i>mTor</i>	F=TCTGGCCAAAAGACAGGTGG R=CTGTCCCAGGGTCCACAAAG	60 60	40	2577/2578
<i>Slc2a1</i> (Glut1)	F=CGTCGTTGGGATCCTTATTGC R=AGTCTAAGCCGAACACCTGG	59 59	41	724/725
<i>Prkaa1</i> (AMPK)	F=GGGAAAGTGAAGGTGGGCAA R=TATGTCCAGTCAACTCGTGCT	60 59	40	127/128
<i>Deaf1</i>	F=GCAGAGAGGAAGGAGCAGTC R=GTGCACTCACTCATGGCCT	60 60	59	1605/1606
<i>Aire</i>	F=GCCTAAAGCCAGTGATCCGA R=TCTCTACCCTGGGTTCCTTT	60 60	43	850/851
<i>IL-1β</i>	F=TCTTTGAAGAAGAGCCCGTCC R=GGTCGTCATCATCCCACGAG	60 60	48	354/ 355
<i>IL-17A</i>	F=CTGGACTCTGAGCCGCAATG R=TGCCTCCCAGATCACAGAAG	61 59	58	297/ 298
<i>Foxp3</i>	F=CGAGACTTGGAAGTCAGCCAC R=TCTGAGGCAGGCTGGATAACG	60 61	61	214/ 215
<i>GAPDH</i>	F=GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R=GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/826

Примітки: 1. F – прямий праймер;
2. R – зворотний праймер;
3. T_{плл} – температура плавлення.

2.7. Методи статистичних досліджень

Обробка отриманих даних та аналіз результатів дослідження проводився на персональному комп'ютері в операційному середовищі Windows XP за допомогою ліцензійного статистичного пакету «Statistica for Windows 6.0» (StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5). Отримані результати є у паперовій та електронній базах даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). При порівнянні даних використовували параметричний t-критерій Стюдента, після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. При перевірці статистичних гіпотез нульову гіпотезу відкидали при $p < 0,05$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager TM(Bio-Rad, США).

РОЗДІЛ 3

ЗМІНИ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ *GLUT1*, *MTOR*, *AMPK1A1* І РОЗПОДІЛУ *MTOR*⁺-КЛІТИН В ПЛВ В УМОВАХ РОЗВИТКУ ЕСІЦД ТА ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ ДІАБЕТИЧНИМ ТВАРИНАМ

Метаболічні зміни, які розвиваються в умовах ЦД здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів [6]. Т-клітини експресують низку транспортерів глюкози, основним із яких є *Glut 1* [9, 10]. Значний вплив на імунометаболізм лімфоцитів здійснює також протеїнкіназа *mTOR*, яка є одним із центральних регуляторів росту, проліферації та виживання лімфоцитів і інших клітин [16], а одним із її блокаторів є метформін, який діє через АМПК [18, 19].

З огляду на вище наведене, у представленій главі наведені результати досліджень рівня експресії мРНК генів *Glut 1*, *mTOR* і *AMPK1α*, а також особливостей розподілу *mTOR*⁺-клітин у ПЛВ щурів з ЕСІЦД і після введення метформіну. Виділення тотальної РНК проводили з допомогою „Trizol RNA Prep100” (Ізоген Lab., LTD, РФ); для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 "Синтол" (Росія). Для визначення рівня експресії мРНК генів *Glut 1*, *mTOR* і *AMPK1α* проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Відносний рівень експресії вищевказаних генів оцінювали за методом $\Delta\Delta C_t$, нормалізуючи за референс-геном *GAPDH*. Для ідентифікації *mTOR*⁺-клітин у зрізах ПЛВ проводили реакцію непрямої імунофлуоресценції з поліклональними кролячими антитілами (ПКАТ) до *mTor* (Santa Cruz Biotechnology, USA). Для додаткової візуалізації *mTOR*⁺-клітин в ПЛВ ми також ставили імуногістохімічну реакцію з вторинними кролячими антитілами ImmunoCruz™ Staining system (Santa Cruz Biotechnology, США), кон'югованими з пероксидазою хрому.

3.1. Дослідження експресії мРНК генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α*

Введення експериментальним тваринам стрептозотоцину призводило до розвитку патологічного процесу: так, на 3-й тиждень ЕСІЦД концентрація глюкози в крові у щурів лінії Вістар збільшувалася в 3,6 рази ($12,23 \pm 0,4$ ммоль/л, $p < 0,05$) порівняно з контролем ($3,37 \pm 0,08$ ммоль/л), а на 5-й тиждень зростала до $14,39 \pm 0,7$ ммоль/л. Спостерігалися полідипсія, гіперфагія та поліурія, тобто всі основні симптоми, характерні для ЦД 1 типу.

Гіперглікемія викликала транскрипційну індукцію гена транспортерів глюкози *Glut 1* в клітинах ПЛВ. Зокрема, розвиток діабету призводив до зростання вмісту мРНК *Glut 1* в 9,9 разів ($p < 0,05$) на 3-му тижні і в 28,9 разів ($p < 0,05$) на 5-му тижні патологічного процесу (рис. 3.1 А). Ці зміни супроводжувались збільшенням рівня мРНК протеїнкінази mTOR в 5,3 рази ($p < 0,05$) при 3-х тижневому і в 3,3 рази ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСІЦД (рис. 3.1 В) порівняно з контрольною групою щурів. Рівень відносної нормалізованої експресії гена *AMPK1 α* достовірно не змінювався (рис. 3.1 С)

Введення метформіну щурам з цукровим діабетом знижувало рівень глікемії (до $8,7 \pm 0,1$ ммоль/л на 3-й тиждень і до $7,6 \pm 0,1$ ммоль/л на 5-й тиждень, $p < 0,05$) і призводило до зростання рівня транскрипційної активності АМФ-активуємої протеїнкінази *AMPK1 β* в ПЛВ. Так, відносна нормалізована кількість мРНК гену *AMPK1 β* збільшувалась на 87 % ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та майже в 38 разів ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (рис. 3.2 А-В). Індукція *AMPK1 β* закономірно пригнічувала експресію mTOR: ми спостерігали зменшення рівня мРНК мішені рапаміцина в ПЛВ у 14,7 разів ($p < 0,05$) при 3-х тижневому та в 3 рази ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСІЦД (рис. 3.3 А-В) порівняно з контрольною групою щурів. Рівень відносної нормалізованої експресії гена *Glut 1* знижувався в 2 рази ($p < 0,05$) на 3-й тиждень і в 5,7 разів ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (рис. 3.4 А-В).

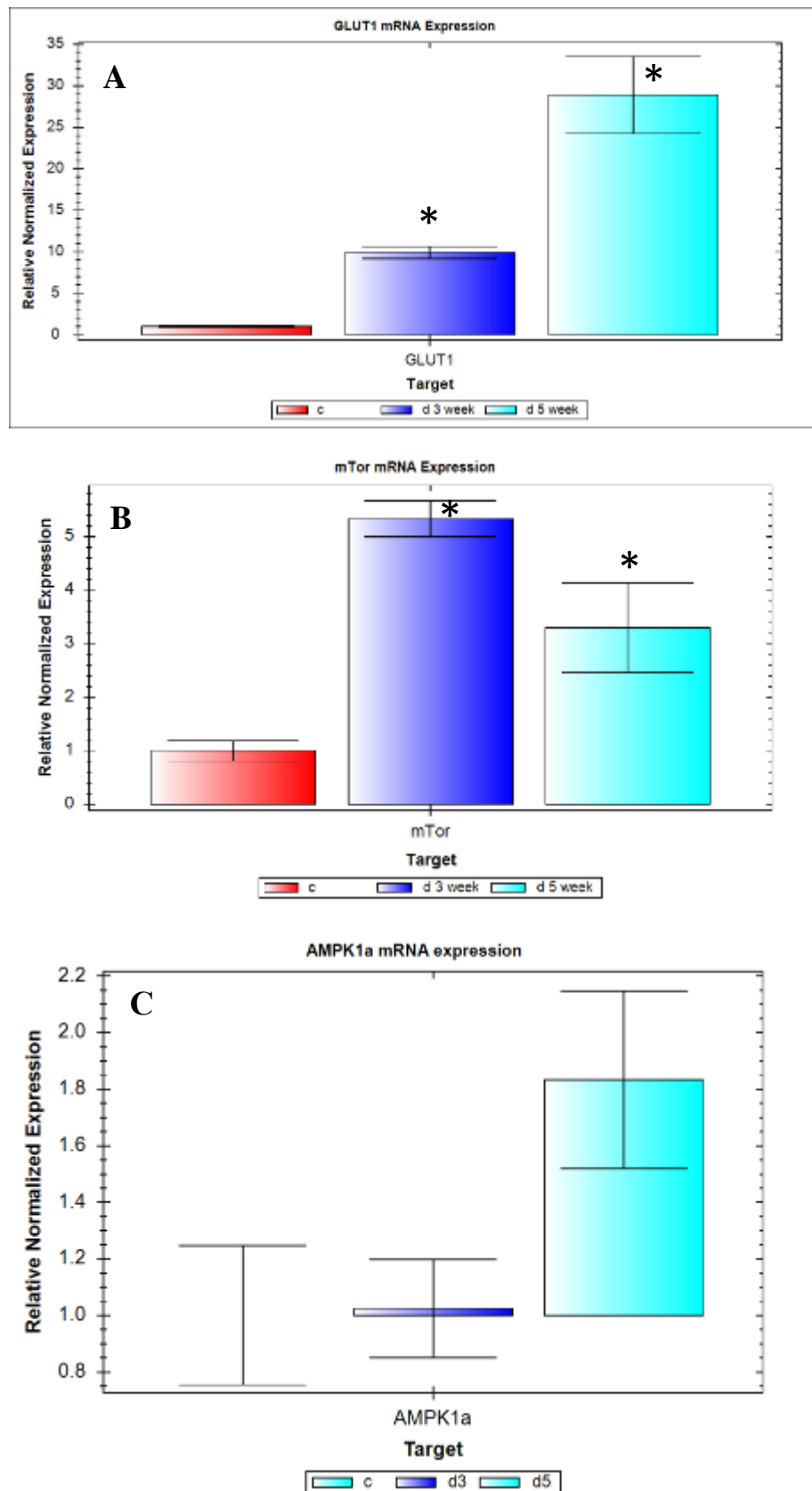


Рис. 3.1 Відносна нормалізована кількість мРНК генів *GLUT1* (A), *mTOR* (B) та *AMPK1a* (C) в клітинах ПЛВ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. c-контроль; d3, d5 – 3-х і 5-ти тижневий ЕСЦД відповідно.

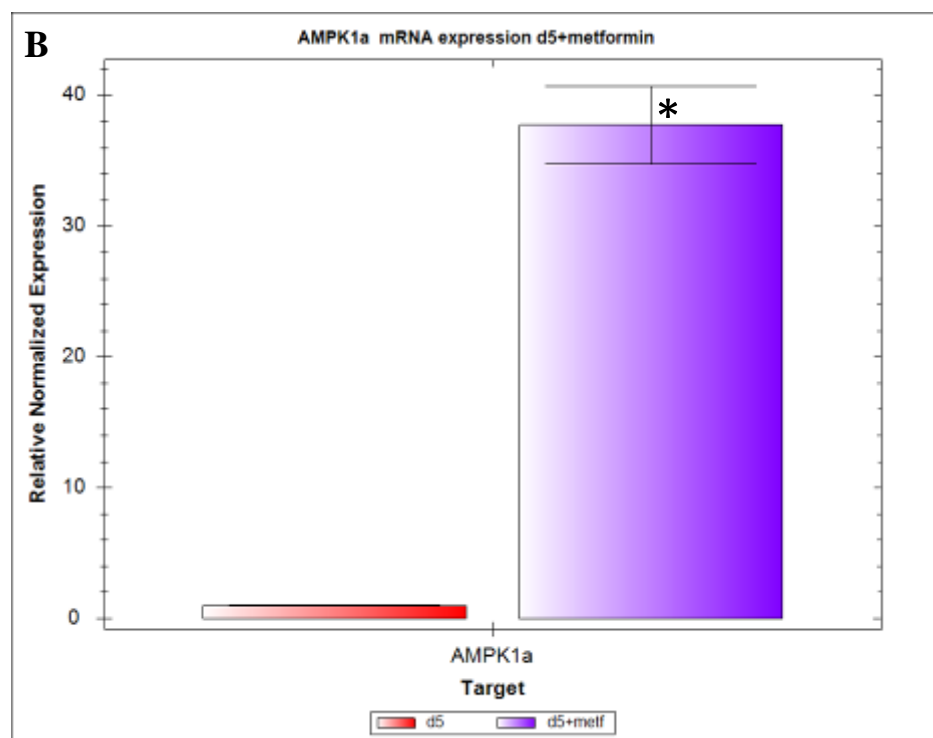
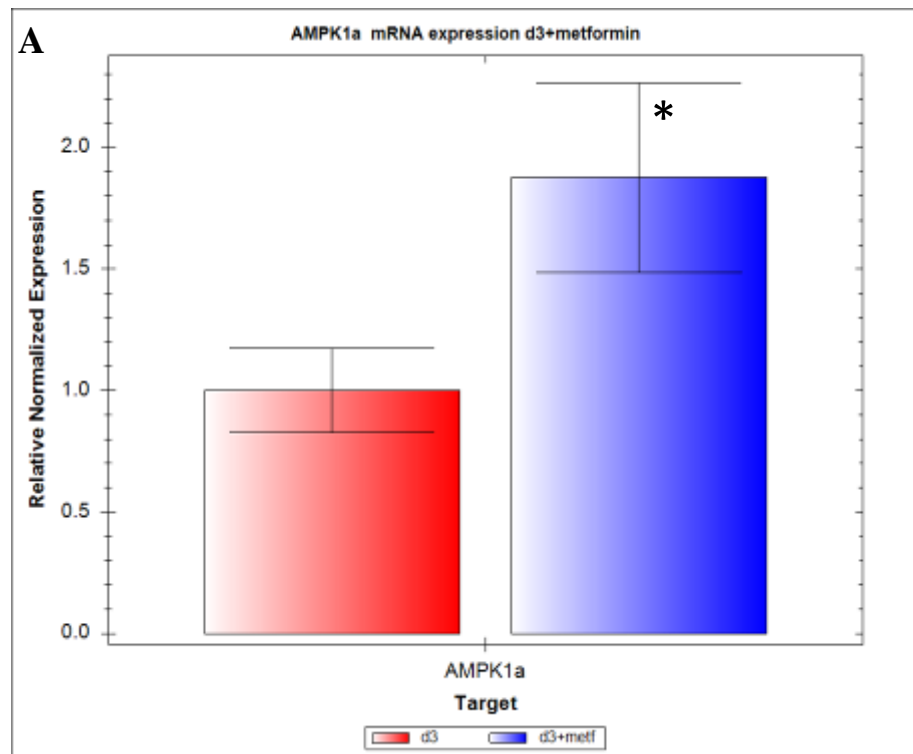


Рис. 3.2 (А, В) Відносна нормалізована кількість мРНК гену *AMPK1b* в клітинах ПЛВ після введення метформіну щурам з цукровим діабетом. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. d3, d5 – 3-х і 5-ти тижневий ЕСЦД відповідно.

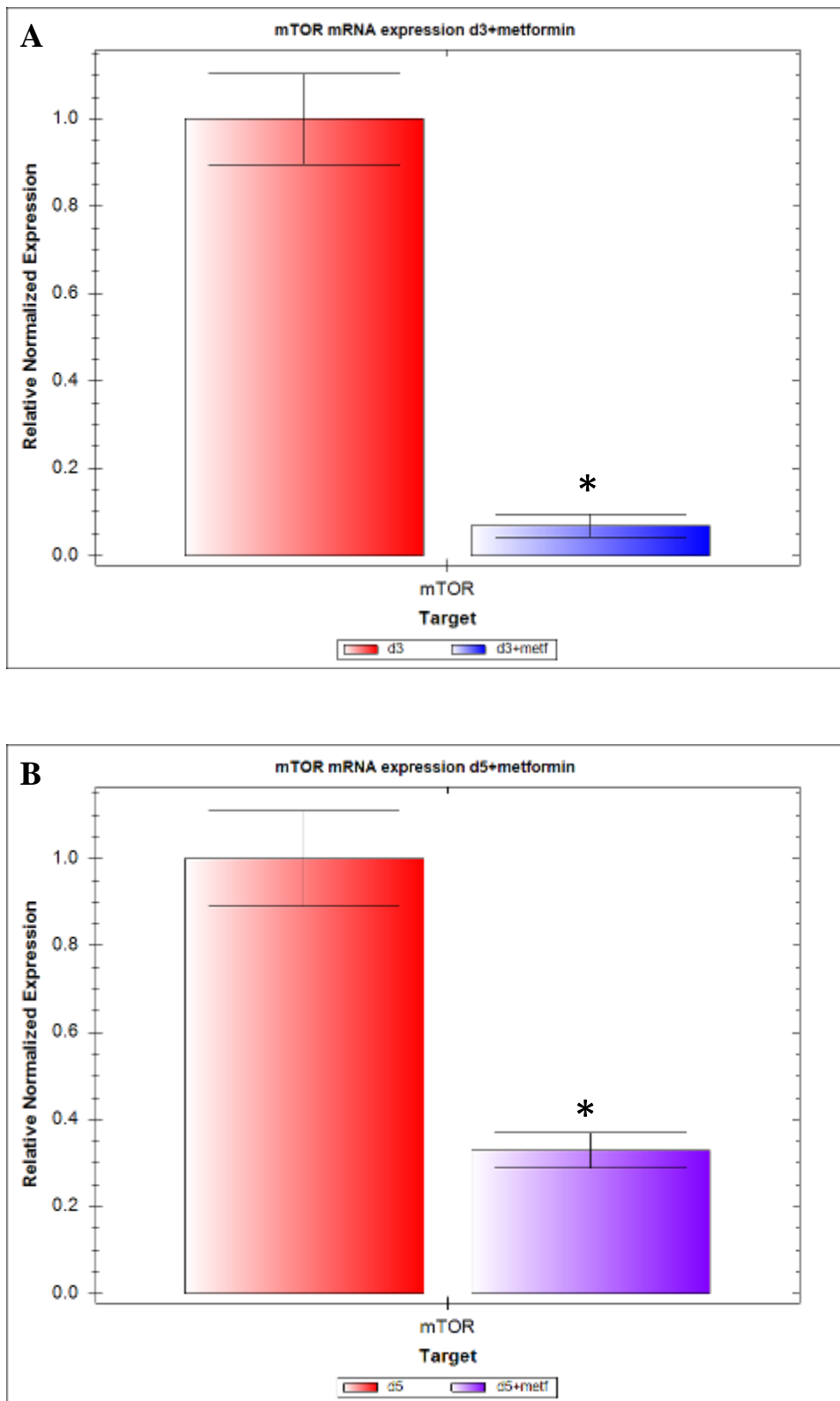


Рис. 3.3 (А, В) Відносна нормалізована кількість мРНК гену *mTOR* в клітинах ПЛВ після введення метформіну щурам з цукровим діабетом. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном *GAPDH*. d3, d5 – 3-х і 5-ти тижневий ЕСІЦД відповідно.

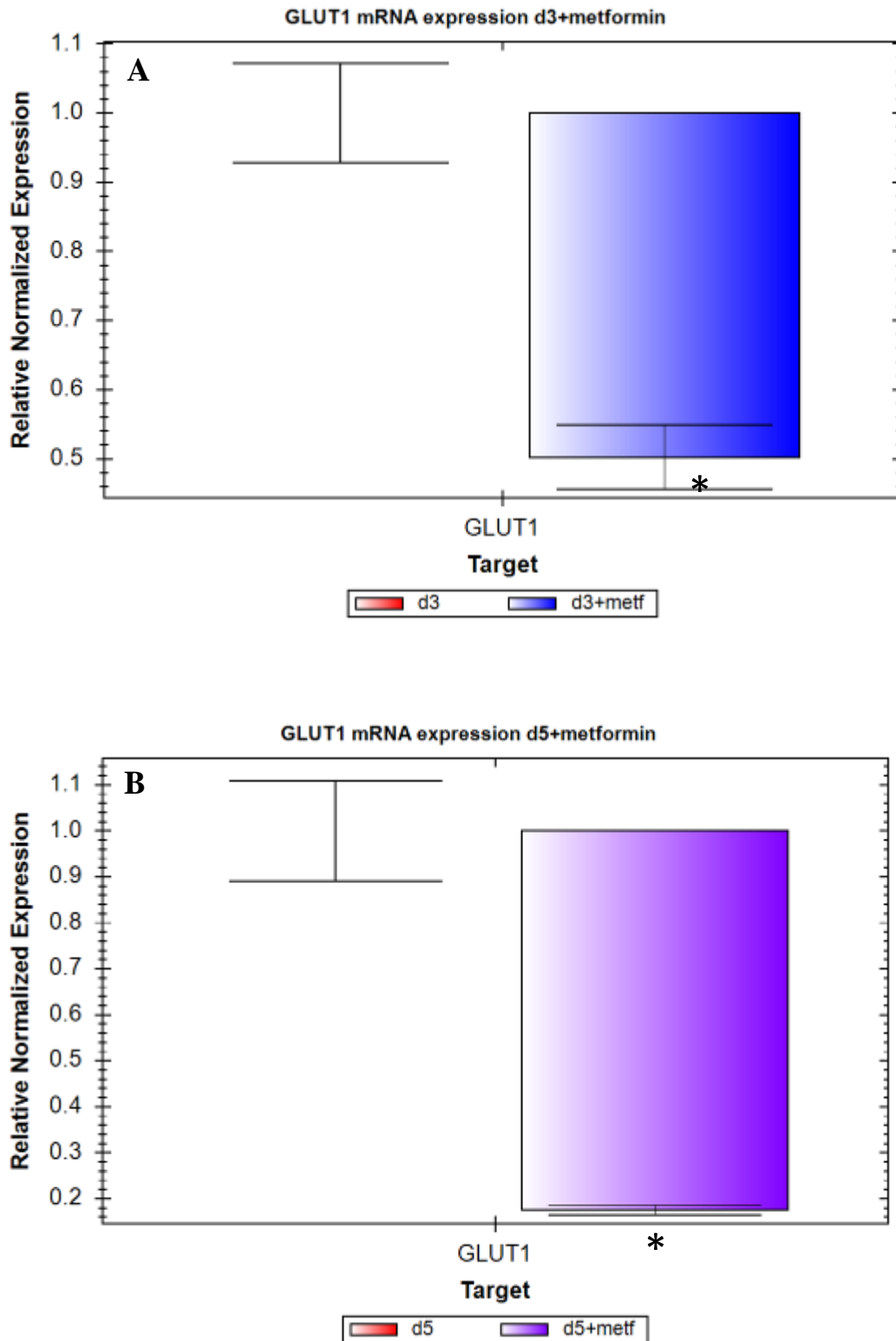


Рис. 3.4 (А, В) Відносна нормалізована кількість мРНК гену *GLUT1* в клітинах ПЛВ після введення метформіну щурам з цукровим діабетом. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном *GAPDH*. d3, d5 – 3-х і 5-ти тижневий ЕСЦД відповідно.

3.2. Дослідження розподілу mTOR⁺-клітин в ПЛВ

Структуру популяції mTOR⁺-лімфоцитів вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів ПЛВ і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик.

Нами встановлено, що розвиток діабету не впливав на сумарну щільність mTOR⁺-клітин в ПЛВ на 3-й тиждень патологічного процесу та призводив до їх збільшення у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД – на 24 % (p<0,05) в паракортикальній зоні та на 34 % (p<0,05) в м'якотних тяжках (табл. 3.1-3.2, рис. 3.5-3.6).

Вивчення розподілу окремих класів mTOR⁺-клітин показало, що дане збільшення загальної кількості імунопозитивних до протеїнкінази mTOR лімфоцитів було викликано головним чином ростом щільності популяції (ЩП) mTOR⁺-малих лімфоцитів – на 23 % (p<0,05) в паракортикальній зоні та на 46 % (p<0,05) в м'якотних тяжках і mTOR⁺-середніх лімфоцитів (відповідно на 22 % і 50 %, p<0,05) (див. табл. 3.1 і 3.2).

Введення метформіну не впливало на загальну чисельність mTOR⁺-клітин у щурів з 3-х тижневим ЕСІЦД і призводило до зниження їх кількості на 40 % (p<0,05) в м'якотних тяжках ПЛВ у тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД за рахунок зниження ЩП mTOR⁺-лімфоцитів всіх класів (див. табл. 3.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції імунопозитивних клітин показало збільшення концентрації протеїнкінази mTOR у mTOR⁺-лімфобластів і mTOR⁺-малих лімфоцитів на 3-й тиждень і mTOR⁺-середніх лімфоцитів паракортикальної зони ПЛВ на 5-ий тиждень розвитку діабету (табл. 3.3).

Таблиця 3.1

Кількість mTOR⁺ - клітин у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).

Серії	mTOR ⁺ лімфобласти	mTOR ⁺ середні лімфоцити	mTOR ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність mTOR ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{16 \pm 1}{31,7 \pm 1,7 \%}$	$\frac{9 \pm 1}{16,9 \pm 1,7 \%}$	$\frac{26 \pm 2}{51,3 \pm 3,4 \%}$	50 ± 3
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{15 \pm 1}{30,6 \pm 2,1 \%}$	$\frac{7 \pm 1}{13,7 \pm 1,3 \%}$	$\frac{27 \pm 2}{55,6 \pm 3,6 \%}$	48 ± 2
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{19 \pm 1}{30,7 \pm 1,8 \%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{18,4 \pm 1,6 \%}$	$\frac{32 \pm 2^1}{50,8 \pm 3 \%}$	62 ± 3 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{13 \pm 1}{23,7 \pm 2,1 \%}^2$	$\frac{9 \pm 1^2}{17,3 \pm 1,9 \%}$	$\frac{32 \pm 2}{58,9 \pm 4 \%}$	53 ± 3
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{18 \pm 2}{27,9 \pm 3,2 \%}$	$\frac{6 \pm 1^3}{9,4 \pm 1,1 \%}^3$	$\frac{40 \pm 2}{62,5 \pm 11,5 \%}$	63 ± 9

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції mTOR⁺ лімфоцитів (на 1мм²);

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів mTOR⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до контролю (¹);

4. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

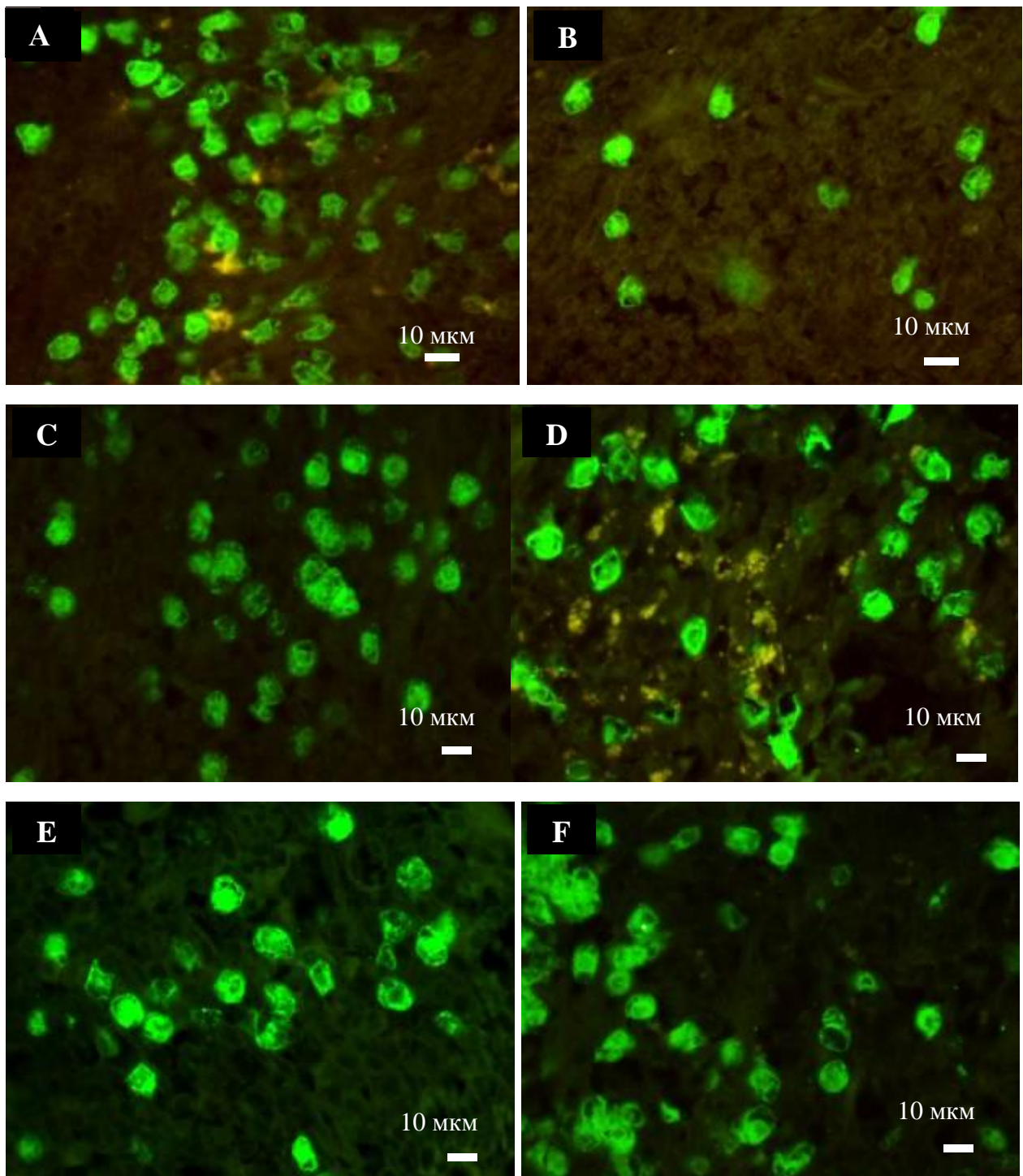


Рис. 3.5 mTOR⁺-лімфоцити у паракортикальній зоні (А, С, Е) і м'якотних тяжках (В, D, F) ПЛВ щурів з 5-тижневим ЕСЦД. Реакція непрямой імунофлюоресценції з ПКАТ до mTOR.

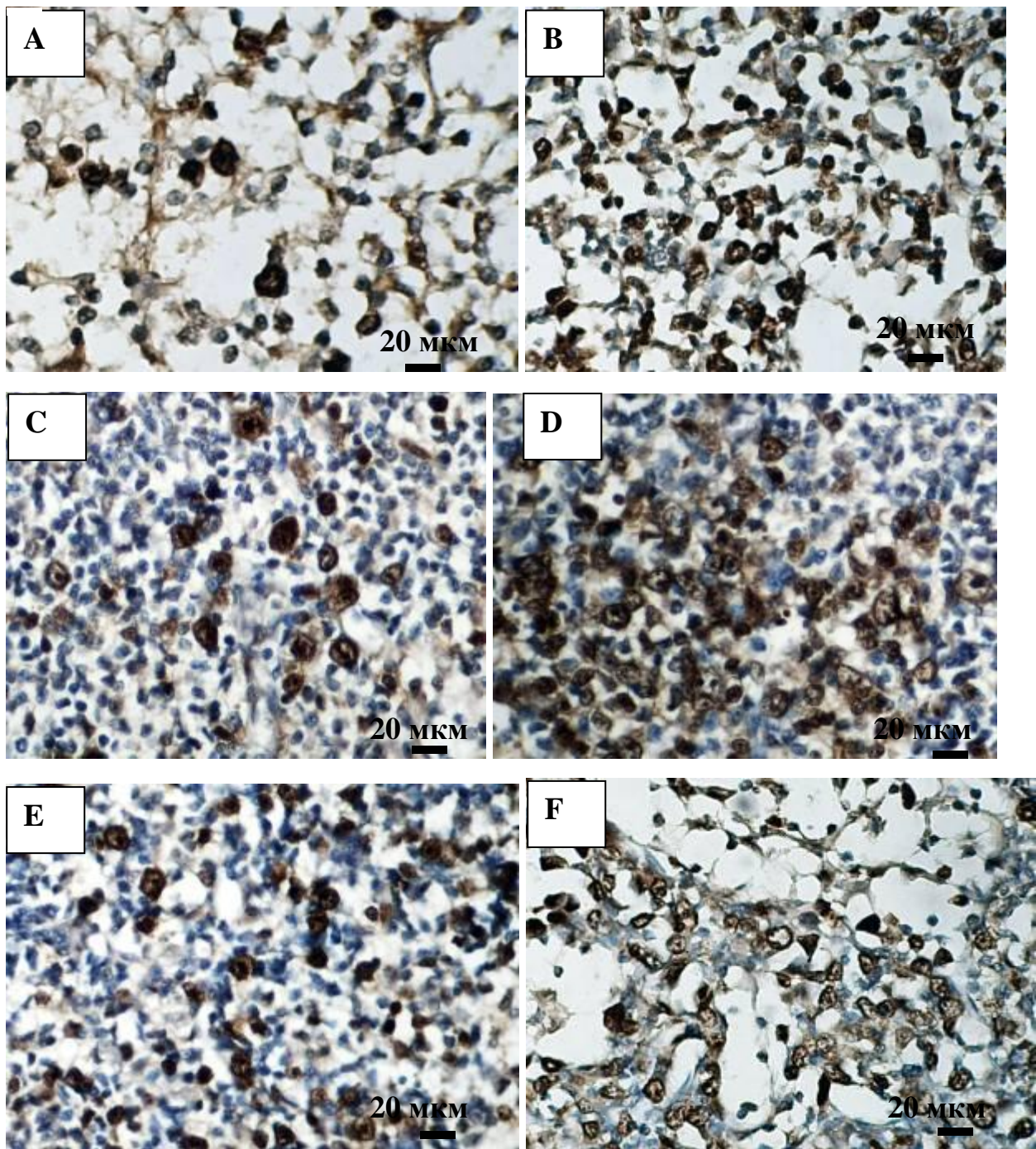


Рис. 3.6 mTOR⁺-лімфоцити у паракортикальній зоні (С, D, E) і м'якотних тяжках (А, В, F) ПЛВ щурів з 5-тижневим ЕСІЦД. Імуногістохімічна реакція з первинними кролячими ПКАТ до mTOR і вторинними антитілами rabbit ImmunoCruz™ Staining system.

Таблиця 3.2.

Кількість mTOR⁺ - клітин у м'якотних тяжах ПЛВ (M ± m).

Серії	mTOR ⁺ лімфобласти	mTOR ⁺ середні лімфоцити	mTOR ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність mTOR ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{18 \pm 1}{17,7 \pm 1,6 \%}$	$\frac{8 \pm 1}{23,8 \pm 2 \%}$	$\frac{28 \pm 4}{58,4 \pm 4,2 \%}$	53 ± 4
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{15 \pm 1^1}{26,1 \pm 1,9 \%}$	$\frac{9 \pm 1}{13,4 \pm 1,8 \%}$	$\frac{27 \pm 1}{60,4 \pm 4,5 \%}$	50 ± 3
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{19 \pm 1}{26,1 \pm 1,7 \%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{16,8 \pm 1,6 \%}$	$\frac{41 \pm 3^1}{56,9 \pm 4,1 \%}$	71 ± 4 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{9 \pm 1}{17,7 \pm 1,6 \%}$	$\frac{13 \pm 1}{23,8 \pm 2 \%}$	$\frac{31 \pm 2}{58,4 \pm 4,2 \%}$	52 ± 4
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{11 \pm 1^3}{26,1 \pm 1,9 \%}$	$\frac{6 \pm 1^3}{13,4 \pm 1,8 \%}$	$\frac{27 \pm 2^3}{60,4 \pm 4,5 \%}$	43 ± 3 ¹

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції mTOR⁺ лімфоцитів (на 1 мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів mTOR⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до контролю (¹);

4. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Таблиця 3.3

**Концентрація транскрипційного фактору mTOR⁺ (УО_{ІФ}) в
лімфоцитах у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).**

Серії	mTOR ⁺ лімфобласти	mTOR ⁺ середні лімфоцити	mTOR ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,782±0,022	0,314±0,003	0,142±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,874±0,022 ¹	0,316±0,003	0,146±0,001 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,748±0,017	0,323±0,002 ¹	0,144±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,720±0,027 ²	0,320±0,004	0,146±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,777±0,022	0,321±0,004	0,127±0,001 ³

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
2. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Введення метформіну знижували концентрацію мішені рапаміцину в mTOR⁺-лімфобластах у тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД в паракортикальній зоні ПЛВ на 17 % ($p < 0,05$) і в м'якотних тяжках на 28 % ($p < 0,05$). При збільшенні тривалості ЕСІЦД до 5-ти тижнів відмічалось також достовірне зниження концентрації mTOR у mTOR⁺-середніх і mTOR⁺-малих лімфоцитів (див. табл. 3.3 і 3.4).

Таблиця 3.4

**Концентрація транскрипційного фактору mTOR⁺ (УО_{ІФ}) в
лімфоцитах у м'якотних тяжах ПЛВ (M ± m).**

Серії	mTOR ⁺ лімфобласти	mTOR ⁺ середні лімфоцити	mTOR ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,806±0,022	0,322±0,004	0,138±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,852±0,023	0,327±0,003	0,145±0,002 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,759±0,019	0,317±0,003	0,143±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,616±0,016 ²	0,321±0,002	0,145±0,001
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,812±0,029	0,303±0,003 ³	0,139±0,002

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
2. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Узагальнюючи результати розділу, можна зробити наступні висновки:

1. ЕСІЦД викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* (в 9,9-28,9 разів) і протеїнкінази *mTOR* (в 5,3-3,3 рази) в клітинах ПЛВ, не впливає на загальну кількість mTOR⁺-клітин в ПЛВ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу і призводить до їх зростання на 5-й тиждень ЕСІЦД – на 24 % в паракортикальній зоні і на 34 % в м'якотних тяжах переважно за рахунок збільшення ЩП mTOR⁺-малих і середніх лімфоцитів.

2. Введення метформіну щурам з цукровим діабетом призводить до зростання рівня мРНК гену *AMPK1α* на 87 % на 3-й тиждень та майже в 38 разів на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД та пригнічення експресії mTOR (в 3-14,7 разів) і *Glut 1* (в 2-5,7 разів) в ПЛВ. При цьому кількість mTOR⁺-клітин знижувалась

на 40 % лише у м'якотних тяжах ПЛВ у тварин з 5-ти тижневим ЕСЦД. Введення метформіну знижували концентрацію мішені рапаміцину в mTOR⁺-імунопозитивних клітинах ПЛВ.

Матеріали, викладені в даному розділі, оприлюднені в наукових працях автора [163, 164, 151, 165].

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ЕСЦД І ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ НА ЕКСПРЕСІЮ РЕЦЕПТОРІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ЛІМФОЦИТАМИ ПЛІВ

Більшість публікацій, присвячених імунним механізмам розвитку ЦД розкривають головним чином адаптивну ланку імунітету [166]. Тим не менш, останні дослідження свідчать, що в розвитку ЦД 1 типу критичну роль можуть відігравати зміни експресії цілої низки мембранних та цитоплазматичних ПРР вродженого імунітету, зокрема толл-подібних рецепторів (TLRs), NOD-like рецепторів (NLR), сенсорів вірусних РНК RIG-like рецепторів (RLRs) [25]. Про ефекти метформіна на експресію ПРР у лімфоцитах ПЛІВ взагалі нічого не відомо.

У даному розділі наведено результати досліджень особливостей впливу ЕСЦД і введень метформіну на особливості експресії рецепторів вродженого імунітету (РВІ) в ПЛІВ, для чого використовувалися імунофлюоресцентні методи. Вивчена особливість розподілу TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺- клітин в різних морфологічних зонах ПЛІВ, за допомогою програм AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (NIH, США), проведено аналіз морфометричних і денситометричних характеристик імунопозитивних клітин, при цьому досліджуваними параметрами були: щільність відповідних лімфоцитів на 1 мм² тканини і їх частка в структурі лімфоїдної популяції, щільність відповідних TLR на клітинній мембрані лімфоцитів та концентрація NOD2 і RIGI в цитоплазмі.

4.1. Характер розподілу TLR-2⁺-лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів лінії Wistar з ЕСІЦД, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2, показав, що розвиток 3-х та 5-ти тижневого ЕСІЦД супроводжувався збільшенням сумарної щільності TLR2⁺-лімфоцитів лише у паракортикальній зоні ПЛВ – на 60 % ($p < 0,05$) та в 3,1 рази ($p < 0,05$) відповідно (табл. 4.1-4.2).

Таблиця 4.1

Кількість TLR-2⁺ - клітин у паракортикальній зоні ПЛВ ($M \pm m$).

Серії	TLR-2 ⁺ лімфобласти	TLR-2 ⁺ середні лімфоцити	TLR-2 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність TLR-2 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{8 \pm 1}{25,1 \pm 2,4 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{19,4 \pm 2,3 \%}$	$\frac{18 \pm 2}{55,4 \pm 6,2 \%}$	32 ± 3
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{19 \pm 1^1}{36,2 \pm 2,3 \%^1}$	$\frac{9 \pm 1^1}{17,9 \pm 1,8 \%}$	$\frac{23 \pm 2}{45,7 \pm 4,8 \%}$	51 ± 3 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{18 \pm 1^1}{17,8 \pm 1,4 \%^1}$	$\frac{13 \pm 1^1}{13 \pm 1,3 \%}$	$\frac{71 \pm 11^1}{69,1 \pm 10 \%}$	103 ± 13 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{11 \pm 1^2}{21 \pm 2,3 \%^2}$	$\frac{11 \pm 1}{20,8 \pm 3,2 \%}$	$\frac{30 \pm 4}{58,1 \pm 7,4 \%}$	52 ± 5
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{13 \pm 1^3}{27,5 \pm 2,1 \%^3}$	$\frac{9 \pm 1^3}{18,3 \pm 1,8 \%^3}$	$\frac{26 \pm 2^3}{54 \pm 4,1 \%}$	48 ± 2 ³

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції TLR-2⁺ лімфоцитів (на 1мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів TLR-2⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

4. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Таблиця 4.2.

Кількість TLR-2⁺ - клітин у м'якотних тяжах ПЛВ (M ± m).

Серії	TLR-2 ⁺ лімфобласти	TLR-2 ⁺ середні лімфоцити	TLR-2 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність TLR-2 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{14 \pm 1}{24,6 \pm 1,6 \%}$	$\frac{11 \pm 1}{20 \pm 2,2 \%}$	$\frac{31 \pm 3}{55,3 \pm 4,8 \%}$	55 ± 3
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{19 \pm 1^1}{35,8 \pm 1,7 \% ^1}$	$\frac{9 \pm 1}{17 \pm 1,6 \%}$	$\frac{25 \pm 2}{47 \pm 3,2 \%}$	53 ± 2
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{19 \pm 2^1}{28,1 \pm 2,1 \%}$	$\frac{9 \pm 1}{13,7 \pm 1,5 \% ^1}$	$\frac{40 \pm 7}{58 \pm 10 \%}$	68 ± 8
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{12 \pm 1^2}{25,9 \pm 2,8 \% ^2}$	$\frac{11 \pm 2}{23,2 \pm 3,4 \%}$	$\frac{25 \pm 3}{50 \pm 5,2 \%}$	48 ± 4
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{14 \pm 1^3}{27,2 \pm 2 \%}$	$\frac{9 \pm 1}{17,8 \pm 1,8 \%}$	$\frac{28 \pm 2}{54,9 \pm 4,4 \%}$	50 ± 2

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції TLR-2⁺ лімфоцитів (на 1мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів TLR-2⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

4. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³)

Розподіл окремих класів TLR2⁺-лімфоцитів в групі експериментальних тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД засвідчив збільшення у паракортикальній зоні ПЛВ щільності популяції TLR2⁺-лімфобластів в 2,4 рази ($p < 0,05$), TLR2⁺-середніх лімфоцитів на 50 % ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю (див. табл. 4.1). В м'якотних тяжах ПЛВ у ці строки зросла лише щільність популяції TLR2⁺-лімфобластів – на 35 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.2). Схожі зміни спостерігались у випадку з 5-ти тижневим ЕСІЦД: у паракортикальній зоні ПЛВ щільність популяції TLR2⁺-лімфобластів збільшилась в 2,3 рази ($p < 0,05$),

TLR2⁺-середніх лімфоцитів в 2,2 рази ($p < 0,05$), TLR2⁺-малих лімфоцитів в 3,9 рази ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю. У м'якотних тяжах щільність популяції TLR2⁺-лімфобластів також збільшилась на 35 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.1-4.2).

Аналіз структури популяції окремих класів TLR2⁺-лімфоцитів в групі експериментальних тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД засвідчив збільшення відсоткової частки TLR2⁺-лімфобластів як у паракортикальній зоні так і м'якотних тяжах на 44 % та 45 % ($p < 0,05$) відповідно. В групі експериментальних тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД відсоткова частка TLR2⁺-лімфобластів у паракортикальній зоні зменшилась на 30 % ($p < 0,05$). У м'якотних тяжах ПЛВ відсоткова частка TLR2⁺-середніх лімфоцитів зменшилась на 35 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.1-4.2).

Після введення метформіну сумарна щільність TLR2⁺-лімфоцитів змінювалась лише у тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ – зменшилась на 53 % ($p < 0,05$) у порівнянні з щурами, які не отримували метформін протягом цього часу. Ці зміни відбулись за рахунок зменшення щільності популяції TLR2⁺-лімфобластів (на 28 %, $p < 0,05$), TLR2⁺-середніх лімфоцитів (на 31 %, $p < 0,05$), TLR2⁺-малих лімфоцитів (на 63 %, $p < 0,05$) (див. табл. 4.1). При цьому у паракортикальній зоні ПЛВ при 5-ти тижневому ЕСІЦД після введення метформіну показники відсоткової частки TLR2⁺-лімфобластів і TLR2⁺-середніх лімфоцитів зросли на 54 % ($p < 0,05$) та 40 % ($p < 0,05$) відповідно. В м'якотних тяжах ПЛВ у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД достовірні зміни відбулись лише серед TLR2⁺-лімфобластів, щільність популяції яких зменшилась на 26 % ($p < 0,05$). При 3-х тижневому ЕСІЦД щільність популяції TLR2⁺-лімфобластів зменшилась як у паракортикальній зоні, так і м'якотних тяжах ПЛВ, а саме на 42 % та 37 % ($p < 0,05$) відповідно (див. табл. 4.1-4.2). При цьому їх відсоткова частка також зменшилась на 42 % ($p < 0,05$) у паракортикальній зоні та 27 % ($p < 0,05$) у м'якотних тяжах ПЛВ.

Таблиця 4.3.

**Щільність TLR2-рецепторів (УО_{1ф}) в лімфоцитах паракортикальної зони
ПЛВ (M ± m).**

Серії	TLR-2 ⁺ лімфобласти	TLR-2 ⁺ середні лімфоцити	TLR-2 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,738±0,023	0,319±0,003	0,141±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,740±0,019	0,316±0,003	0,140±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,801±0,025	0,308±0,003 ¹	0,130±0,001 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,688±0,022	0,310±0,002	0,143±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,748±0,029	0,325±0,004 ³	0,145±0,002 ³

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

2. до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Вивчення щільності TLR2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток 3-х та 5-ти тижневого ЕСІЦД супроводжувався вірогідним зменшенням даного показника у м'якотних тяжках ПЛВ у лімфобластах (див. табл. 4.4). Ми також спостерігали достовірне збільшення щільності TLR2 рецепторів на малих лімфоцитах при 3-х тижневому ЕСІЦД у м'якотних тяжках ПЛВ і зменшення при 5-ти тижневому ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ на малих та середніх лімфоцитах (див. табл. 4.3-4.4). Введення метформіну щурам з 5-ти тижневим ЕСІЦД супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності TLR2 на поверхні малих та середніх лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ (див. табл. 4.3).

Таблиця 4.4

**Щільність TLR2-рецепторів (УО_{1ф}) в лімфоцитах м'якотних тяжів
ПЛВ (М ± m).**

Серії	TLR-2 ⁺ лімфобласти	TLR-2 ⁺ середні лімфоцити	TLR-2 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,830±0,027	0,310±0,003	0,139±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,764±0,020 ¹	0,315±0,004	0,148±0,002 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,758±0,022 ¹	0,318±0,004	0,140±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,805±0,030	0,311±0,003	0,144±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,765±0,026	0,310±0,004	0,146±0,002

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
2. до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
3. до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

4.2. Характер розподілу TLR-2⁺-лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів лінії Wistar з ЕСІЦД, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4, показав, що в умовах індукції 3-х тижневого ЕСІЦД спостерігається збільшення їх сумарної щільності на 60 % ($p < 0,05$) як у паракортикальній зоні, так і у м'якотних тяжах, тоді як при 5-ти тижневому ЕСІЦД загальна кількість TLR4⁺-лімфоцитів збільшилась в 2,1 рази ($p < 0,05$) лише у паракортикальній зоні, у порівнянні з групою контролю (табл. 4.5-4.6).

Таблиця 4.5

Кількість TLR-4⁺ - клітин у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).

Серії	TLR-4 ⁺ лімфобласти	TLR-4 ⁺ середні лімфоцити	TLR-4 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність TLR-4 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{6 \pm 1}{16,8 \pm 2,2 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{16,4 \pm 2,2 \%}$	$\frac{24 \pm 3}{66,7 \pm 8,3 \%}$	23 ± 2
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{9 \pm 1}{15,7 \pm 2 \%}$	$\frac{8 \pm 1}{14,7 \pm 2,3 \%}$	$\frac{38 \pm 6^1}{69,4 \pm 10,3 \%}$	37 ± 5 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{13 \pm 1^1}{17,6 \pm 1,5 \%}$	$\frac{10 \pm 1}{13,3 \pm 1,6 \%}$	$\frac{50 \pm 6^1}{68,9 \pm 8,3 \%}$	49 ± 6 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{8 \pm 1}{21 \pm 2 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{15,6 \pm 1,7 \%}$	$\frac{23 \pm 2^2}{63,3 \pm 4,7 \%}$	22 ± 1 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{7 \pm 1^3}{20 \pm 1,6 \%}$	$\frac{7 \pm 1}{19,4 \pm 2,2 \%^3}$	$\frac{21 \pm 2^3}{60 \pm 6 \%}$	20 ± 2 ³

- Примітки: 1. чисельник – щільність популяції TLR-4⁺ лімфоцитів (на 1мм²),
 2. знаменник – відсоткова частка окремих класів TLR-4⁺ лімфоцитів;
 3. достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹);
 4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³)

Розподіл окремих класів TLR4⁺-лімфоцитів в групі експериментальних тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД засвідчив збільшення щільності популяції TLR4⁺-малих лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 58 % (p<0,05). При 5-ти тижневому ЕСІЦД чисельність популяції TLR4⁺-малих лімфоцитів і TLR4⁺-лімфобластів зросла більше ніж в 2 рази (p<0,05) (див. табл. 4.5). У м'якотних тяжах при 5-ти тижневому ЕСІЦД щільність популяції TLR4⁺-середніх лімфоцитів збільшилась в 2 рази (p<0,05), а їх відсоткова частка – на 30 % (p<0,05) у порівнянні з групою контролю (див. табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Кількість TLR-4⁺ - клітин у м'якотних тяжах ПЛВ (M ± m).

Серії	TLR-4 ⁺ лімфобласти	TLR-4 ⁺ середні лімфоцити	TLR-4 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність TLR-4 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{6 \pm 1}{16,7 \pm 2,3} \%$	$\frac{5 \pm 1}{14,3 \pm 2,5} \%$	$\frac{25 \pm 3}{68,8 \pm 7,3} \%$	24 ± 2
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{9 \pm 1}{16,3 \pm 2,3} \%$	$\frac{7 \pm 1}{13,7 \pm 1,9} \%$	$\frac{38 \pm 1}{69,9 \pm 12,7} \%$	38 ± 6 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{7 \pm 1}{15,3 \pm 1,5} \%$	$\frac{10 \pm 1^1}{18,8 \pm 2,2} \%$	$\frac{31 \pm 3}{65,8 \pm 7,4} \%$	31 ± 3
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{9 \pm 1}{23,9 \pm 1,9} \%^2$	$\frac{5 \pm 1}{13,8 \pm 1,4} \%$	$\frac{23 \pm 2^2}{62,2 \pm 4,8} \%$	23 ± 1 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{9 \pm 1}{21,6 \pm 2,1} \%^3$	$\frac{6 \pm 1^3}{13,7 \pm 1,7} \%$	$\frac{28 \pm 2}{64,6 \pm 4,6} \%$	28 ± 1

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції TLR-4⁺ лімфоцитів (на 1мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів TLR-4⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹);

4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Введення метформіну щурам з 3-х тижневим ЕСІЦД призвело до зменшення сумарної щільності TLR4⁺-лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах ПЛВ за рахунок зменшення щільності популяції TLR4⁺-малих лімфоцитів (див. табл. 4.5-4.6). Введення метформіну щурам з 5-ти тижневим ЕСІЦД призвело до зменшення сумарної щільності TLR4⁺-лімфоцитів лише у паракортикальній зоні ПЛВ на 59 % (p<0,05). Розподіл окремих класів TLR4⁺-лімфоцитів засвідчив зменшення TLR4⁺-малих лімфоцитів на 58 % (p<0,05) та TLR4⁺-лімфобластів на 46 % (p<0,05) (див.

табл. 4.5). У м'якотних тяжах зменшилась лише щільність популяції TLR4⁺-середніх лімфоцитів на 40 % (p<0,05) (див. табл. 4.6).

Відсоткова частка TLR4⁺-лімфобластів в групі експериментальних тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД які отримували метформін збільшилась в м'якотних тяжах на 46 % (p<0,05) у порівнянні з 3-х тижневим ЕСІЦД. Відсоткова частка TLR4⁺-лімфобластів в групі експериментальних тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД які отримували метформін збільшилась в м'якотних тяжах на 41 % (p<0,05), TLR4⁺-середніх лімфоцитів в паракортикальній зоні на 45 % (p<0,05) у порівнянні з групою тварин, які не отримували метформін (див. табл. 4.5-4.6).

Таблиця 4.7.

Щільність TLR4-рецепторів (УО_{ІФ}) в лімфоцитах паракортикальної зони ПЛВ (М ± m).

Серії	TLR-4 ⁺ лімфобласти	TLR-4 ⁺ середні лімфоцити	TLR-4 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,646±0,027	0,311±0,005	0,128±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,691±0,032	0,318±0,004	0,129±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,802±0,029 ¹	0,310±0,004	0,128±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,592±0,017 ²	0,306±0,004	0,138±0,002 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,697±0,029 ³	0,321±0,004	0,142±0,003 ³

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹);

2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Таблиця 4.8

**Щільність TLR4-рецепторів (УО_{1Ф}) в лімфоцитах м'якотних тяжів
ПЛВ (М ± m).**

Серії	TLR-4 ⁺ лімфобласти	TLR-4 ⁺ середні лімфоцити	TLR-4 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,656±0,030	0,301±0,004	0,133±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,738±0,027 ¹	0,306±0,004	0,128±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,784±0,036 ¹	0,313±0,004	0,137±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,644±0,018 ²	0,309±0,004	0,138±0,002 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,664±0,026 ³	0,321±0,005	0,136±0,002

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Вивчення щільності TLR4 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток 3-х тижневого ЕСІЦД супроводжується збільшенням даного показника у лімфобластах на 12 % ($p < 0,05$) тільки у м'якотних тяжах ПЛВ. При 5-ти тижневому ЕСІЦД даний показник збільшився у лімфобластах м'якотних тяжів та паракортикальній зоні ПЛВ на 20 % та 25 % ($p < 0,05$) (див. табл. 4.7-4.8). Введення метформіну щурам з 3-х тижневим ЕСІЦД супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 в лімфобластах та збільшенням в малих лімфоцитах в обох морфофункціональних зонах ПЛВ (див. табл. 4.7-4.8). Введення метформіну щурам з 5-ти тижневим ЕСІЦД супроводжувалось зменшенням щільності TLR4 у лімфобластах як паракортикальної зони так і м'якотних тяжів ПЛВ на 14 % ($p < 0,05$), та збільшенням в малих лімфоцитах на 11 % ($p < 0,05$) лише у паракортикальній

зоні у порівнянні з групою тварин, які не отримували метформін (див. табл. 4.7-4.8).

4.3. Зміни розподілу NOD2⁺-лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз розподілу NOD2⁺-клітин показав, що розвиток 3-х та 5-ти тижневого ЕСІЦД супроводжувався збільшенням сумарної щільності NOD2⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 38 % ($p < 0,05$) та в 2 рази ($p < 0,05$), відповідно (рис. 4.1 А). У м'якотних тяжках вірогідних змін сумарної щільності NOD2⁺-лімфоцитів не відбулось (див. рис. 4.1 А). При цьому концентрація NOD2 зменшувалась у малих лімфоцитів паракортикальної зони як на 3-й, так і на 5-й тиждень розвитку діабету, а на середніх лімфоцитах лише при 5-ти тижневому ЕСІЦД (рис. 4.3 В-С).

Розподіл окремих класів NOD2⁺-лімфоцитів в групі експериментальних тварин з 3-х та 5-ти тижневим ЕСІЦД показав зменшення популяції NOD2⁺-лімфобластів у м'якотних тяжках ПЛВ на 25 % та 18 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 4.2 А). Щільність популяції NOD2⁺-малих лімфоцитів збільшилась при 3-х тижневому ЕСІЦД у паракортикальній зоні та м'якотних тяжках на 75 % і 55 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 4.2 С), а при 5-ти тижневому ЕСІЦД в 2,8 разів ($p < 0,05$) лише у паракортикальній зоні ПЛВ у порівнянні з групою контролю (рис. 4.2 С). Відбулись також зміни відсоткової частки NOD2⁺-лімфобластів в групі щурів з 3-х тижневим ЕСІЦД: зменшення у паракортикальній зоні на 30 % ($p < 0,05$), та на 36 % ($p < 0,05$) у м'якотних тяжках (див. рис. 4.2 А). При 5-ти тижневому ЕСІЦД відсоткова частка NOD2⁺-лімфобластів у паракортикальній зоні також зменшилась на 44 % ($p < 0,05$), у м'якотних тяжках ПЛВ – на 28 % ($p < 0,05$) (див. рис. 4.2 А).

Введення метформіну щурам з ЕСІЦД не призвело до достовірних змін загальної кількості NOD2⁺-лімфоцитів в ПЛВ (рис. 4.1 В-С).

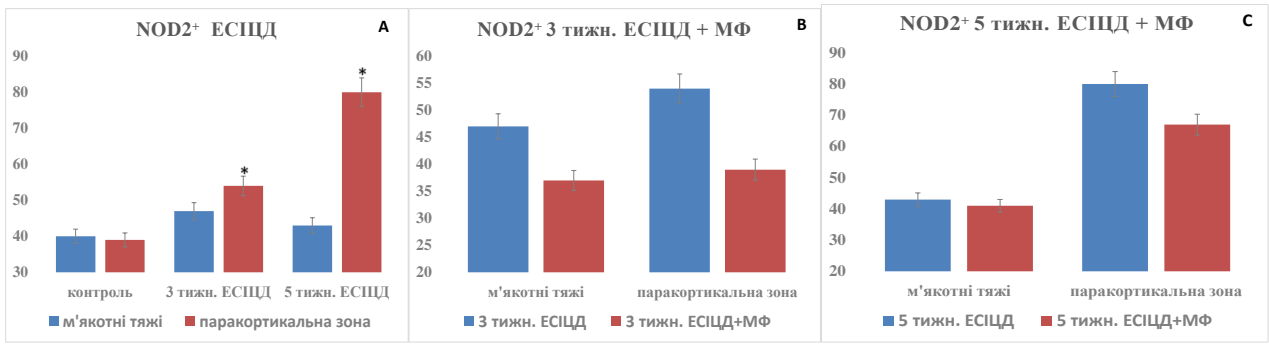


Рис. 4.1 Сумарна щільність (на 1 мм²) NOD2⁺ клітин в паракортикальній зоні та м'якотних тяжках ПЛВ. Розвиток ЕСІЦД (А). Введення метформіну (МФ) експериментальним тваринам. (В, С)

Примітки: * – P < 0.05.

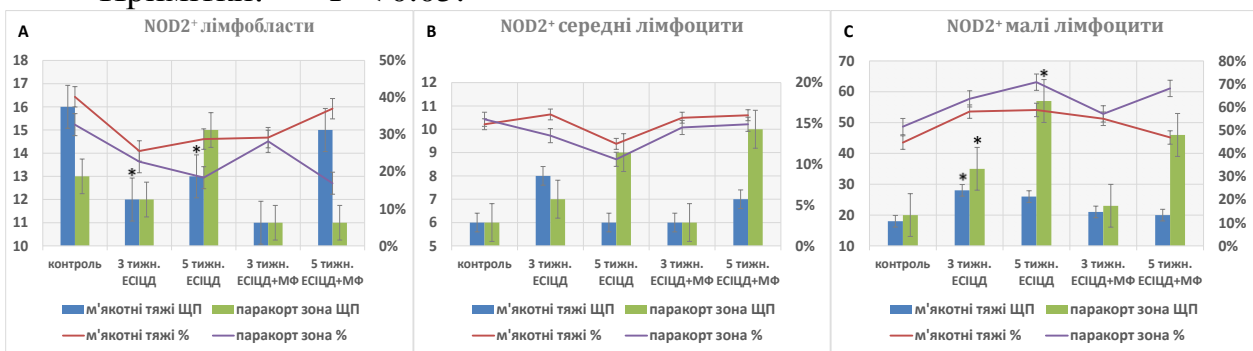


Рис. 4.2 Щільність популяції (ЩП) та відсоткова частка (%) (на 1 мм²) NOD2⁺ лімфобластів (А), NOD2⁺ середніх лімфоцитів (В), NOD2⁺ малих лімфоцитів (С), в паракортикальній зоні та м'якотних тяжках ПЛВ.

Примітки: 1. * – P < 0.05 відносно контролю,
2. # – P < 0.05 відносно діабету.

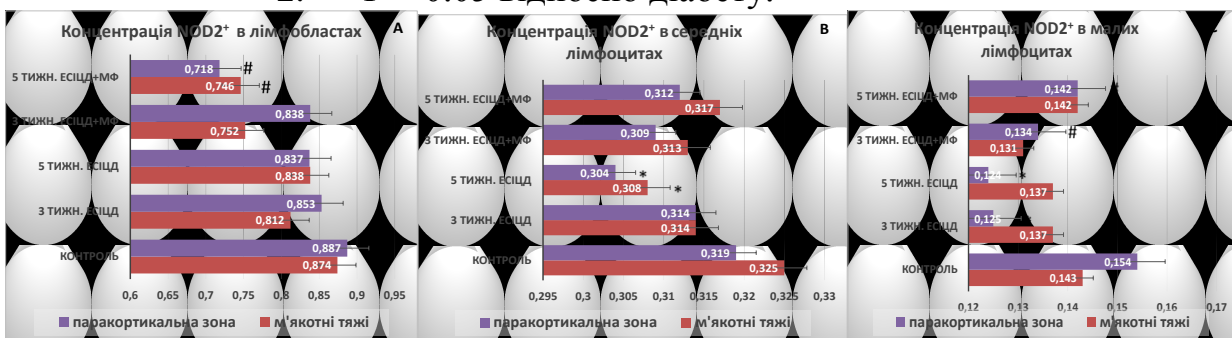


Рис. 4.3 Концентрація NOD2 (інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях, УО_{if}) в NOD2⁺-лімфобластах (А), NOD2⁺-середніх лімфоцитах (В) та NOD2⁺-малих лімфоцитах (С).

Примітки: 1. * – P < 0.05 відносно контролю,
2. # – P < 0.05 відносно діабету.

Введення метформіну щурам з 5-ти тижневим ЕСІЦД зменшило концентрацію NOD2 в лімфобластах у паракортикальній зоні на 14 % ($p < 0,05$), а у м'якотних тяжках на 11 % ($p < 0,05$) (див. рис. 4.3 А). Введення метформіну щурам з 3-х та 5-ти тижневим ЕСІЦД супроводжувалось збільшенням щільності NOD2 рецепторів в цитоплазмі малих лімфоцитів відповідно на 7 % та 15 % ($p < 0,05$) у паракортикальній зоні (див. рис. 4.3 С).

4.4. Зміни розподілу RIGI⁺-лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів лінії Wistar з ЕСІЦД, попередньо інкубованих з ПКАТ до RIGI, показав, що розвиток ЕСІЦД призвів до збільшення сумарної щільності RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ при 3-х та 5-ти тижневому ЕСІЦД, а саме в 2,4 рази ($p < 0,05$) та 77 % ($p < 0,05$) у м'якотних тяжках та на 58 % ($p < 0,05$) і в 3,7 рази у паракортикальній зоні ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю (рис. 4.4 А).

Вивчення розподілу окремих класів RIGI⁺-лімфоцитів у групі експериментальних тварин з 3-х та 5-ти тижневим ЕСІЦД продемонструвало збільшення чисельності RIGI⁺-лімфобластів як у паракортикальній зоні (в 2,8-2,3 рази, $p < 0,05$), так і в м'якотних тяжках (на 8-53 %, $p < 0,05$) (рис. 4.5 А). Щільність популяції RIGI⁺-малих лімфоцитів збільшилась у паракортикальній зоні в 2,4 рази ($p < 0,05$) та на 50 % ($p < 0,05$), а у м'якотних тяжках – на 84 % ($p < 0,05$) та в 5 разів ($p < 0,05$) (рис. 4.5 С). Щільність популяції RIGI⁺-середніх лімфоцитів збільшилась у паракортикальній зоні на 75 % ($p < 0,05$) та 2 рази ($p < 0,05$), у м'якотних тяжках достовірних змін цього показника при 3-х тижневому ЕСІЦД не відбулось, проте при 5-ти тижневому ЕСІЦД вона збільшилась в 4,3 рази ($p < 0,05$) (рис. 4.5 В).

Відбулось зменшення відсоткової частки RIGI⁺-лімфобластів у групі щурів з 3-х та 5-ти тижневим ЕСІЦД у м'якотних тяжках на 32 % ($p < 0,05$) та 56 % ($p < 0,05$) у порівнянні з групою контролю (див. рис. 4.5 А).

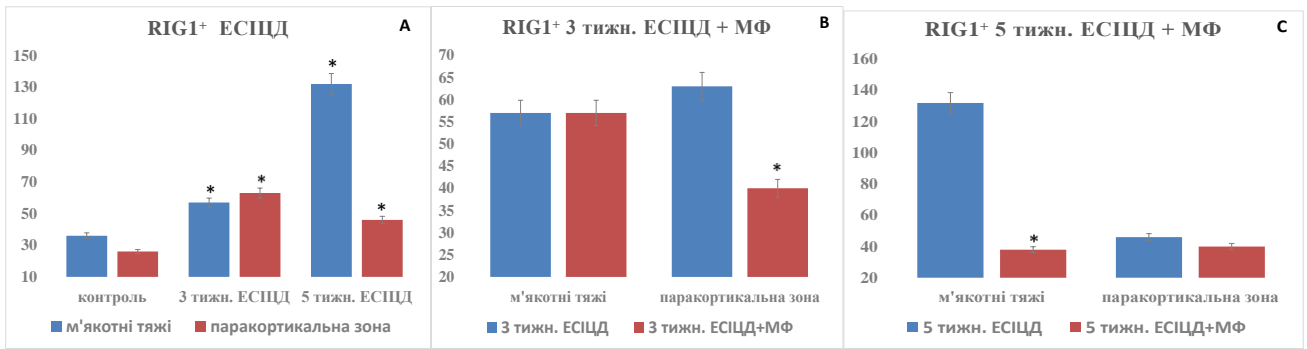


Рис. 4.4 Сумарна щільність (на 1 мм²) RIG1⁺ клітин в паракортикальній зоні та м'якотних тяжах ПЛВ. Розвиток ЕСІЦД (А). Введення метформіну (МФ) (В, С) експериментальним тваринам.

Примітки: * – P < 0.05.

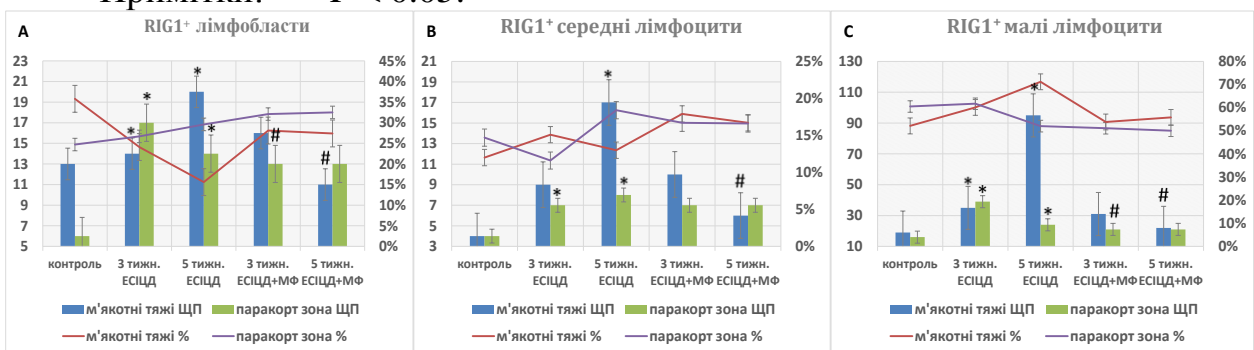


Рис. 4.5 Щільність популяції (ЩП) та відсоткова частка (%) (на 1 мм²) RIG1⁺ лімфобластів (А), RIG1⁺ середніх лімфоцитів (В), RIG1⁺ малих лімфоцитів (С), в паракортикальній зоні та м'якотних тяжах ПЛВ.

Примітки: 1. * – P < 0.05 відносно контролю,
2. # – P < 0.05 відносно діабету.

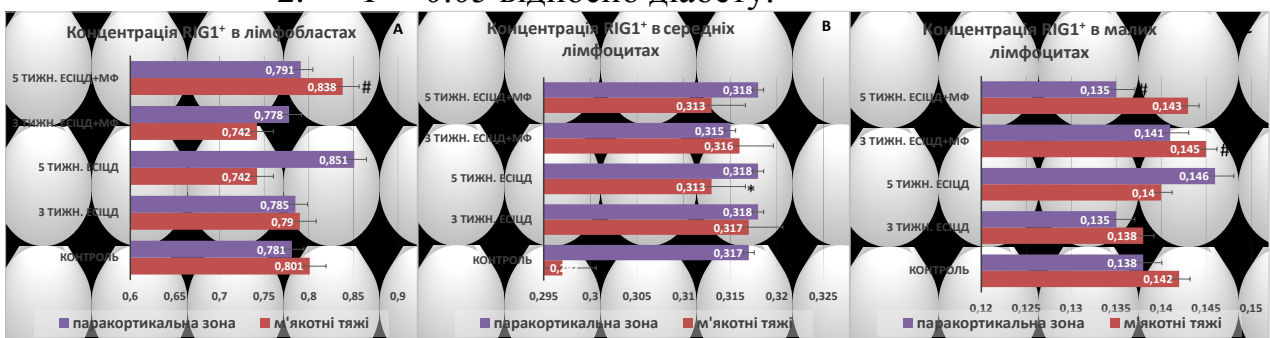


Рис. 4.6 Концентрація RIG1 (інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях, YO_{if}) в RIG1⁺-лімфобластах (А), RIG1⁺-середніх лімфоцитах (В) та RIG1⁺-малих лімфоцитах (С).

Примітки: 1. * – P < 0.05 відносно контролю,
2. # – P < 0.05 відносно діабету.

Після введення метформіну щурам з 3-х тижневим ЕСІЦД сумарна щільність RIGI⁺-лімфоцитів зменшилась лише у паракортикальній зоні – на 36 % (p<0,05), тоді як з 5-ти тижневим ЕСІЦД – лише у м'якотних тяжках (на 71 %, p<0,05) (рис. 4.4 В-С). Щільність популяції RIGI⁺-лімфобластів та RIGI⁺-малих лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ при 3-х тижневому ЕСІЦД зменшилась на 23 % (p<0,05) та 46 % (p<0,05) відповідно (див. рис. 4.5 А, С). При 5-ти тижневому ЕСІЦД у м'якотних тяжках щільність популяції RIGI⁺-лімфобластів зменшилась на 45 % (p<0,05), RIGI⁺-середніх лімфоцитів на 65 % (p<0,05), RIGI⁺-малих лімфоцитів на 77 % (p<0,05), відповідно (див. рис. 4.5 А-С). Відсоткова частка RIGI⁺-лімфобластів у м'якотних тяжках ПЛВ навпаки збільшилась на 75 % (p<0,05).

Вивчення концентрації RIGI рецепторів в цитоплазмі імунопозитивних клітин засвідчило, що розвиток 3-х та 5-ти тижневого ЕСІЦД супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника у середніх лімфоцитах м'якотних тяжків у порівнянні з контролем (рис. 4.6 В). Введення метформіну щурам з цукровим діабетом призвело до зростання концентрації RIGI у лімфобластах та малих лімфоцитах м'якотних тяжків, та зменшенню у малих лімфоцитах паракортикальної зони ПЛВ (див. рис. 4.6 А-С).

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що:

1. Розвиток діабету супроводжується зростанням кількості TLR2⁺- (на 59 % – в 3,1 рази), TLR4⁺- (на 61 % – в 2,1 рази), NOD2⁺- (на 38 % – в 2 рази) і RIGI⁺-лімфоцитів (в 2,4 рази – на 77 %) у паракортикальній зоні і TLR4⁺- (на 60 % на 3 тиждень) та RIGI⁺-лімфоцитів (на 58 % – в 3,7 рази) у м'якотних тяжках ПЛВ щурів, змінює щільність ПРР на імунних клітинах. Ефекти по зростанню кількості клітин, експресуючих РВІ залежали від тривалості патологічного процесу – збільшення терміну ЕСІЦД викликало сильнішу дію по відношенню до TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺-лімфоцитів в паракортикальній зоні і RIGI⁺-лімфоцитів у м'якотних тяжках ПЛВ щурів.

Отримані результати свідчать, що ЕСІЦД призводить до значної активації вродженої імунної системи і це, в свою чергу, може суттєво впливати на рівень активації адаптивної імунної відповіді, диференціювання субпопуляцій хелперних Т-клітин в ПЛВ.

2. Введення метформіну метформіну щурам з цукровим діабетом зменшує чисельність в ПЛВ лімфоцитів, експресуючих ПРР, за винятком NOD2, впливає на щільність мембранних і концентрацію цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету. При цьому кількість клітин, експресуючих мембранні TLR2 і TLR4 зменшувалась більш активно у паракортикальній зоні (в 2,1 рази та на 41 % – в 2,5 рази відповідно), а цитоплазматичних сенсорів вірусних РНК RIGI у м'якотних тяжках ПЛВ щурів на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (в 3,5 рази). Таким чином, метформін гальмує рівень активації компонентів вродженої імунної системи в ПЛВ.

Результати наведених в даному розділі досліджень представлені в науковій публікації автора [167].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ РІВНЯ МРНК ГЕНІВ *AIRE* ТА *DEAF1* І ДИНАМІКИ КЛІТИННОГО СКЛАДУ T-BET⁺ (TH1), ROR γ T⁺ (TH17) І FOXP3⁺- ЛІМФОЦИТІВ (T_{REG}) В ПЛВ ПРИ ЕСЦД І ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ

У представленому розділі наведені результати досліджень особливостей експресії транскрипційних регуляторів диференціювання Т-лімфоцитів і відносного рівня мРНК регуляторів експресії периферичних тканинспецифічних антигенів Aire та Deaf1 в ПЛВ щурів при ЕСЦД і після введення метформіну, для чого використовували високочутливі і високо специфічні молекулярно-генетичні та імуофлюоресцентні методи. Вивчена особливість розподілу T-bet⁺ (Th1), Ror γ t⁺ (Th17) і Foxp3⁺-лімфоцитів (Treg) за допомогою програм AxioVision4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (НИН, США), проведено аналіз морфометричних і денситометричних характеристик імунних клітин, при цьому досліджуваними параметрами були: щільність відповідних імунопозитивних лімфоцитів на 1 мм² тканини, їх частка в структурі лімфоїдної популяції та концентрація Foxp3, ROR γ t і T-bet в цитоплазмі і ядрі клітин. Виділення тотальної РНК проводили з допомогою „Trizol RNA Prep100” (Ізоген Lab., LTD, РФ); для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 "Синтол" (РФ). Для визначення рівня експресії мРНК генів *Aire* та *Deaf1* проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Відносний рівень експресії вищевказаних генів оцінювали за методом $\Delta\Delta$ Сt, нормалізуючи за референс-геном *GAPDH*.

5.1. Дослідження експресії мРНК генів *Aire* та *Deaf1*

ЦД 1 типу є Т-клітинно-опосередкованим аутоімунним захворюванням, що характеризується руйнуванням β -клітин підшлункової залози із-за

порушення центральної та/або периферичної толерантності [29]. В останні роки стало зрозуміло, що не всі антигени, до яких Т-клітинам необхідно бути толерантними, експресуються в тимусі, тому одних механізмів центральної толерантності недостатньо [168, 100]. Периферична імунологічна толерантність може бути опосередкована екстратимічними клітинами, що експресують Aire (eTACs) [100]. Крім того, нещодавно було показано, що стромальні клітини лімфатичних вузлів (LNSCs) індують Т-клітинну толерантність шляхом ектопічної експресії та презентації аутоантигенів, порівняно з тимічними епітеліоцитами [169, 170]. Ектопічна експресія генів, кодуючих ПТА не контролюється Aire в LNSCs, але замість того частково регулюється фактором *Deaf1*. [171]. Крім того, периферична толерантність та імунний гомеостаз підтримуються, принаймні частково, балансом між регуляторними (Tregs) та ефекторними Т-клітинами, зокрема Th1 і Th17 [172].

Враховуючи вищенаведене, на першому етапі ми визначили рівень експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів Aire та *Deaf1* в ПЛВ щурів при ЕСЦД. Нами встановлено зменшення відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Deaf1* та *Aire* в ПЛВ. Зокрема, експресія *Deaf1* зменшилась в 4,2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-х тижневим ЕСЦД і в 2,5 рази ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД порівняно з контрольною групою (рис. 5.1 А). Експресія Aire зменшилась в 2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-тижневим ЕСЦД і в 50 разів ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД (рис. 5.1 В).

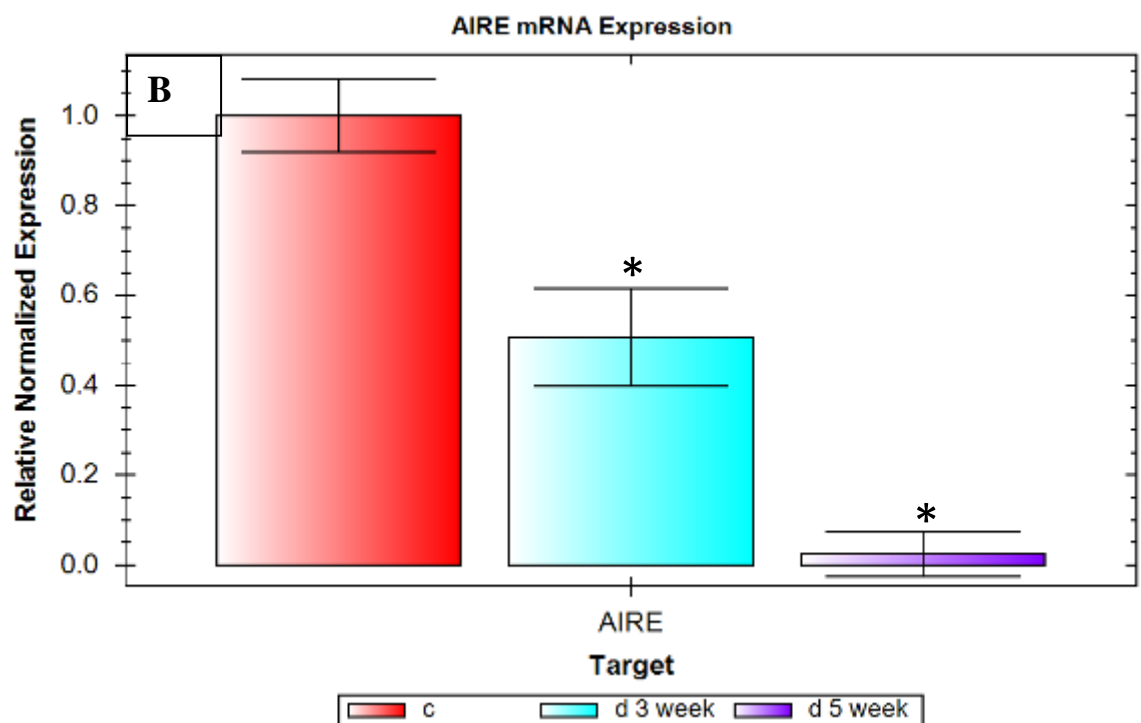
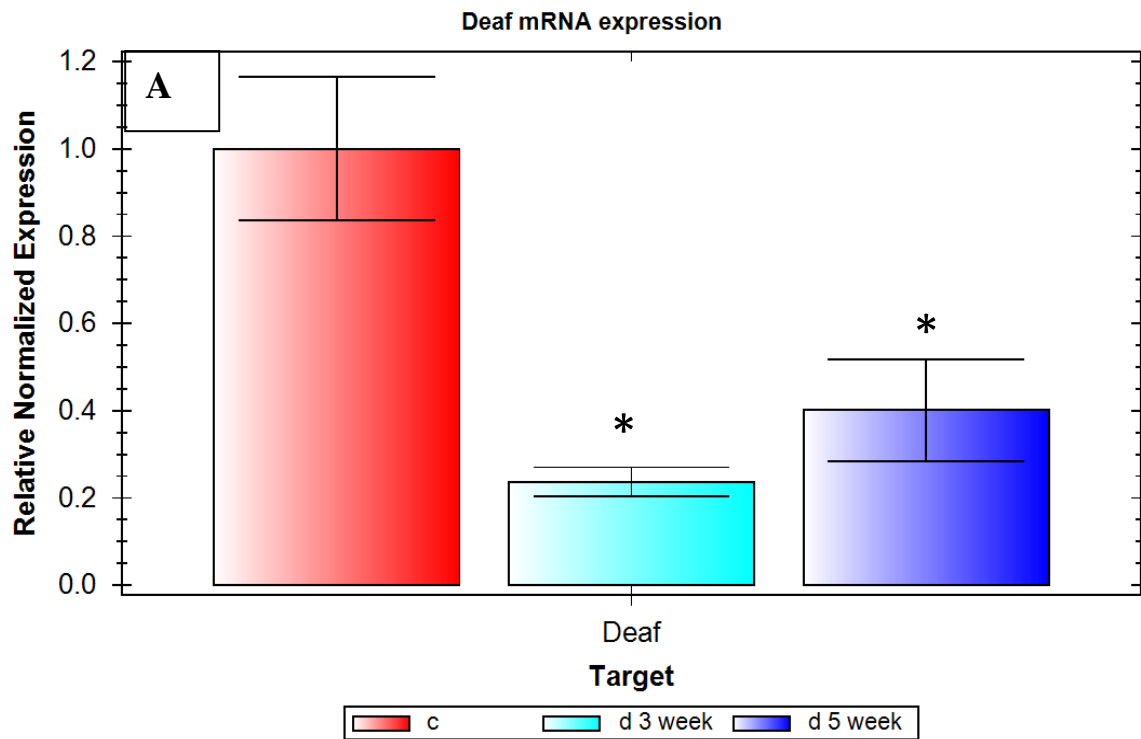


Рис. 5.1 Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Deaf1* (A) та *Aire* (B) в ПЛВ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном *GAPDH*. c-контроль; d3, d5 – діабет 3 і 5 тижнів. * – $p < 0.05$

5.2. Аналіз клітинного складу T-bet⁺-лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів з ЕСІЦД, попередньо інкубованих з ПККАТ до Tbet, показав, що розвиток 3-х та 5-ти тижневого ЕСІЦД призвів до збільшення сумарної щільності Tbet⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 56 % (p<0,05) та 87 % (p<0,05) відповідно (табл. 5.1). У м'якотних тяжках ПЛВ ці показники також збільшились в 2,3 рази (p<0,05) і на 68 % (p<0,05) відповідно у порівнянні з контрольною групою (табл. 5.2). Вивчення розподілу окремих класів Tbet⁺-лімфоцитів показало збільшення щільності популяції Tbet⁺-лімфобластів при 3-х тижневому ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ на 75 % (p<0,05), Tbet⁺-середніх лімфоцитів на 83 % (p<0,05) (див. табл. 5.1). У м'якотних тяжках при розвитку 3-х тижневого ЕСІЦД збільшилась щільність популяції Tbet⁺-лімфобластів на 86 % (p<0,05), Tbet⁺-середніх лімфоцитів в 2,3 рази (p<0,05), Tbet⁺-малих лімфоцитів в 2,6 разів (p<0,05) (див. табл. 5.2). Ці зміни по зростанню кількості Th1-клітин на тлі відносної стабільності структури популяції Т-хелперів 1 типу спостерігались і на 5-й тиждень течії патологічного процесу. Зокрема, при розвитку 5-ти тижневого ЕСІЦД відмічалось збільшення щільності популяції у паракортикальній зоні ПЛВ Tbet⁺-лімфобластів на 66 % (p<0,05), Tbet⁺-середніх лімфоцитів в 3,2 рази (p<0,05), та Tbet⁺-малих лімфоцитів на 58 % (p<0,05) у порівнянні з контролем (див. табл. 5.1). У м'якотних тяжках ПЛВ у ці строки щільність популяції Tbet⁺-лімфобластів збільшувалась на 50 % (p<0,05), Tbet⁺-середніх лімфоцитів на 83 % (p<0,05), Tbet⁺-малих лімфоцитів на 68 % (p<0,05) (див. табл. 5.2).

Введення метформіну не впливало на загальну чисельність Th1 на 3-й тиждень і призвело до зменшення у паракортикальній зоні ПЛВ сумарної щільності Tbet⁺-лімфоцитів на 48 % (p<0,05) у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД (див. табл. 5.1). Ці зміни відбувались переважно за рахунок зменшення кількості малих та середніх Tbet⁺-лімфоцитів на 39 % (p<0,05) та 52 % (p<0,05) відповідно (див. табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Кількість Tbet⁺ - клітин у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).

Серії	Tbet ⁺ лімфобласти	Tbet ⁺ середні лімфоцити	Tbet ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність Tbet ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{12 \pm 1}{28 \pm 2,2 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{15 \pm 1,7 \%}$	$\frac{24 \pm 1}{56,8 \pm 8,4 \%}$	41 ± 4
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{21 \pm 1^1}{32,5 \pm 1,6 \%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{16,8 \pm 1,5 \%}$	$\frac{33 \pm 1}{50,5 \pm 5,7 \%}$	64 ± 4 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{20 \pm 1^1}{26,2 \pm 1,8 \%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{24,5 \pm 1,9 \%}$	$\frac{38 \pm 2^1}{49,2 \pm 3 \%}$	77 ± 4 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{16 \pm 1^2}{23,6 \pm 2 \% ^2}$	$\frac{16 \pm 1^2}{22,9 \pm 2,4 \% ^2}$	$\frac{36 \pm 3}{53,4 \pm 4 \%}$	68 ± 4
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{25 \pm 1^3}{28,5 \pm 1,9 \%}$	$\frac{9 \pm 1^3}{16,6 \pm 1,7 \% ^3}$	$\frac{23 \pm 2^3}{54,7 \pm 4,3 \%}$	40 ± 2 ³

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції Tbet⁺ лімфоцитів (на 1мм²),
 2. знаменник – відсотка частка окремих класів Tbet⁺ лімфоцитів;
 3. достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹);
 4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

У м'якотних тяжках ПЛВ введення метформіну не призводило до достовірних змін загальної чисельності Th1-клітин, хоча і викликали часткові зміни розподілу окремих груп Tbet⁺-лімфоцитів. Зокрема, при 5-ти тижневому ЕСІЦД у м'якотних тяжках відмічалось збільшення щільності популяції Tbet⁺-малих лімфоцитів на 35 % (p<0,05) (див. табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Кількість Tbet⁺ - клітин у м'якотних тяжах ПЛВ (M ± m).

Серії	Tbet ⁺ лімфобласти	Tbet ⁺ середні лімфоцити	Tbet ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність Tbet ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{14 \pm 1}{32,8 \pm 2,8 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{14,7 \pm 1,5 \%}$	$\frac{22 \pm 2}{52,3 \pm 4,2 \%}$	41 ± 2
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{26 \pm 2^1}{26,5 \pm 1,7 \%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{14,8 \pm 1,3 \%}$	$\frac{57 \pm 8^1}{58,6 \pm 8,3 \%}$	96 ± 6 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{21 \pm 2^1}{31,1 \pm 2,3 \%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{15,6 \pm 1,4 \%}$	$\frac{37 \pm 3^1}{53,1 \pm 4,8 \%}$	69 ± 4 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{24 \pm 2}{25,9 \pm 1,9 \%}$	$\frac{19 \pm 2^2}{20,6 \pm 2 \% ^2}$	$\frac{50 \pm 6}{53,3 \pm 6,5 \%}$	93 ± 8
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{20 \pm 1}{23,7 \pm 1,4 \% ^3}$	$\frac{13 \pm 1}{15,8 \pm 1,4 \%}$	$\frac{50 \pm 6^3}{60,4 \pm 7 \%}$	83 ± 7

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції Tbet⁺ лімфоцитів (на 1мм²),
 2. знаменник – відсоткова частка окремих класів Tbet⁺ лімфоцитів;
 3. достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹);
 4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³)

Після введення метформіну відбулись зміни відсоткової частки у паракортикальній зоні ПЛВ Tbet⁺-клітин у групі тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД: зменшення Tbet⁺-лімфобластів на 27 % (p<0,05), проте кількість Tbet⁺-середніх лімфоцитів збільшилась на 36 % (p<0,05). У м'якотних тяжах відмічалось збільшення відсоткової частки тільки Tbet⁺-середніх лімфоцитів на 39 % (p<0,05). У тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ відсоткова частка Tbet⁺-середніх лімфоцитів зменшилась на 32 % (p<0,05), а у м'якотних тяжах – Tbet⁺-лімфобластів на 24 % (p<0,05) відносно групи щурів з ЕСІЦД (див. табл. 5.1 і 5.2).

Таблиця 5.3

Концентрація транскрипційного фактору Tbet (UO_{10}) в лімфоцитах у паракортикальній зоні ПЛВ ($M \pm m$).

Серії	Tbet ⁺ лімфобласти	Tbet ⁺ середні лімфоцити	Tbet ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,832±0,022	0,312±0,004	0,133±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,755±0,015 ¹	0,320±0,003	0,142±0,001 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,717±0,017 ¹	0,321±0,002	0,145±0,001 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,712±0,018	0,317±0,002	0,147±0,001
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,812±0,025 ³	0,316±0,004	0,140±0,002

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
 2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Вимірювання інтенсивності флуоресценції імунопозитивних клітин, що відображує концентрацію транскрипційного фактору Tbet, показало достовірне зниження її в лімфобластах та підвищення в малих лімфоцитах у паракортикальній зоні ПЛВ при 3-х тижневому ЕСІЦД (табл. 5.3). У м'якотних тяжках навпаки ці ж показники підвищились у Tbet⁺-лімфобластах на 10 % ($p < 0,05$), і знизились у Tbet⁺-малих лімфоцитах на 8 % ($p < 0,05$) (табл. 5.4). Аналогічні тенденції зберігались і до 5-го тижня розвитку патологічного процесу: при 5-ти тижневому ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ спостерігається зниження концентрації Tbet в лімфобластах на 14 % ($p < 0,05$), проте в малих лімфоцитах вона підвищилась на 9 % ($p < 0,05$).

Таблиця 5.4

Концентрація транскрипційного фактору Tbet ($UO_{1\Phi}$) в лімфоцитах у м'якотних тяжах ПЛВ у щурів лінії Wistar ($M \pm m$).

Серії	Tbet ⁺ лімфобласти	Tbet ⁺ середні лімфоцити	Tbet ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,716±0,023	0,301±0,003	0,144±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,794±0,018 ¹	0,307±0,003	0,132±0,001 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,797±0,018 ¹	0,310±0,003	0,136±0,001 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,685±0,016 ²	0,318±0,002 ²	0,137±0,001
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,762±0,016	0,313±0,002	0,133±0,001

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
 2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

У м'якотних тяжах простежується протилежна картина: підвищення в лімфобластах та зниження в малих лімфоцитах (див. табл. 5.3 і 5.4). Введення метформіну щурам з 3-х тижневим ЕСІЦД призвело до достовірних змін концентрації транскрипційного фактору Tbet тільки у м'якотних тяжах, а саме зниження в лімфобластах на 14 % ($p < 0,05$) та підвищення в середніх лімфоцитах. У тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД відмічалось підвищення концентрації транскрипційного фактору Tbet у лімфобластах на 13 % ($p < 0,05$) у паракортикальній зоні ПЛВ (див. табл. 5.3 і 5.4).

5.3. Аналіз клітинного складу $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів лінії Wistar з ЕСІЦД, попередньо інкубованих з ПКАТ до $\text{ROR}\gamma\text{t}$ показав, що розвиток діабету супроводжувався односпрямованим зростанням загальної кількості Th17-клітин в обох досліджуваних зонах. Зокрема, сумарна щільність Т-хелперів 17 типу у паракортикальній зоні ПЛВ підвищувалась 2,6 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень і на 46 % ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (табл. 5.5). У м'якотних тяжках ПЛВ сумарна щільність $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфоцитів також збільшилась при 3-х та 5-ти тижневому ЕСІЦД на 65 % ($p < 0,05$) і 69 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з контролем (табл. 5.6).

Вивчення розподілу окремих класів $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфоцитів в групі експериментальних тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ засвідчило збільшення щільності популяції середніх та малих $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфоцитів в 2,7 ($p < 0,05$) та 3,6 разів ($p < 0,05$) відповідно (див. табл. 5.5). При 5-ти тижневому ЕСІЦД збільшилась щільність популяції тільки $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -середніх лімфоцитів в 2,5 рази ($p < 0,05$). У м'якотних тяжках ПЛВ як при 3-х так і 5-ти тижневому ЕСІЦД збільшилась щільність популяції $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфобластів на 60 % ($p < 0,05$), $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -малих лімфоцитів на 95 % ($p < 0,05$) та в 2,1 рази ($p < 0,05$) відповідно (див. табл. 5.6). При цьому у структурі популяції Th17-клітин у паракортикальній зоні ПЛВ зменшилась на 56 % ($p < 0,05$) відсоткова частка $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфобластів на 3-й тиждень ЕСІЦД, а у м'якотних тяжках відсоткова частка $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -середніх лімфоцитів зменшилась як при 3-х так і 5-ти тижневому ЕСІЦД на 45 % ($p < 0,05$) та 51 % ($p < 0,05$) відповідно (див. табл. 5.5 і 5.6).

Після введення метформіну щурам з 3-х тижневим ЕСІЦД сумарна щільність $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфоцитів зменшилась на 48 % ($p < 0,05$) лише у паракортикальній зоні ПЛВ у порівнянні з тваринами, які не отримували метформін. Сумарна щільність $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -лімфоцитів у м'якотних тяжках, навпаки, зменшилась лише при 5-ти тижневому ЕСІЦД – на 27 % ($p < 0,05$).

Таблиця 5.5

Кількість ROR γ t⁺ - клітин у паракортикальній зоні ПЛВ (M \pm m).

Серії	ROR γ t ⁺ лімфобласти	ROR γ t ⁺ середні лімфоцити	ROR γ t ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність ROR γ t ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{16 \pm 1}{36 \pm 2 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{14,1 \pm 1,5 \%}$	$\frac{22 \pm 3}{49,8 \pm 7,2 \%}$	43 \pm 4
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{18 \pm 1}{15,8 \pm 1,4 \%}^1$	$\frac{16 \pm 2^1}{13,8 \pm 1,5 \%}$	$\frac{80 \pm 9^1}{70,3 \pm 7,6 \%}$	113 \pm 11 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{18 \pm 3}{28,2 \pm 5,3 \%}$	$\frac{15 \pm 4^1}{23,6 \pm 6 \%}$	$\frac{30 \pm 7}{48 \pm 11,8 \%}$	63 \pm 8 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{12 \pm 1^2}{20,5 \pm 1,4 \%}^{1,2}$	$\frac{12 \pm 1^2}{19,6 \pm 1,6 \%}^2$	$\frac{35 \pm 2^2}{59,7 \pm 3,8 \%}$	59 \pm 3 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{19 \pm 1}{35,1 \pm 2,2 \%}$	$\frac{9 \pm 1}{16,2 \pm 1,5 \%}$	$\frac{26 \pm 2}{48,6 \pm 3,2 \%}$	53 \pm 2

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції ROR γ t⁺ лімфоцитів (на 1мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів ROR γ t⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до контролю (¹);

4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

При 3-х тижневому ЕСІЦД після введення метформіну у паракортикальній зоні ПЛВ спостерігається зменшення щільності популяції усіх класів Th17-клітин, а саме: ROR γ t⁺-лімфобластів на 33 % (p < 0,05), ROR γ t⁺-середніх лімфоцитів на 25 % (p < 0,05), ROR γ t⁺-малих лімфоцитів на 56 % (p < 0,05), при цьому відсоткова частка ROR γ t⁺-лімфобластів збільшилась на 30 % (p < 0,05), а ROR γ t⁺-середніх лімфоцитів – на 42 % (p < 0,05) (див. табл. 5.5). У м'якотних тяжках введення метформіну щурам з цукровим діабетом призвели на 3-й тиждень ЕСІЦД до зменшення щільності популяції лише ROR γ t⁺-лімфобластів на 25 % (p < 0,05), а на 5-й – до збільшення кількості ROR γ t⁺-

лімфобластів на 19 % ($p < 0,05$) та зменшення $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитів на 45 % ($p < 0,05$) (див. табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Кількість $ROR\gamma t^+$ - клітин у м'якотних тяжках ПЛВ ($M \pm m$).

Серії	$ROR\gamma t^+$ лімфобласти	$ROR\gamma t^+$ середні лімфоцити	$ROR\gamma t^+$ малі лімфоцити	Сумарна щільність $ROR\gamma t^+$ лімфоцитів
контроль	$\frac{10 \pm 1}{22,2 \pm 2,9 \%}$	$\frac{11 \pm 1}{25,7 \pm 2,9 \%}$	$\frac{23 \pm 3}{52 \pm 5,9 \%}$	43 ± 4
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{16 \pm 1^1}{22,4 \pm 1,7 \%}$	$\frac{10 \pm 1}{14 \pm 1,7 \%}^1$	$\frac{45 \pm 7^1}{63,5 \pm 9,3 \%}$	71 ± 8 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{16 \pm 1^1}{21,4 \pm 1,2 \%}$	$\frac{10 \pm 1}{12,5 \pm 1,5 \%}^1$	$\frac{49 \pm 7^1}{65,9 \pm 9,9 \%}$	73 ± 8 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{12 \pm 1^2}{17,2 \pm 1,7 \%}^2$	$\frac{10 \pm 1}{14,6 \pm 1,7 \%}$	$\frac{47 \pm 6}{68,1 \pm 8,8 \%}$	69 ± 8
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{19 \pm 1^3}{35,2 \pm 1,9 \%}^3$	$\frac{8 \pm 1}{14,6 \pm 1,5 \%}$	$\frac{27 \pm 2^3}{49,7 \pm 3,5 \%}$	53 ± 2 ³

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції $ROR\gamma t^+$ лімфоцитів (на 1мм^2),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів $ROR\gamma t^+$ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

До того ж у м'якотних тяжках відсоткова частка $ROR\gamma t^+$ -лімфобластів зменшилась на 3-й тиждень на 23 % ($p < 0,05$), а при 5-ти тижневому ЕСІЦД збільшилась на 64 % ($p < 0,05$) у порівнянні з групою тварин без введення метформіну (див. табл. 5.6).

Вимірювання інтенсивності флуоресценції імунопозитивних клітин, що відображує концентрацію транскрипційного фактору $ROR\gamma t$, показало достовірне зниження її у $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитах та лімфобластах, а при

5-ти тижневому ЕСІЦД – лише у ROR γ t⁺-лімфобластах на 30 % (p<0,05) у порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 5.7). У м'якотних тяжах ПЛВ відбулось підвищення показників концентрації транскрипційного фактору ROR γ t у лімфобластах як при 3-х тижневому ЕСІЦД так і при 5-ти тижневому ЕСІЦД на 32 % (p<0,05) і 40 % (p<0,05), та зниження у малих лімфоцитах на 9 % (p<0,05) і 11 % (p<0,05) відповідно (табл. 5.8).

Таблиця 5.7

Концентрація транскрипційного фактору ROR γ t⁺ (УО_{IФ}) в лімфоцитах у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).

Серії	ROR γ t ⁺ лімфобласти	ROR γ t ⁺ середні лімфоцити	ROR γ t ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,818±0,021	0,321±0,004	0,141±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,728±0,019 ¹	0,312±0,002	0,131±0,001 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,567±0,022 ¹	0,330±0,008	0,143±0,006
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,694±0,020	0,315±0,002	0,140±0,001 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,804±0,020 ³	0,323±0,003	0,145±0,002

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹);

2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Ведення метформіну при 3-х тижневому ЕСІЦД призвело до підвищення концентрації ROR γ t тільки у ROR γ t⁺-малих лімфоцитах паракортикальної зони на 7 % (p<0,05); та значному підвищенню у ROR γ t⁺-лімфобластах при 5-ти тижневому ЕСІЦД – на 42 % (p<0,05) (див. табл. 5.7). У м'якотних тяжах ПЛВ у цих же експериментальних групах при 5-ти тижневому ЕСІЦД

підвищилась концентрація транскрипційного фактору $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ у малих та середніх лімфоцитах (див. табл. 5.8).

Таблиця 5.8

Концентрація транскрипційного фактору $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ ($\text{УО}_{\text{ЛФ}}$) в лімфоцитах у м'якотних тяжах ПЛВ ($\text{M} \pm \text{m}$).

Серії	$\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ лімфобласти	$\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ середні лімфоцити	$\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ малі лімфоцити
контроль	$0,608 \pm 0,019$	$0,320 \pm 0,003$	$0,145 \pm 0,002$
ЕСІЦД 3-х тижневий	$0,806 \pm 0,022^1$	$0,314 \pm 0,003$	$0,132 \pm 0,001^1$
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$0,854 \pm 0,025^1$	$0,311 \pm 0,003$	$0,129 \pm 0,001^1$
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$0,775 \pm 0,02$	$0,311 \pm 0,002$	$0,134 \pm 0,001$
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$0,803 \pm 0,013$	$0,328 \pm 0,003^3$	$0,144 \pm 0,002^3$

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

5.4. Аналіз клітинного складу Foxp3^+ -лімфоцитів в ПЛВ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів з діабетом, попередньо інкубованих з ПКАТ до Foxp3 , показав, що розвиток 3-х тижневого ЕСІЦД призвів до змін кількості Foxp3^+ -лімфоцитів в обох досліджуваних морфофункціональних зонах. Зокрема, сумарна щільність Foxp3^+ -лімфоцитів зменшилась на 25 % ($p < 0,05$) у паракортикальній зоні (табл. 5.9) та на 28 % ($p < 0,05$) у м'якотних тяжах (табл. 5.10) у порівнянні з контрольною групою (рис. 5.2). Ці ж показники у групі щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД зменшилися на 50 % ($p < 0,05$) лише в м'якотних тяжах ПЛВ. Вивчення розподілу окремих класів Foxp3^+ -

лімфоцитів в групі експериментальних тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД засвідчило збільшення в м'якотних тяжах відсоткової частки Foxp3⁺-лімфобластів на 40 % (p<0,05), Foxp3⁺-середніх лімфоцитів на 42 % (p<0,05) відповідно, проте відсоткова частка Foxp3⁺-малих лімфоцитів зменшилась на 21 % (p<0,05). При цьому щільність популяції Foxp3⁺-малих лімфоцитів в м'якотних тяжах зменшилась на 42 % (p<0,05) (див. табл. 5.10). Розвиток 5-ти тижневого ЕСІЦД призвів до зменшення щільності популяції імунопозитивних лімфоцитів лише у м'якотних тяжах ПЛВ: Foxp3⁺-лімфобластів на 38 % (p<0,05), Foxp3⁺-середніх лімфоцитів на 60 % (p<0,05) і Foxp3⁺-малих лімфоцитів на 50 % (p<0,05) у порівнянні з контрольною групою (див. табл. 5.10).

Після введення метформіну зміни відбулись тільки у щурів з 3-х тижневим ЕСІЦД: сумарна щільність Foxp3⁺-лімфоцитів зросла майже вдвічі в обох досліджуваних морфофункціональних зонах у порівнянні з групою тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД (див. табл. 5.9 і 5.10). Аналіз розподілу окремих класів Treg у паракортикальній зоні ПЛВ продемонстрував, що на 3-й тиждень щільність популяції Foxp3⁺-лімфобластів збільшилась на 83 % (p<0,05), Foxp3⁺-середніх та Foxp3⁺-малих лімфоцитів в 2 рази (p<0,05) (див. табл. 5.9).

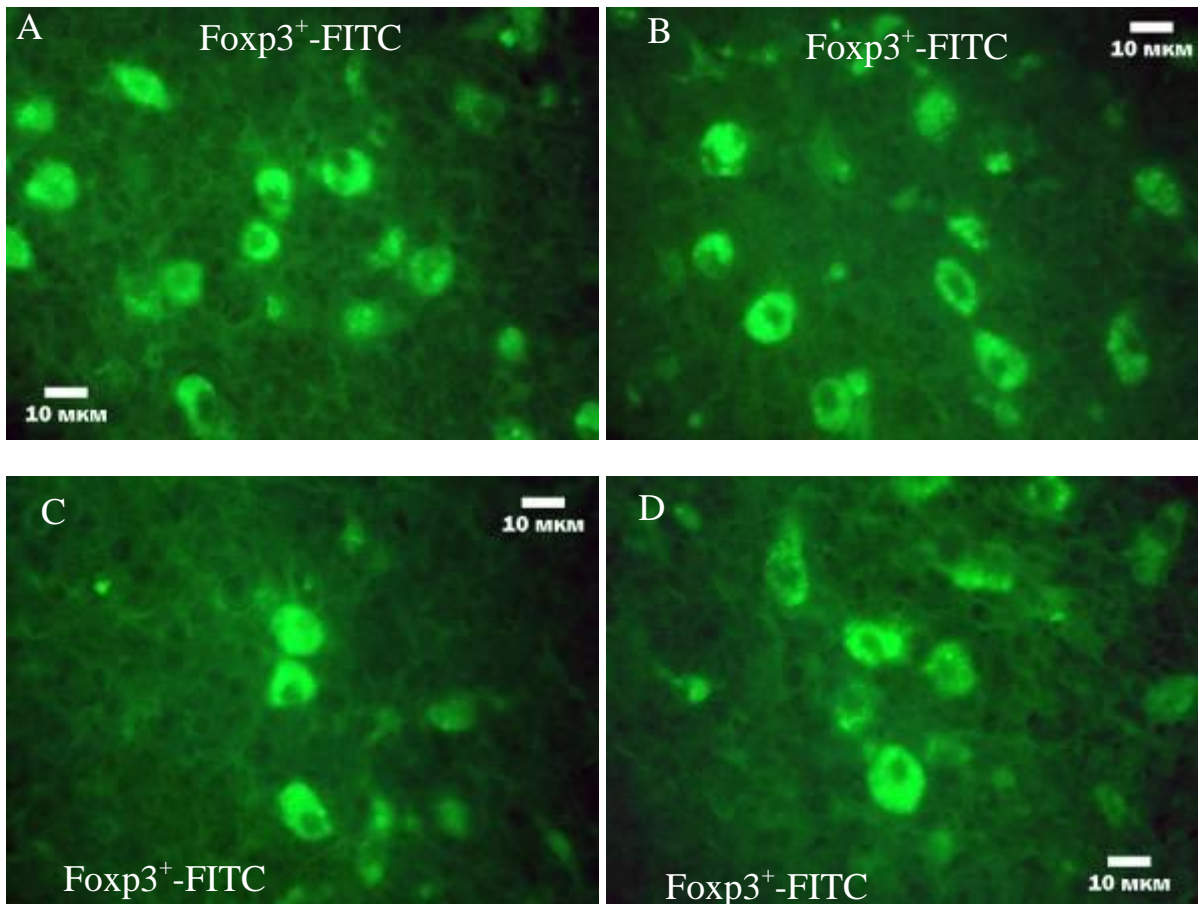


Рис. 5.2 Foxp3⁺-лімфоцити у паракортикальній зоні ПЛВ щурів з 3-тижневим ЕСЦД. Реакція непрямой імунофлюоресценції з ПКАТ до Foxp3. Контроль (А-В), 3-тижневий ЕСЦД (С, D).

У м'якотних тяжках ПЛВ після введення метформіну на 3-й тиждень спостерігалось збільшення щільності популяції Foxp3⁺-лімфобластів на 46 % ($p < 0,05$) і Foxp3⁺-малих лімфоцитів в 2,7 рази ($p < 0,05$), при цьому відсоткова частка Foxp3⁺-середніх лімфоцитів зменшилась на 52 % ($p < 0,05$), проте Foxp3⁺-малих лімфоцитів, навпаки, збільшилась на 35 % ($p < 0,05$) у порівнянні з тваринами з цукровим діабетом (див. табл. 5.10).

Таблиця 5.9

Кількість Foxp3⁺ - клітин у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).

Серії	Foxp3 ⁺ лімфобласти	Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність Foxp3 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{9 \pm 1}{22,7 \pm 3,4 \%}$	$\frac{7 \pm 1}{16,4 \pm 2,6 \%}$	$\frac{25 \pm 3}{60,8 \pm 6,5 \%}$	41 ± 3
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{6 \pm 1}{20,2 \pm 2,2 \%}$	$\frac{5 \pm 1}{17,4 \pm 2,3 \%}$	$\frac{19 \pm 2}{62,3 \pm 7,8 \%}$	31 ± 3 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{8 \pm 1}{23,7 \pm 2,2 \%}$	$\frac{5 \pm 1}{13,9 \pm 1,7 \%}$	$\frac{21 \pm 2}{62,3 \pm 6,5 \%}$	34 ± 3
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{11 \pm 1^2}{18,1 \pm 1,5 \%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{15,1 \pm 1,5 \%}$	$\frac{41 \pm 4^2}{66,6 \pm 6,1 \%}$	61 ± 4 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{7 \pm 1}{20,3 \pm 1,6 \%}$	$\frac{6 \pm 1}{16,8 \pm 1,6 \%}$	$\frac{22 \pm 2}{62,8 \pm 5,3 \%}$	35 ± 2

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції Foxp3⁺ лімфоцитів (на 1мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів Foxp3⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Вимірювання інтенсивності флуоресценції імунопозитивних клітин, що відображує концентрацію транскрипційного фактору Foxp3, показало відсутність змін в паракортикальній зоні (табл. 5.11) ПЛВ і її підвищення у лімфоцитах м'якотних тяжів при розвитку як 3-х тижневого, так і 5-ти тижневого ЕСІЦД (табл. 5.12). Введення метформіну призвело до зниження концентрації транскрипційного фактору Foxp3 у м'якотних тяжках ПЛВ у Treg-середніх та малих лімфоцитах і підвищення на 10 % ($p < 0,05$) у Treg-лімобластів у порівнянні з групою тварин з 3-х тижневим ЕСІЦД, що не зазнали впливу метформіну (див. табл. 5.12). У тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД,

яким вводили метформін, концентрація транскрипційного фактору підвищилась тільки в малих лімфоцитах паракортикальної зони ПЛВ (див. табл. 5.11).

Таблиця 5.10

Кількість Foxp3⁺ - клітин у м'якотних тяжах ПЛВ (M ± m).

Серії	Foxp3 ⁺ лімфобласти	Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність Foxp3 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{13 \pm 1}{15,5 \pm 1,1} \%$	$\frac{15 \pm 1}{17,5 \pm 1,2} \%$	$\frac{57 \pm 4}{66,9 \pm 4,2} \%$	85 ± 5
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{13 \pm 1}{21,8 \pm 2,4} \%^1$	$\frac{16 \pm 1}{25 \pm 2,1} \%^1$	$\frac{33 \pm 3^1}{52,9 \pm 4,8} \%^1$	62 ± 5 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{8 \pm 1^1}{18,1 \pm 2,1} \%$	$\frac{6 \pm 1^1}{15 \pm 1,8} \%$	$\frac{29 \pm 3^1}{66,8 \pm 7,8} \%$	43 ± 5 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{19 \pm 2^2}{16,2 \pm 1,6} \%$	$\frac{14 \pm 2}{11,8 \pm 1,5} \%^{1,2}$	$\frac{88 \pm 10^2}{71,9 \pm 8,1} \%^2$	120 ± 12 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{7,5 \pm 1}{20 \pm 1,5} \%^1$	$\frac{6 \pm 1}{15,2 \pm 2,2} \%$	$\frac{24 \pm 2}{64,6 \pm 5,7} \%$	37 ± 3

Примітки: 1. чисельник – щільність популяції Foxp3⁺ лімфоцитів (на 1мм²),

2. знаменник – відсоткова частка окремих класів Foxp3⁺ лімфоцитів;

3. достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до контролю (¹);

4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Таблиця 5.11

**Концентрація транскрипційного фактору Foxp3⁺ (УО_{1Ф}) в лімфоцитах
у паракортикальній зоні ПЛВ (M ± m).**

Серії	Foxp3 ⁺ лімфобласти	Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,698±0,038	0,3±0,009	0,132±0,003
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,703±0,020	0,313±0,003	0,137±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,731±0,019	0,308±0,003	0,134±0,002
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,726±0,027	0,312±0,003	0,134±0,002
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,752±0,028	0,317±0,004	0,142±0,002 ³

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Таблиця 5.12

**Концентрація транскрипційного фактору Foxp3⁺ (УО_{1Ф}) в лімфоцитах
у м'якотних тяжях ПЛВ (M ± m).**

Серії	Foxp3 ⁺ лімфобласти	Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ малі лімфоцити
1	2	3	4
контроль	0,637±0,013	0,306±0,002	0,135±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,639±0,016	0,323±0,002 ¹	0,145±0,001 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,694±0,017 ¹	0,313±0,002 ¹	0,140±0,001 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,702±0,02 ²	0,313±0,003 ²	0,127±0,001 ²

Продовження таблиці 5.12

1	2	3	4
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,393±0,043	0,319±0,004	0,140±0,002

Примітки: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
 2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Результати проведених досліджень показали, що: 1. В умовах діабету в ПЛВ щурів знижується рівень транскрипційної активності регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів Aire та Deaf1. Зокрема, експресія Deaf1 зменшилась в 4,2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-х тижневим ЕСІЦД і в 2,5 рази ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД порівняно з контрольною групою. Експресія Aire зменшилась в 2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-тижневим ЕСІЦД і в 50 разів ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД.

2. Розвиток ЕСІЦД супроводжується змінами розподілу субпопуляцій Т-хелперів в ПЛВ щурів: сумарна щільність Tbet⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ зросла на 56 %-87 %, у м'якотних тяжках ПЛВ ці ж показники збільшились в 2,3 рази і на 68 % у порівнянні з контрольною групою; загальна кількість Т-хелперів 17 типу у паракортикальній зоні ПЛВ підвищувалась в 2,6 разів на 3-й тиждень і на 46 % на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД, у м'якотних тяжках ПЛВ – на 65 %-69 % відповідно. Тобто, зростання чисельності Th1 більш виразним було у м'якотних тяжках, Th17 – у паракортикальній зоні ПЛВ. Діабет різноспрямовано впливає на концентрацію транскрипційних факторів Tbet і RORγt в імунних клітинах. Це супроводжується зменшенням сумарної щільності субпопуляції Т-регуляторних клітин в ПЛВ на 3-й тиждень ЕСІЦД на 25 %-28 %, на 5-й – на 50 % лише в м'якотних тяжках, призводить до змін розподілу окремих класів Treg-лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію транскрипційного фактору FOXP3 в імунопозитивних клітинах м'якотних тяжків.

3. Отримані результати демонструють здатність метформіну збільшувати кількість Treg в ПЛВ, причому ці ефекти виражені на 3 тиждень розвитку діабету (в 2 рази) і нівелюються до 5 тижня перебігу патологічного процесу. Введення метформіну майже не впливає на розподіл Th1-клітин у ПЛВ, за винятком паракортикальної зони у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД, де їх сумарна щільність знижується на 48 %, зменшує чисельність Th17-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 3-й тиждень (на 48 %), а у м'якотних тяжках – на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД (на 27 %).

Результати наведених в даному розділі досліджень представлені в таких наукових публікаціях: [173-177].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ЕКСПРЕСІЇ TLR-2 І TLR-4 АДИПОЦИТАМИ І РІВНЯ ТРАНСКРИПТІВ ГЕНІВ *MTOR*, *FOXP3*, *IL1B* І *IL17A* У ПЖТ ПРИ ЕСІЦД І ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ

Адиipoцити людини та гризунів експресують практично весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів [42], а жирова тканина (ЖТ) містить цілі кластери клітин вродженої та адаптивної імунної системи [43], які інфільтрують адиipoцити та від балансу яких залежить рівень прозапальної сигналізації в ЖТ та продукція таких цитокінів як *IL1 β* , *IL17A*, *TNF α* (tumor necrosis factor α), *IFN γ* (interferon- γ), здатних безпосередньо впливати на прогресію інсуліту [44]. Зважаючи на це, у представленій главі наведені результати досліджень особливостей розподілу у ПЖТ адиipoцитів, експресуючих TLR-2 і TLR-4 і відносного рівня мРНК генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у ПЖТ при ЕСІЦД і після введення метформіну. Характер розподілу TLR-2⁺ і TLR-4⁺-адиipoцитів досліджували за допомогою програм AxioVision4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (NIH, США), проведено аналіз морфометричних і денситометричних характеристик жирових клітин, при цьому досліджуваними параметрами були: щільність популяції відповідних адиipoцитів, їх частка в структурі популяції жирових клітин та щільність TLR-2 і TLR-4 на мембрані адиipoцитів. Виділення тотальної РНК проводили з допомогою „Trizol RNA Prep100” (Ізоген Lab., LTD, РФ); для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 "Синтол" (РФ). Для визначення рівня експресії мРНК генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у ПЖТ проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Відносний рівень експресії вищевказаних генів оцінювали за методом $\Delta\Delta C_t$, нормалізуючи за референс-геном *GAPDH*.

6.1. Розподіл TLR-2 і TLR-4 серед адипоцитів ПЖТ

Вивчення серійних зрізів ПЖТ щурів показало, що розвиток 3-х тижневого ЕСЦД супроводжується збільшенням сумарної щільності популяції TLR2⁺-адипоцитів в 2,5 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з контролем, в той час як цей же показник при 5-ти тижневому ЕСЦД збільшився на 77 % ($p < 0,05$) відносно контролю (табл. 6.1, рис. 6.1 А-В).

Розвиток 3-х тижневого ЕСЦД супроводжувався збільшенням кількості всіх класів TLR2⁺-адипоцитів: великих – в 3,7 рази ($p < 0,05$); середніх та малих – в 1,9 разів ($p < 0,05$) відповідно, відносно контролю. При цьому в структурі популяції жирових клітин збільшилась лише відсоткова частка великих адипоцитів – на 46 % ($p < 0,05$) відносно контролю (див. табл. 6.1).

При розвитку 5-ти тижневого ЕСЦД зросла кількість (у 3,5 рази, $p < 0,05$) і відсоткова частка (в 1,9 рази, $p < 0,05$) TLR2⁺-великих адипоцитів, тоді як частка середніх та малих – зменшилась в 1,8 ($p < 0,05$) і 2,4 рази ($p < 0,05$) відповідно (див. табл. 6.1).

Після введення тваринам з 3-х тижневим ЕСЦД і 5-ти тижневим ЕСЦД метформіну сумарна щільність TLR2⁺-адипоцитів знизилася на 16 % ($p < 0,05$) та на 24 % ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з тваринами з цукровим діабетом. Щодо розподілу окремих класів адипоцитів в цих групах було виявлено наступне: 1) в групі з 3-х тижневим ЕСЦД – зменшення кількості TLR2⁺-малих адипоцитів в 1,8 разів ($p < 0,05$); збільшення відсоткової частки TLR2⁺-великих адипоцитів на 16 % ($p < 0,05$) та зменшення відсоткової частки TLR2⁺-малих адипоцитів на 46 % ($p < 0,05$) відповідно в порівнянні з тваринами з цукровим діабетом; 2) в групі з 5-ти тижневим ЕСЦД – зменшення щільності популяції TLR2⁺-великих адипоцитів в 2 рази ($p < 0,05$); зменшення відсоткової частки TLR2⁺-великих адипоцитів на 54 % ($p < 0,05$), збільшення відсоткової частки TLR2⁺-середніх та малих адипоцитів на 60 % і в 1,9 разів ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з тваринами з цукровим діабетом (див. табл. 6.1).

Таблиця 6.1

Кількість TLR2⁺-адипоцитів у ПЖТ щурів лінії Wistar (M± m).

Серії	TLR2 ⁺ великі адипоцити	TLR2 ⁺ середні адипоцити	TLR2 ⁺ малі адипоцити	Сумарна щільність TLR2 ⁺ -адипоцитів
контроль	$\frac{17 \pm 2}{33,7 \pm 4,4 \%}$	$\frac{22 \pm 3}{42,8 \pm 5,8 \%}$	$\frac{12 \pm 2}{23,6 \pm 3,4 \%}$	52±7
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{63 \pm 3^1}{49,3 \pm 2,6 \%^1}$	$\frac{42 \pm 3^1}{32,6 \pm 2,7 \%}$	$\frac{23 \pm 3^1}{18,1 \pm 2,0 \%}$	128±4 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{61 \pm 4^1}{66,3 \pm 4,3 \%^1}$	$\frac{22 \pm 3}{23,9 \pm 2,6 \%^1}$	$\frac{9 \pm 2}{9,8 \pm 2,7 \%^1}$	92±6 ¹
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{63 \pm 3}{58,5 \pm 3,2 \%^2}$	$\frac{32 \pm 3}{29,2 \pm 3,6 \%}$	$\frac{13 \pm 2^2}{12,3 \pm 1,8 \%^2}$	108±8 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{30 \pm 3^3}{42,8 \pm 4,3 \%^3}$	$\frac{27 \pm 3}{38,6 \pm 3,9 \%^3}$	$\frac{13 \pm 2}{18,6 \pm 2,4 \%^3}$	70±6 ³

Примітка: 1. чисельник – щільність популяції адипоцитів (на 3мм²),
 2. знаменник – процентна частка окремих класів адипоцитів;
 3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
 4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції TLR2-рецепторів на поверхні адипоцитів при 3-х тижневому ЕСІЦД показало достовірне зростання даного параметру серед великих адипоцитів на 18 % ($p < 0,05$); середніх – на 13 % ($p < 0,05$) відносно контролю. Введення тваринам з 3-х тижневим ЕСІЦД метформіну призвело до зниження щільності TLR2 на поверхні жирових клітин всіх класів (табл. 6.1).

В умовах 5-ти тижневого ЕСІЦД зростала щільність TLR2 лише на поверхні великих адипоцитів (в 9,3 разів, $p < 0,05$) в порівнянні з контролем, а введення тваринам з 5-ти тижневим ЕСІЦД метформіну призвело до зниження щільності TLR2 на поверхні великих адипоцитів (в 11 разів, $p < 0,05$), та на

поверхні середніх адипоцитів – на 18 % ($p < 0,05$), в порівнянні з тваринами з цукровим діабетом (див. табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Щільність TLR2 (УО_{1Ф}) на адипоцитах у ПЖТ щурів лінії Wistar (M± m).

Серії	TLR2 ⁺ великі адипоцити	TLR2 ⁺ середні адипоцити	TLR2 ⁺ малі адипоцити
контроль	0,104±0,006	0,049±0,001	0,023±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,128±0,001 ¹	0,056±0,001 ¹	0,025±0,001
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,97±0,05 ¹	0,044±0,001	0,02±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,117±0,002 ²	0,044±0,001 ²	0,022±0,001 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,081±0,001 ³	0,037±0,001 ³	0,02±0,001

Примітка: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Вивчення серійних зрізів парапанкреатичної жирової клітковини щурів, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4, показало, що розвиток 3-х тижневого ЕСІЦД супроводжувався збільшенням сумарної щільності популяції TLR4⁺-адипоцитів в 1,9 разів ($p < 0,05$), але до 5 тижня розвитку патологічного процесу цей показник повертався до рівня контролю (табл. 6.3, рис. 6.1 С, D, E, F). При введенні метформіну тваринам з 3-х тижневим ЕСІЦД сумарна щільність популяції TLR4⁺-адипоцитів зменшилась в 1,6 разів ($p < 0,05$) в порівнянні з 3-х тижневим ЕСІЦД.

Таблиця 6.3

Кількість TLR4⁺-адипоцитів у ПЖТ щурів лінії Wistar (M± m).

Серії	TLR4 ⁺ великі адипоцити	TLR4 ⁺ середні адипоцити	TLR4 ⁺ малі адипоцити	Сумарна щільність TLR4 ⁺ адипоцитів
контроль	$\frac{34 \pm 4}{56,7 \pm 6,4 \%}$	$\frac{19 \pm 3}{31,4 \pm 4,6 \%}$	$\frac{7 \pm 1}{11,9 \pm 2,1 \%}$	60±7
ЕСІЦД 3-х тижневий	$\frac{63 \pm 2^1}{53,6 \pm 1,9 \%}$	$\frac{40 \pm 3^1}{33,7 \pm 2,9 \%}$	$\frac{15 \pm 2^1}{12,7 \pm 1,9 \%}$	117±5 ¹
ЕСІЦД 5-ти тижневий	$\frac{47 \pm 2^1}{73,7 \pm 3,1 \%}^1$	$\frac{11 \pm 1^1}{17,4 \pm 2,1 \%}^1$	$\frac{6 \pm 1}{8,9 \pm 2,1 \%}$	64±2
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	$\frac{42 \pm 4^2}{55,6 \pm 6,1 \%}$	$\frac{24 \pm 3^2}{31,9 \pm 4,2 \%}$	$\frac{9 \pm 2}{12,4 \pm 3,1 \%}$	75±8 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	$\frac{47 \pm 4}{66,9 \pm 5,5 \%}$	$\frac{17 \pm 2^3}{23,8 \pm 2,8 \%}$	$\frac{6,4 \pm 1}{9,3 \pm 1,8 \%}$	70±6

Примітка: 1. чисельник – щільність популяції адипоцитів (на 3мм²),
 2. знаменник – процентна частка окремих класів адипоцитів;
 3. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);
 4. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);
 5. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

Розвиток 3-х тижневого ЕСІЦД супроводжувався збільшенням кількості всіх класів жирових клітин: TLR4⁺-великих адипоцитів – в 1,8 разів ($p < 0,05$); середніх та малих – в 2,1 ($p < 0,05$) рази відповідно, відносно контролю при стабільності структури їх популяції (див. табл. 6.3). Розвиток 5-ти тижневого ЕСІЦД супроводжувався: збільшенням кількості та відсоткової частки TLR4⁺-великих адипоцитів – на 28 % ($p < 0,05$) та на 23 % ($p < 0,05$) відповідно до контролю; зменшенням кількості і відсоткової частки TLR4⁺-середніх адипоцитів – в 1,7 ($p < 0,05$) – 1,8 разів ($p < 0,05$) відповідно. Після введення тваринам з 3-х тижневим ЕСІЦД метформіну було виявлено зменшення кількості TLR4⁺-великих та TLR4⁺-середніх адипоцитів в 1,5 ($p < 0,05$) і 1,7 разів

($p < 0,05$) відповідно в порівнянні з тваринами з цукровим діабетом (див. табл. 6.3).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції TLR4-рецепторів на поверхні адипоцитів при 3-х тижневому ЕСІЦД показало достовірне зниження даного параметру на великих адипоцитах на 13 % ($p < 0,05$), відносно контролю (табл. 6.4). В той час як цей же показник серед великих адипоцитів при 5-ти тижневому ЕСІЦД зріс на 25 % ($p < 0,05$), відносно контролю. Введення тваринам з 3-х тижневим ЕСІЦД метформіну призвело до зниження щільності TLR4 на поверхні всіх класів жирових клітин: на TLR4⁺-великих адипоцитах на 11 % ($p < 0,05$), на TLR4⁺ середніх – на 16 % ($p < 0,05$), на TLR4⁺ малих – в 2,3 рази ($p < 0,05$), в порівнянні з тваринами з цукровим діабетом. При введенні тваринам з 5-ти тижневим ЕСІЦД метформіну достовірні зміни відбулись тільки на великих адипоцитах – щільність TLR4 на їх поверхні зменшилась на 16 % ($p < 0,05$), в порівнянні з тваринами з цукровим діабетом (див. табл. 6.4).

Таблиця 6.4

Щільність TLR4 (УО_{1Ф}) на адипоцитах ПЖТ у щурів лінії Wistar (M± m).

Серії	TLR4 ⁺ великі адипоцити	TLR4 ⁺ середні адипоцити	TLR4 ⁺ малі адипоцити
контроль	0,12±0,002	0,05±0,001	0,023±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий	0,106±0,002 ¹	0,049±0,001	0,023±0,001
ЕСІЦД 5-ти тижневий	0,159±0,003 ¹	0,052±0,001	0,023±0,001
ЕСІЦД 3-х тижневий + метформін	0,095±0,002 ²	0,042±0,001 ²	0,01±0,001 ²
ЕСІЦД 5-ти тижневий + метформін	0,137±0,002 ³	0,053±0,001	0,024±0,001

Примітка: 1. достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹);

2. по відношенню до 3-х тижневого ЕСІЦД (²);

3. по відношенню до 5-ти тижневого ЕСІЦД (³).

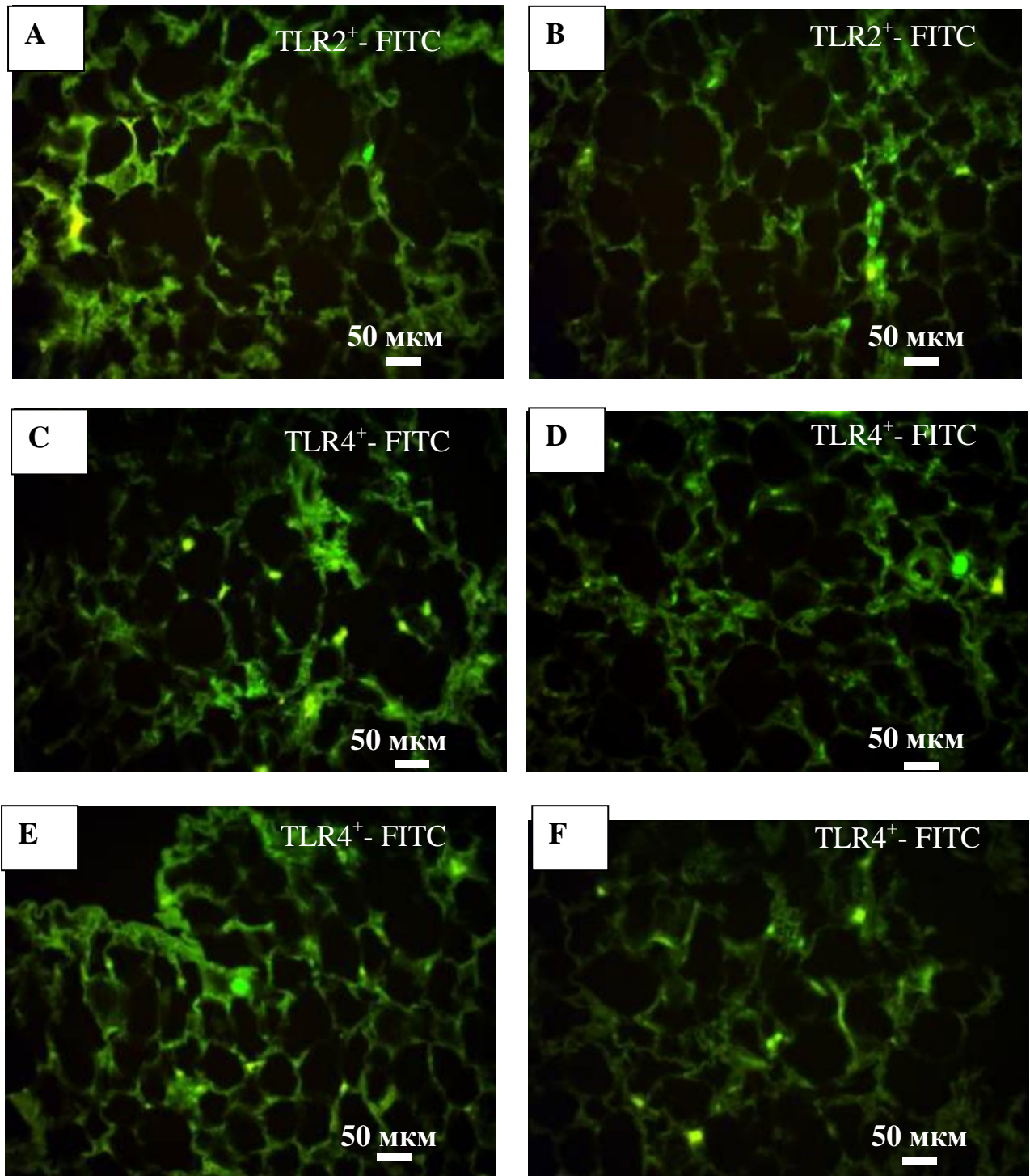


Рис. 6.1 TLR2⁺-адипоцити (А, В) і TLR4⁺-адипоцити (С, D, Е, F) у ПЖТ щурів з 3-тижневим ЕСІЦД. Реакція прямої імунофлюоресценції з МКАТ до TLR2 і TLR4 щура.

6.2. Дослідження експресії мРНК генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A*

Стрептозотоцин-індуковані метаболічні зміни викликали транскрипційну активацію гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЖТ. Зокрема, розвиток діабету призводив до зростання вмісту мРНК *mTOR* в 6,8 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та в 3,6 разів ($p < 0,05$) на 5-й тиждень патологічного процесу (рис. 6.2 А). Ці зміни не впливали на експресію мРНК транскрипційного регулятора диференціювання Т-регуляторних клітин *Foxp3* на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижували її в 4,6 разів ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСІЦД (рис. 6.2 В) порівняно з контрольною групою щурів. Виявлене нами раніше зростання кількості $TLR2^+$ - та $TLR4^+$ -адипоцитів та щільності їх рецепторів на мембрані жирових клітин у парапанкреатичній клітковині закономірно індукує прозапальну сигналізацію. Так, рівень експресії мРНК прозапального цитокіну *IL1 β* збільшувався в 77,7 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та 51,3 рази ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (рис. 6.3 А), а Th17-залежного цитокіну *IL17A* відповідно у 23,5 ($p < 0,05$) та 5,5 разів ($p < 0,05$) (рис. 6.3 В).

Введення метформіну щурам з цукровим діабетом пригнічувало експресію *mTOR*: ми спостерігали зменшення рівня мРНК мішені рапаміцина в ПЖТ у 4,5 рази ($p < 0,05$) при 3-х тижневому та в 5,9 разів ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСІЦД (рис. 6.4 А-В). Така транскрипційна репресія *mTOR* призводила до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Treg-клітинах ПЖТ. Так, відносна нормалізована кількість мРНК гену *Foxp3* збільшувалась на 80 % ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та в 3,1 рази ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (рис. 6.5 А-В).

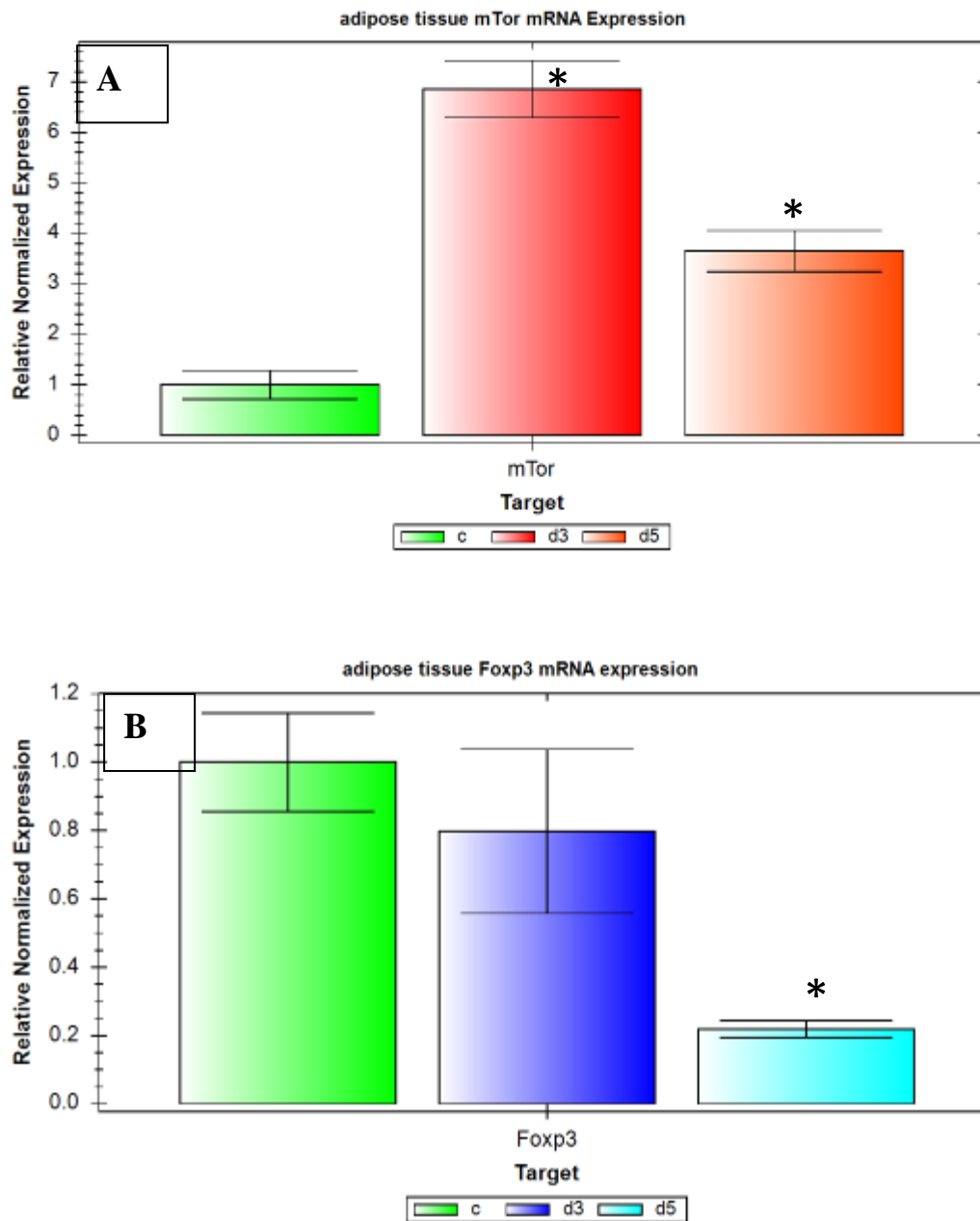


Рис. 6.2 Відносна нормалізована кількість мРНК генів *mTOR* (A) і *Foxp3* (B) в парапанкреатичній клітковині. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. c-контроль; d3, d5 – діабет 3 і 5 тижнів. * — $p < 0.05$

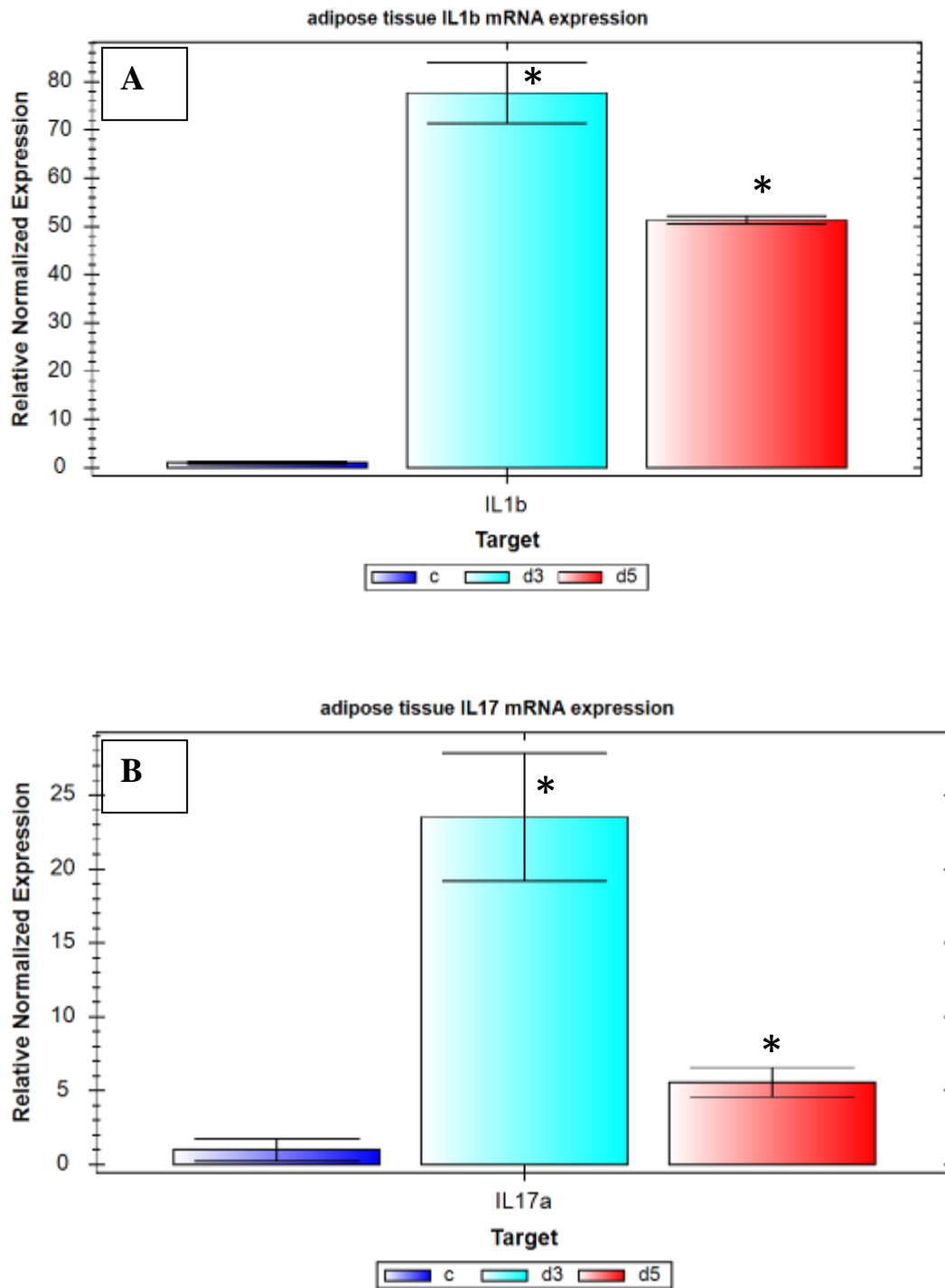


Рис. 6.3 Відносна нормалізована кількість мРНК генів *IL1 β* (A) і *IL17A* (B) в парапанкреатичній клітковині. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном *GAPDH*. c-контроль; d3, d5 – діабет 3 і 5 тижнів. * – $p < 0.05$

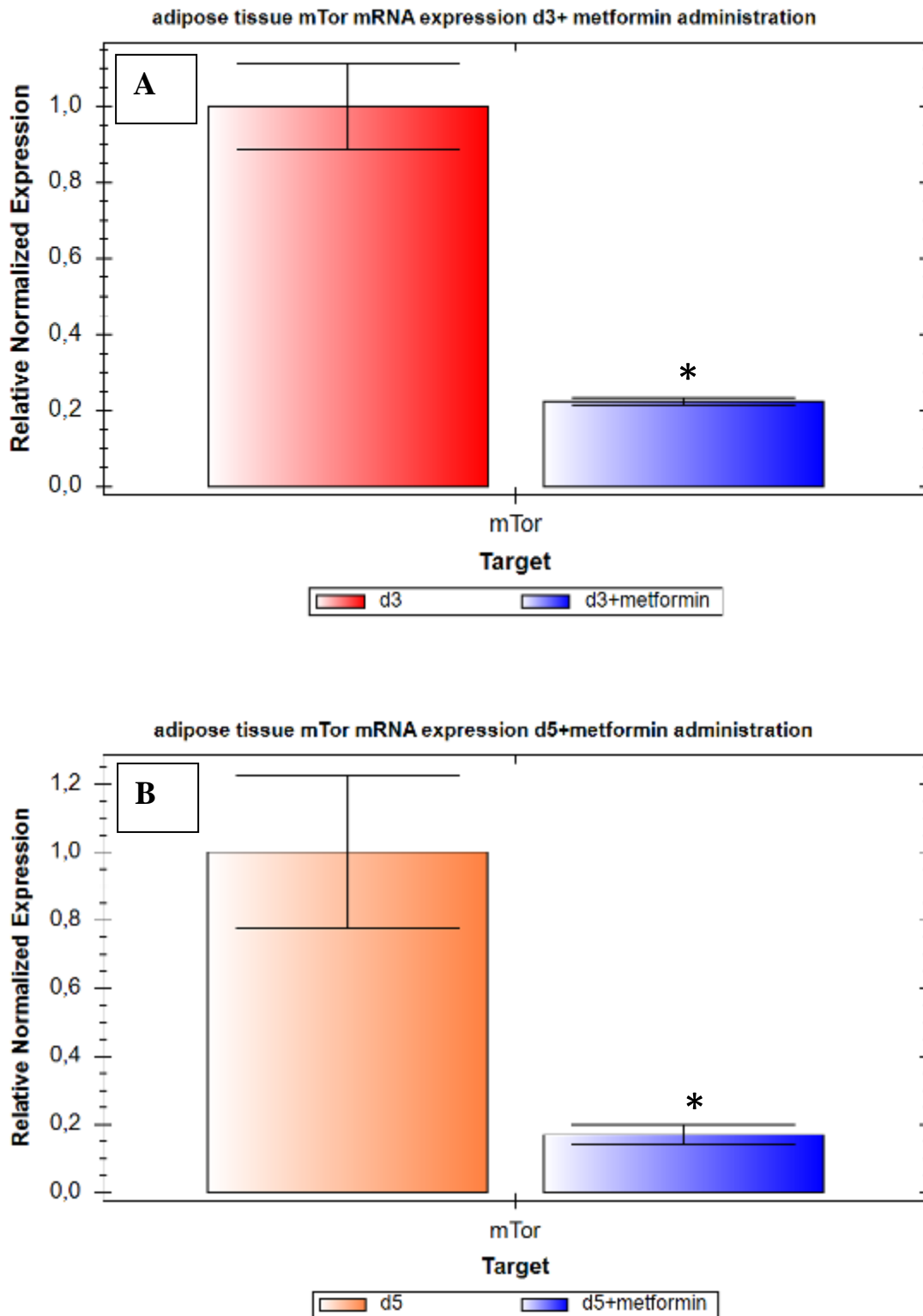


Рис. 6.4 Відносна нормалізована кількість мРНК гену *mTOR* (А-В) в парапанкреатичній клітковині після введення метформіну щурам з цукровим діабетом. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. с-контроль; d3, d5 – діабет 3 і 5 тижнів. * – $p < 0.05$

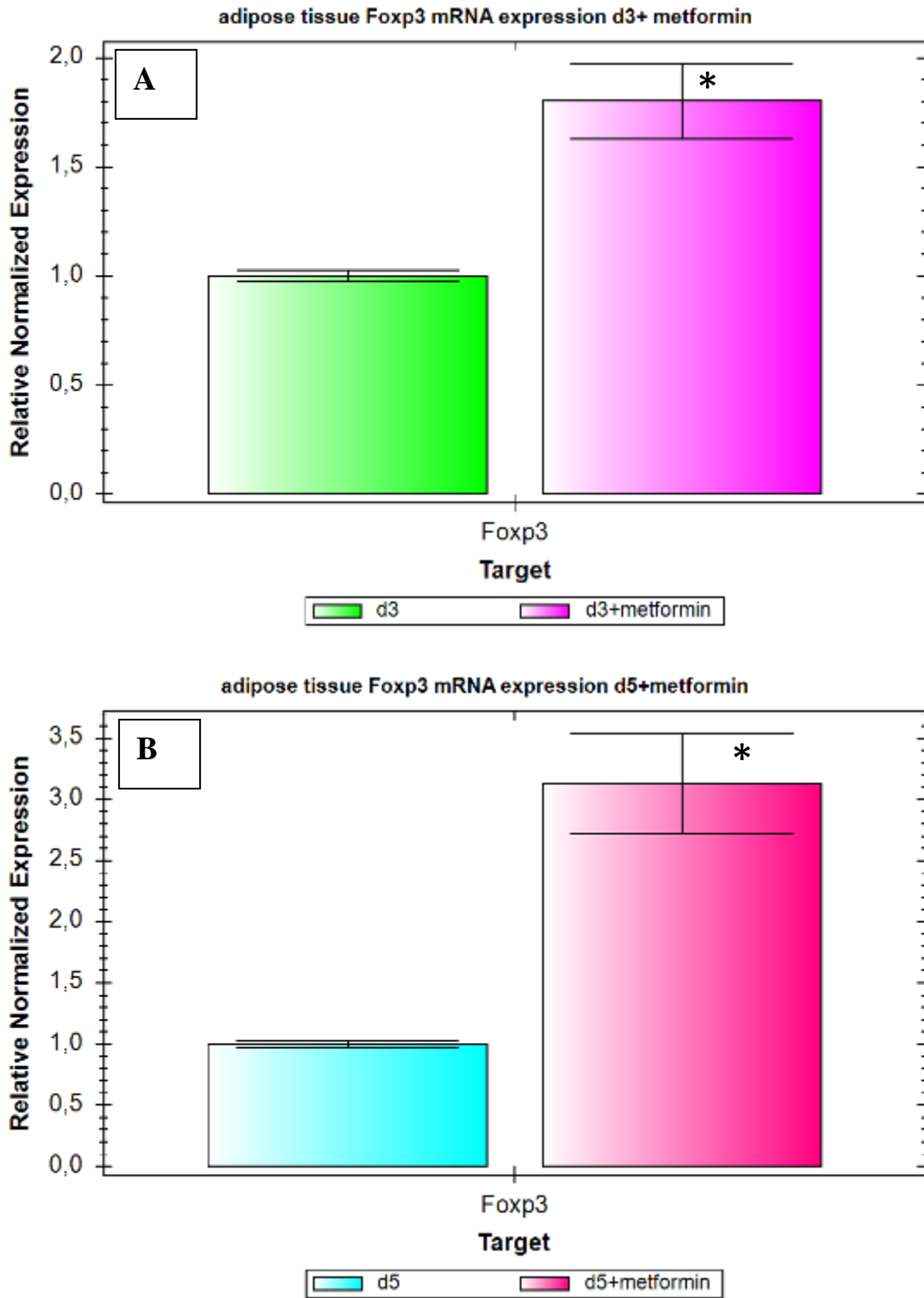


Рис. 6.5 Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Foxp3* (А-В) в парапанкреатичній клітковині після введення метформіну щурам з цукровим діабетом. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном *GAPDH*. с-контроль; d3, d5 – діабет 3 і 5 тижнів. * – $p < 0.05$

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що:

1. Індукція діабету збільшує кількість TLR2⁺- (на 3-й тиждень ЕСІЦД – в 2,5 рази, на 5-й – на 77 %) та TLR4⁺ – адипоцитів (на 3-й тиждень ЕСІЦД – в 1,9 разів), переважно підвищує щільність TLR2- і TLR4-рецепторів на їх мембрані, що свідчить про активацію прозапальної сигналізації в ПЖТ. Введенням метформіну щурам з цукровим діабетом знижують загальну кількість TLR2⁺-адипоцитів на 16 %-24 %, TLR4⁺-адипоцитів на 36 % лише на 3-й тиждень ЕСІЦД, супроводжуються зменшенням щільності їх рецепторів на поверхні жирових клітин.

2. Стрептозотоцин-індуковані метаболічні зміни викликають транскрипційну активацію гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЖТ: розвиток діабету призводить до зростання вмісту мРНК *mTOR* в 6,8 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та в 3,6 разів ($p < 0,05$) на 5-й тиждень патологічного процесу. Ці зміни не впливають на експресію мРНК транскрипційного регулятора диференціювання Т-регуляторних клітин *Foxp3* на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижують її в 4,6 разів ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСІЦД порівняно з контрольною групою щурів.

3. Активація ПРР на мембрані жирових клітин у парапанкреатичній жировій клітковині закономірно підвищує рівень експресії мРНК прозапального цитокіну *IL1 β* – в 77,7 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та 51,3 рази ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД, і Th17-залежного цитокіну *IL17A* – відповідно у 23,5 ($p < 0,05$) та 5,5 разів ($p < 0,05$).

4. Введення метформіну щурам з цукровим діабетом пригнічують експресію мРНК *mTOR* в ПЖТ у 4,5 – 5,9 разів ($p < 0,05$). Транскрипційна репресія *mTOR* призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Трег-клітинах ПЖТ – на 80 % ($p < 0,05$) на 3-й тиждень та в 3,1 рази ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД.

Результати досліджень, наведені в даному розділі, висвітлені в наукових публікаціях автора [178-183].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою нашого дослідження було з'ясувати особливості змін функціонального стану лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введень метформіну з допомогою імуофлюоресцентних і молекулярно-генетичних методів.

Для цього ми використовували сучасні патофізіологічні, морфометричні, біохімічні, імуофлюоресцентні (реакція прямої або непрямой імуофлюоресценції з використанням моноклональних або поліклональних антитіл) методи аналізу гістологічного матеріалу, метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз, методи статистичного аналізу отриманих результатів.

На першому етапі дослідження ми вивчили особливості імунометаболізму лімфоцитів шляхом з'ясування рівня мРНК генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α* і розподілу *mTOR*⁺-клітин в панкреатичних лімфатичних вузлах в умовах розвитку експериментального цукрового діабету та після введень метформіну тваринам з цукровим діабетом. Нами було встановлено, що розвиток ЕСЦД викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* (в 9,9-28,9 разів) і протеїнкінази *mTOR* (в 5,3-3,3 рази) в клітинах ПЛВ, не впливає на загальну кількість *mTOR*⁺-клітин в ПЛВ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу і призводить до їх зростання на 5-й тиждень ЕСЦД – на 24 % в паракортикальній зоні і на 34 % в м'якотних тяжках переважно за рахунок збільшення ЩП *mTOR*⁺-малих і середніх лімфоцитів.

Отримані результати пояснюють, яким чином метаболічні зміни в умовах діабету, а саме гіперглікемія, що при цьому розвивається, здатні підсилювати автоімунну атаку на панкреатичні острівці, призводячи до формування

“порочного” кола. Адже відомо, що CD4⁺T-клітини експресують цілий ряд транспортерів глюкози (Glut), зокрема Glut 1, 3, 6, і 8 [10]. Glut 1, зростання рівня транскрипційної активності якого ми й ідентифікували, функціонує головним чином на активованих, але не на перебуваючих у спокої CD4⁺T-клітинах, а зміна його експресії, напевне, може впливати на рівень диференціювання CD4⁺Th1 і Th17 клітин. Це припущення підтвердилось в наших наступних результатах, які продемонстрували превалювання прозапальних ефекторних субпопуляцій T-хелперів 1 і 17 типу в ПЛВ щурів з ЕСІЦД.

В роботах інших дослідників також було показано, що різні субпопуляції CD4⁺ T-ефекторних і T-регуляторних клітин віддають перевагу гліколітичним або окислювальним метаболічним програмам, що відрізняються, контролюючи рівень поглинання ними глюкози. Незважаючи на експресію різних транспортерів глюкози, дефіцит Glut 1 вибірково порушує метаболізм та функції тимоцитів і T-ефекторних клітин, запобігаючи їх проліферації та зменшуючи виживання та диференціювання [10]. Важливо також те, що дефіцит Glut 1 зменшує експансію ефекторних лімфоцитів та їх здатність викликати запальні захворювання *in vivo*. Клітини Tregs, навпаки, виявились не чутливими до рівня експресії Glut 1 та їх здатність до супресії при цьому не страждала. Таким чином, метаболічні відмінності субпопуляцій лімфоцитів полягають в тому, що Th1, Th2, та клітини Th17, характеризуються високим рівнем експресії транспортера глюкози Glut 1 і надзвичайно високою здатністю до гліколізу. У Treg, навпаки, низький рівень експресії Glut 1 і висока швидкість окислювального метаболізму. Високий рівень транскрипційної активності Glut 1 в лімфоцитах ПЛВ частково може пояснювати продемонстроване нами зменшення кількості T-регуляторних клітин в умовах ЕСІЦД. Таким чином, впливаючи на метаболічні програми лімфоцитів, можна маніпулювати чисельністю їх окремих субпопуляцій, а знайдений нами дисбаланс у розподілі супресорних Treg і ефекторних Th1- і Th17-лімфоцитів може мати Glut 1-залежне походження. Інші автори показали, що стимуляції

АМР-активованої протеїнкінази було достатньо, щоб зменшити експресію *Glut 1* і збільшити генерацію *Treg* в моделі астми [184].

Поряд з *Glut 1* однією із основних метаболічних детермінант Т-клітинного диференціювання є *mTOR*-сигналізація [185, 186]. Виявлена нами індукція гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЛВ, а також зростання кількості *mTOR*⁺-клітин, вочевидь, також були одним з триггерів превалювання *Th1*- і *Th17*-лімфоцитів в ПЛВ на фоні дефіциту супресорної сигналізації. Таке наше припущення підтверджується й іншими дослідниками, які продемонстрували, що при високій активності *mTOR* відбувається диференціювання наївних *CD4*⁺-клітин в ефекторні прозапальні субпопуляції *Th1*, *Th2*, *Th17*, а також активація цитотоксичних *CD8*⁺-клітин [187]. І навпаки, якщо активність *mTOR* в *CD4*⁺ клітинах низька, то вони диференціюються в *Treg* клітини, які блокують розвиток інсуліту і прогресію діабету [188, 189].

Таким чином, встановлене нами збільшення рівня мРНК генів транспортерів глюкози *Glut 1* та протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЛВ при діабеті є важливим тригером їх диференціювання в ефекторні прозапальні субпопуляції *Th1* і *Th17* (рис. 7.1).

Враховуючи важливу роль *mTOR* в імунометаболізмі лімфоцитів на наступному кроці роботи ми спробували заблокувати його в клітинах ПЛВ з допомогою метформіну, який як і рапаміцин, але більш м'яко, без розвитку імуносупресії, пригнічує активність *mTOR* [162] через АМФ-активуєму протеїнкіназу (АМФК) [190]. Нами встановлено, що введення метформіну щурам з цукровим діабетом призводило до зростання рівня транскрипційної активності АМФ-активуємої протеїнкінази АМПК1 α в ПЛВ. Так, відносна нормалізована кількість мРНК гену *AMPK1 α* збільшувалась на 87 % на 3-й тиждень та майже в 38 разів на 5-й тиждень розвитку ЕСПД. Індукція АМПК1 α закономірно пригнічувала експресію *mTOR*: ми спостерігали зменшення рівня мРНК мішені рапаміцина в ПЛВ у 14,7 разів при 3-х тижневому та в 3 рази при 5-ти тижневому ЕСПД порівняно з контрольною групою щурів. Ці зміни, як в подальшому з'ясувалось, збільшують кількість

Treg в ПЛВ на 3-й тиждень діабету і зменшують чисельність Th17-клітин, що підтверджує залежність диференціювання T-клітин від рівня їх метаболізма.

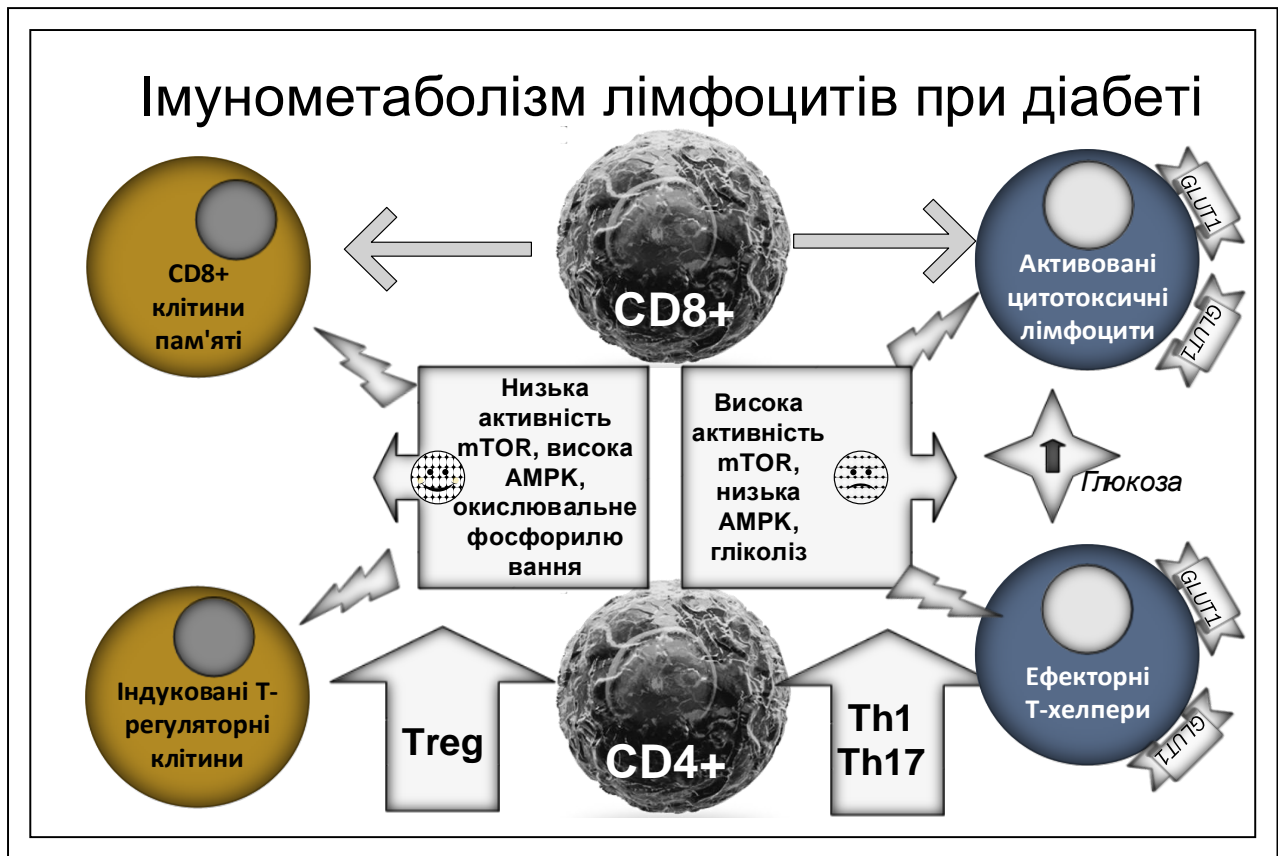


Рис. 7.1 Імунометаболізм лімфоцитів при діабеті.

Цікаво, що сигналізація через mTOR викликає метаболічне перепрограмування лімфоцитів, стимулюючи гліколіз *c-MYC* – залежним шляхом, що підвищує проліферацію імунних клітин [120]. Наші результати співпадають з даними інших дослідників щодо здатності метформіну як АМФК-залежним, так і АМФК-незалежним шляхом [191] впливати на метаболізм лімфоцитів. Так, у T-лімфоцитів АМФК-залежна сигналізація важлива для утворення T-клітин пам'яті в динаміці імунної відповіді [192]. Зокрема, виявлена нами здатність метформіну через активізацію АМФК пригнічувати вироблення ефektorних T-лімфоцитів і стимулювати диференціювання T-регуляторних клітин була підтверджена цілою низкою досліджень [193, 194]. Протизапальні дії метформіну пояснюють його здатність

пригнічувати розвиток автоімунних захворювань [195]. Крім того, метформін інгібує проліферацію і виживання пухлинних клітин в умовах гострого мієлоїдного і Т-клітинного гострого лімфобластного лейкозів [196], впливає на еміграцію Т-клітин з тимуса у пацієнтів з ЦД 2 типу [197]. Kang K. et al. (2013) продемонстрували здатність метформіну зменшувати кількість $ROR\gamma t^+ CD4^+$ Th17-клітин в лімфатичних вузлах у мишей з автоімунним ревматоїдним артритом, знижувати рівень сироваткових прозапальних цитокінів TNF α і IL1 β [193]. Здатність метформіну блокувати активацію Th17-клітин, продукцію IFN- γ і IL-17 була продемонстрована і на моделі системного червоного вовчака [198]. Ефекти метформіну на рівень імунної відповіді також реалізуються через інгібування МНС-рестриктованої презентації антигенів АПК, зокрема шляхом супресії продукції дендритними клітинами ко-стимулюючих факторів, таких як CD54, CD80 і CD86 [199]. В нещодавньому дослідженні Forslund K. et al. (2015) продемонстрована здатність метформіну викликати зміни у кишковому мікробіомі у пацієнтів з ЦД 2 типу, зокрема впливати на продукцію коротколанцюгових жирних кислот [200], які через свої рецептори, зокрема FFAR2 – впливають на диференціювання Т-клітин, особливо Treg. Загалом, встановлене нами зростання рівня мРНК AMPK1 α та пригнічення експресії mTOR в ПЛВ після введення метформіну щурам з цукровим діабетом свідчить про можливість його використання для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД.

Наступним етапом стало оцінити рівень активації компонентів вродженої імунної системи в ПЛВ. Як відомо, адаптивна ланка імунної відповіді без попереднього включення вроджених компонентів, зокрема сигналізації через ППР, взагалі не працює. Ми припустили, що надмірна активація ППР в ПЛВ може суттєво впливати на баланс Т-клітин в цьому регіоні і наступну прогресію інсуліту. Це і обумовило наш вибір дослідження цілої низки РВІ в ПЛВ – як мембранних, так і цитоплазматичних. Ми з'ясували, що розвиток діабету супроводжується зростанням кількості TLR2 $^{+}$ - (на 59 % – в 3,1 рази), TLR4 $^{+}$ - (на 61 % – в 2,1 рази), NOD2 $^{+}$ - (на 38 % – в 2 рази) і RIGI $^{+}$ -лімфоцитів (в

2,4 рази – на 77 %) у паракортикальній зоні і TLR4⁺ (на 60 % на 3-й тиждень) та RIGI⁺-лімфоцитів (на 58 % – в 3,7 рази) у м'якотних тяжках ПЛВ щурів, змінює щільність ПРР на імунних клітинах (рис. 7.2 А-В). Ефекти по зростанню кількості клітин, експресуючих РВІ залежали від тривалості патологічного процесу – збільшення терміну ЕСІЦД викликало сильнішу дію по відношенню до TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺-лімфоцитів в паракортикальній зоні і RIGI⁺-лімфоцитів у м'якотних тяжках ПЛВ щурів. Отримані дані свідчать, що ЕСІЦД призводить до значної активації вродженої імунної системи і це, в свою чергу, може суттєво впливати на рівень активації адаптивної імунної відповіді, диференціювання субпопуляцій хелперних Т-клітин в ПЛВ.

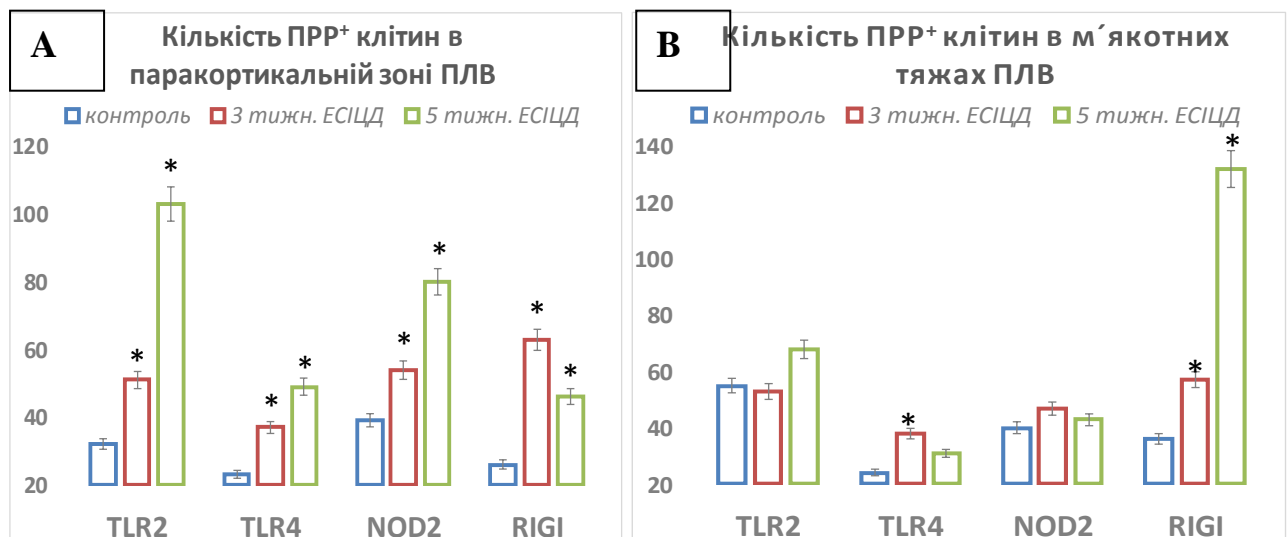


Рис. 7.2 Сумарна кількість клітин, експресуючих рецептори вродженого імунітету в паракортикальній зоні (А) і м'якотних тяжках ПЛВ (В) щурів при ЕСІЦД

Отримані нами результати співпадають з низкою інших досліджень. Так, Kim et al. (2007) показали, що розвиток аутоімунного діабету (як спонтанного, так і стрептозототин-індукованого) було помітно уповільнено у TLR2^{-/-} мишей, а застосування в умовах стрептозототин-індукованого діабету у мишей лінії C57BL/6 агоністу TLR2 – Pam3CSK4 – призводить до збільшення у ПЛВ кількості макрофагів, дендритних клітин, прозапальних CD4⁺TNFα⁺, CD4⁺IFNγ⁺

та $CD4^+IL-17^+$ -клітин, а також зменшує число регуляторних $CD25^+Foxp3^+$ Т-лімфоцитів [201]. Цікаво, що нещодавнє дослідження, проведене Burrows et al. (2015) показало, що захворюваність діабетом достовірно не відрізнялась у звичайних і TLR2-дефіцитних мишей лінії NOD, якщо вони утримувались в безмікробних умовах [202]. Це говорить про те, що коменсальні мікроорганізми регулюють про-діабетичні ефекти TLR2. Тим не менш, інші дослідження показали, що сигналізація через TLR2 може запобігати розвитку ЦД [203]. Зимозан, компонент клітинної стінки грибів, стимулює АПК мишей лінії NOD шляхом взаємодії з TLR2, що активує продукцію супресорних цитокінів IL-10, TGFb, а також сприяє експансії популяції Treg. У NOD мишей, котрим вводили зимозан спостерігався менш виражений інсуліт і затримка розвитку гіперглікемії [204]. Подальші дослідження показали, що при введенні зимозану мишам NOD у переддіабетичну або ранню гіперглікемічну стадію найбільш активна стимуляція $Foxp3^+$ Tregs відмічається в ПЛВ (PLNs) [205].

Виявлена нами активація толл-подібних рецепторів 4 типу корелює з іншими дослідженнями, продемонструвавши збільшення мРНК TLR4 в моноцитах у діабетичних мишей лінії NOD і пацієнтів з ЦД 1 типу, вказуючи, що сигнальний шлях через TLR4 також тісно пов'язаний з розвитком діабету [59]. Введення моноклональних антитіл до TLR4 блокує початок діабету у NOD мишей і сприяє експансії Tregs. Цікаво, що у $TLR4^{-/-}$ мишей лінії NOD відмічається прискорений розвиток діабету в порівнянні з NOD мишами дикого типу [206]. Таким чином, TLR4 можуть також функціонувати і в якості толерогенного сигналу в розвитку ЦД. Це було підтверджено Burrows et al. з використанням безмікробних $TLR4^{-/-}$ NOD мишей, які не демонструють прискорений розвиток діабету [202]. Це дослідження показує, що захисна дія сигналізації через TLR4, знову ж, як і в випадку TLR2, модулюється коменсальною мікробіотою, ЛПС якої є лігандами для TLR4 [207].

Встановлена нами активація цитоплазматичних сенсорів структурних компонентів бактеріального пептидоглікану – NOD2-рецепторів у ПЛВ щурів з ЕСЦД також може грати важливу роль у прогресії АІЗ [208, 64]. Нещодавні

дослідження Costa F. et al. (2016) також показали важливу роль NOD2 в розвитку стрептозоточин-індукованного ЦД [28] – у мишей, дефіцитних по NOD2 стрептозоточин-індукований ЦД не розвивається, а також порушена індукція Th1 і Th17-клітин в ПЛВ. Передбачається, що саме в ПЛВ NOD2-рецептори активуються лігандами мікрофлори, що транслокується з кишечника з наступним підвищенням в них рівня ІЛ-6- і ІЛ-12-продукуючих ДК і макрофагів, а також ІЛ-17- і ІFN- γ - продукуючих CD4⁺ і CD8⁺ ефекторних Т-клітин. Щодо виявленого нами підвищення рівня RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ, то дизрегуляцію системи цитоплазматичних сенсорів вірусної РНК, до яких і належать RIG-like рецептори, також пов'язують з прогресією ЦД [209]. Зокрема, RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) і MDA5 (melanoma differentiated-associated gene-5) експресуються як ефекторними, так і регуляторними Т-клітинами, а інфікування щурів лінії BBDR вірусом KRV (Kilham rat virus) збільшує рівень ІЛ-12 і транскриптів мРНК ІFN γ в ПЛВ [210].

Як показали наші результати, введення метформіну щурам з цукровим діабетом зменшує чисельність в ПЛВ лімфоцитів, експресуючих ПРР, за винятком NOD2, впливає на щільність мембранних і концентрацію цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету. При цьому кількість клітин, експресуючих мембранні TLR2 і TLR4 зменшувалась більш активно у паракортикальній зоні (в 2,1 рази та на 41 % – в 2,5 рази відповідно), а цитоплазматичних сенсорів вірусних РНК RIGI – у м'якотних тяжках ПЛВ щурів на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД (в 3,5 рази). Таким чином, метформін гальмує рівень активації компонентів вродженої імунної системи в ПЛВ.

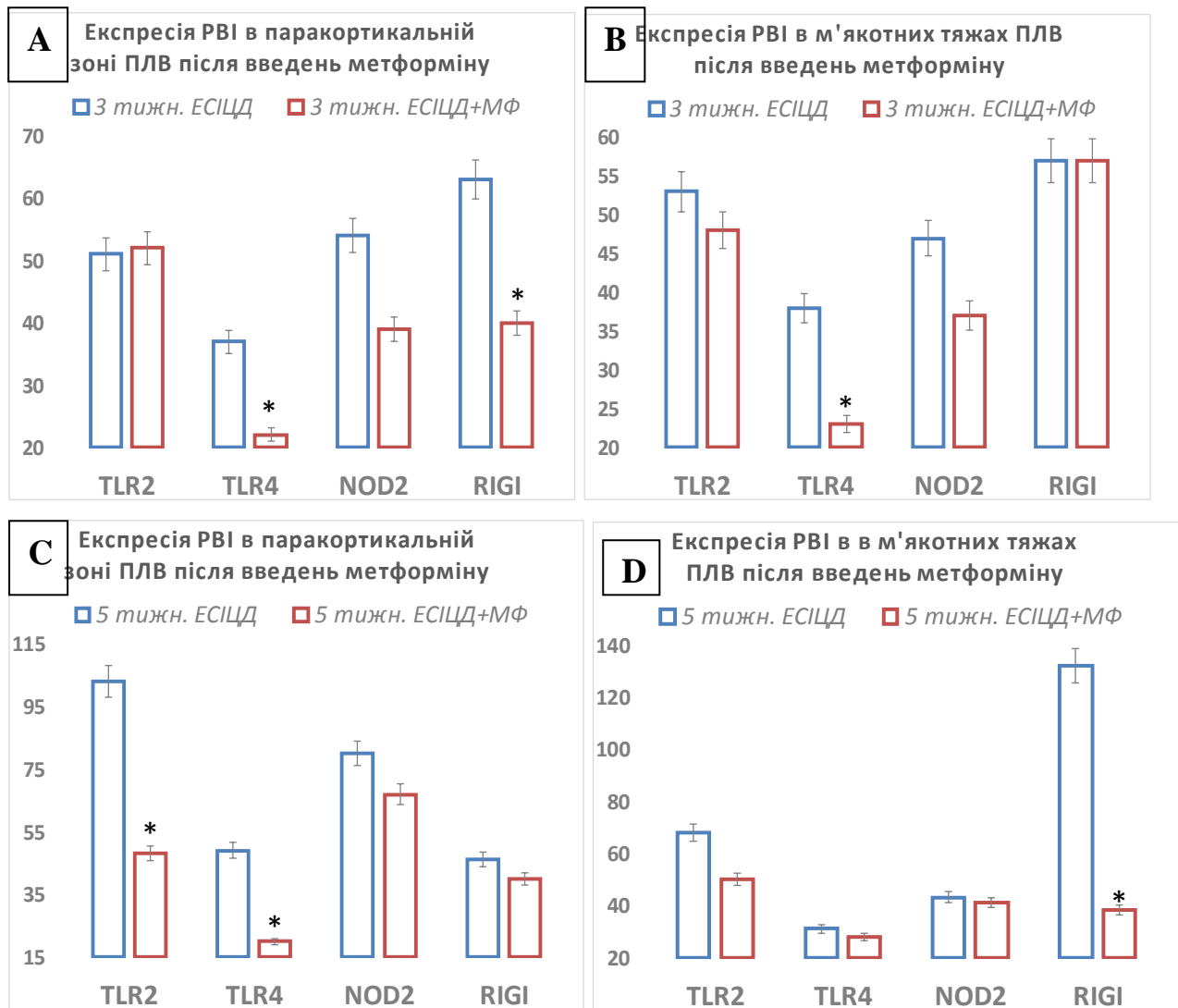


Рис. 7.3 Сумарна кількість клітин, експресуючих рецептори вродженого імунітету в паракортикальній зоні (А, С) і м'якотних тяжах ПЛВ (В, D) щурів після введень метформіну тваринам з цукровим діабетом.

Як відомо, периферична імунологічна толерантність до панкреатичних антигенів в ПЛВ може бути опосередкована екстратимічними Aire-експресуючими клітинами (eTACs) [100], а також фактором Deaf1 [169, 170] і балансом між регуляторними (Tregs) та ефекторними Т-клітинами, зокрема Th1 і Th17 [172]. Тому, наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 4, полягав у з'ясуванні відносного рівня мРНК регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів Aire та Deaf1 і динаміки

клітинного складу $T\text{-bet}^+$ (Th1), $Roryt^+$ (Th17) і $Foxp3^+$ -лімфоцитів (Treg) в ПЛВ щурів.

Нами встановлено зменшення відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Deaf1* та *Aire* в ПЛВ. Зокрема, експресія *Deaf1* зменшилась в 4,2 рази в ПЛВ щурів з 3-х тижневим ЕСЦД і в 2,5 рази у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД порівняно з контрольною групою. Експресія *Aire* зменшилась в 2 рази в ПЛВ щурів з 3-тижневим ЕСЦД і в 50 разів у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД.

Роль змін експресії генів *Deaf1* та *Aire* нещодавно була підтверджена і в інших роботах. Зокрема, Yip L. та ін. (2014) виявили, що експресія гену, що кодує регулятор транскрипції *Deaf1* в ПЛВ змінюється паралельно з експресією генів, що кодують ряд специфічних для панкреатичних острівців тканинних антигенів, включаючи інсулін 1 (*Ins1*), інсулін 2 (*Ins2*), глюкагон і інші [211]. При цьому експресія *Deaf1* та генів, які кодують β -клітинні антигени була суттєво зменшена в ПЛВ мишей лінії NOD у віці 12 тижнів, час, який співпадає з початком деструктивного інсуліту. У людей експресія гену інсуліну *INS* не була виявлена в ПЛВ у пацієнтів з ЦД 1 типу, але була виражена в ПЛВ і селезінці здорових осіб [29]. Аналіз ролі *Deaf1* на експресії ПТА, проведений методом мікрочипів в ПЛВ у мишей дикого типу і *Deaf1*-дефіцитних мишей показав, що *Deaf1* позитивно і негативно регулює експресію великої кількості генів, включаючи значну кількість ПТА в ПЛВ [97]. Вражаюче, але 22 із 30 найбільш інтенсивних *Deaf1*-індукованих генів є тканинспецифічними, і набір *Deaf1*-регулюємих ПТА в ПЛВ багато в чому схожий з такими *Aire*-регульованими генами в тимусі, хоча транскрипція самого *Aire* незмінна у *Deaf1*-дефіцитних мишей. Навпаки, набір *Deaf1*-регулюємих генів в ПЛВ майже повністю відрізняється від набору генів, регулюємих *Aire* у вторинних лімфоїдних органах [33], припускаючи, що ці 2 системи можуть бути незалежними або додатковими.

Виявлені нами зв'язки експресії генів *Deaf1* та *Aire* здатні також, разом з регуляторами імунометаболізму лімфоцитів, безпосередньо впливати на процес диференціювання Т-клітин в ПЛВ. І дійсно, на наступному етапі ми

продемонстрували, що розвиток ЕСІЦД супроводжується змінами розподілу субпопуляцій Т-хелперів в ПЛВ щурів: сумарна щільність Tbet⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ зростає на 56 %-87 %, у м'якотних тяжках ПЛВ ці ж показники збільшилися в 2,3 рази і на 68 % у порівнянні з контрольною групою; загальна кількість Т-хелперів 17 типу у паракортикальній зоні ПЛВ підвищувалась в 2,6 разів на 3-й тиждень і на 46 % на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД, у м'якотних тяжках ПЛВ – на 65 %-69 % відповідно (рис. 7.4). Зростання чисельності Th1 більш виразним було у м'якотних тяжках, Th17 – у паракортикальній зоні ПЛВ. Діабет різноспрямовано впливає на концентрацію транскрипційних факторів Tbet і RORγt в імунних клітинах. Це супроводжується зменшенням сумарної щільності субпопуляції Т-регуляторних клітин в ПЛВ на 3-й тиждень ЕСІЦД на 25 %-28 %, на 5-й – на 50 % лише в м'якотних тяжках, призводить до змін розподілу окремих класів Treg-лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію транскрипційного фактору FOXP3 в імунопозитивних клітинах м'якотних тяжків.

Отримані нами результати також демонструють здатність метформіну збільшувати кількість Treg в ПЛВ, причому ці ефекти виражені на 3-й тиждень розвитку діабету (в 2 рази) і нівелюються до 5-го тижня перебігу патологічного процесу. Введення метформіну майже не впливає на розподіл Th1-клітин у ПЛВ, за винятком паракортикальної зони у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД, де їх сумарна щільність знижується на 48 %, зменшує чисельність Th17-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 3-й тиждень (на 48 %), а у м'якотних тяжках – на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (на 27 %) (рис. 7.5).

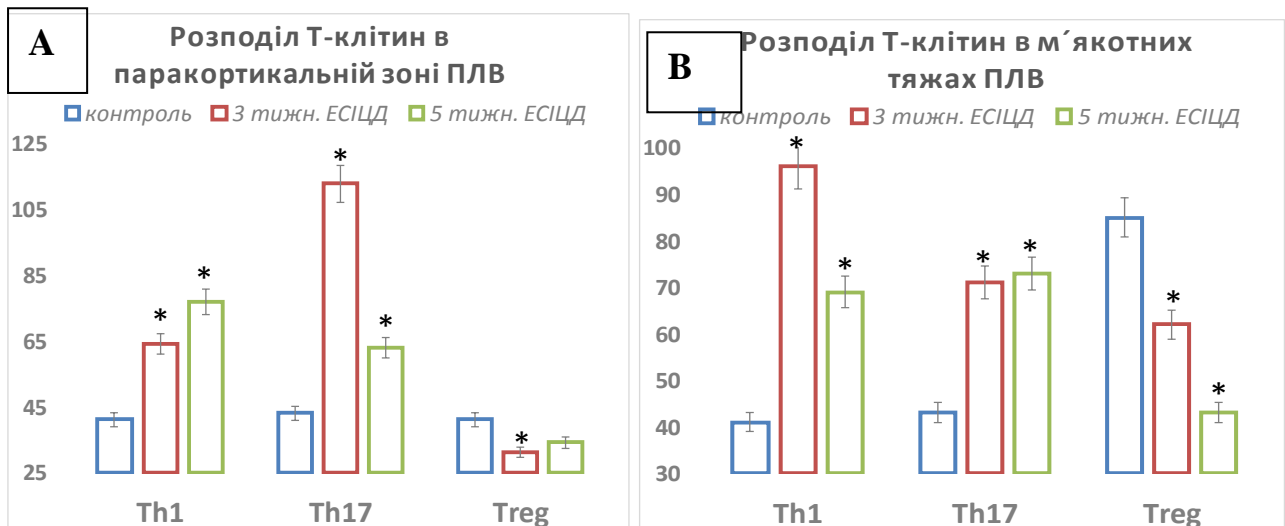


Рис. 7.4 Сумарна кількість Т-клітин в паракортикальній зоні (А) і м'якотних тяжах (В) ПЛВ щурів з ЕСІЦД.

Функціональні дефекти Т-регуляторних клітин є основними ознаками порушень в ПЛВ у пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу та експериментальних тварин [34, 35, 212, 213]. Роль змін кількості Treg в ПЛВ у діабетогенезі була показана в нещодавньому дослідженні, яке продемонструвало зниження числа Т-регуляторних клітин в ПЛВ у мишей лінії NOD [35]. В свою чергу, вивчення балансу між прозапальними Th17/Tc17 клітинами та Т-регуляторними лімфоцитами в умовах STZ-індукованого діабету показало, що під час початкової фази розвитку діабету (на 6 добу) відмічалось збільшення числа Th17 та Tc17-клітин в ПЛВ [214]. Характерно, що в більш пізні строки діабету (на 25 добу) спостерігалось збільшення абсолютного числа Treg в ПЛВ і продукції супресорного цитокіну IL-10. При цьому миші зі зниженою експресією рецептора IL-17 (IL17r) були стійкі до дії STZ, характеризувались менш вираженим пери-інсулітом та пошкодженням β-клітин [214]. Отримані нами результати співпадають і з іншими дослідженнями, в яких автори показали, що головними особливостями функціонального стану ПЛВ у пацієнтів з ЦД 1 типу є: 1) дисбаланс клітин Treg/Th17; 2) збільшення кількості IL-17-продукуючих CD4⁺ Т-клітин, специфічних до панкреатичних антигенів; і 3) присутність Tregs зі зменшеною експресією с FOXP3 та дефектною супресорною активністю [34].

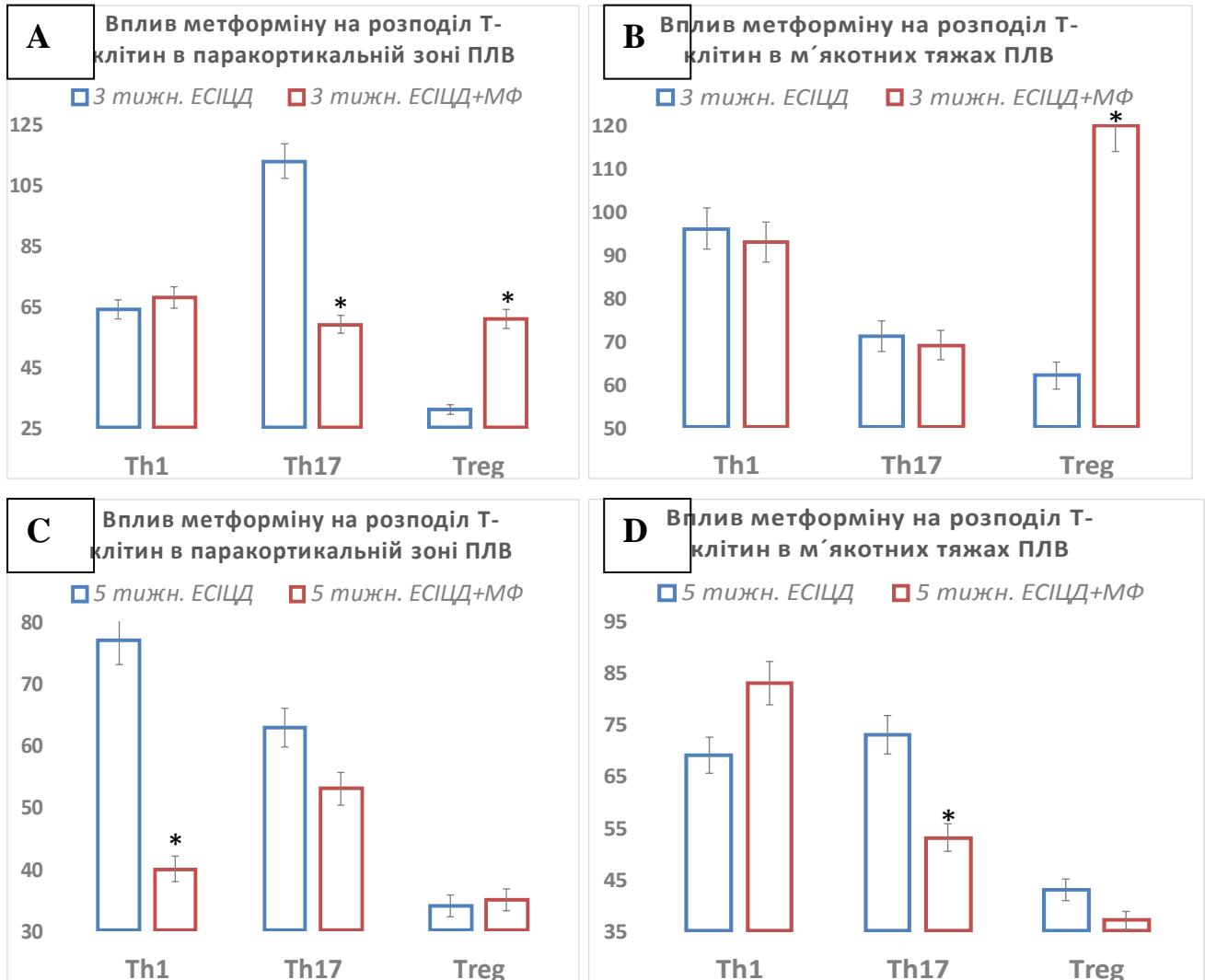


Рис. 7.5 Сумарна кількість Т-клітин в паракортикальній зоні (А, С) і м'якотних тяжах (В, D) ПЛВ щурів після введення метформіну тваринам з цукровим діабетом.

Щодо здатності Deaf1 і Aire безпосередньо впливати на розподіл Treg і Th17-клітин, то Yang S. та ін. (2015) показали спроможність Aire впливати на перинатальну генерацію особливого пулу FoxP3⁺Treg-клітин, що зберігається і у дорослих [32]. Gardner J. та ін. (2013) продемонстрували, що eTACs здатні функціонально інактивувати CD4⁺ Т-клітини за допомогою механізму, який не вимагає регуляторних Т-клітин і стійкий до вроджених запальних стимулів [100, 33]. Aire підвищує експресію мРНК Foxp3 у спленоцитах і збільшує продукцію CD4⁺ FoxP3⁺ Т-клітин [215]. Про роль Deaf1 і стромальних клітин

лімфатичних вузлів (LNSCs) в диференціації Tregs зараз можна лише здогадуватися. Зокрема, LNSCs в мезентеріальних лімфатичних вузлах виробляють ретиноеву кислоту, що сприяє розвитку Tregs [216]. Стверджується, що існує декілька механізмів, за допомогою яких LNSCs можуть брати участь у індукції толерантності до Т-клітин у лімфатичних вузлах: LNSC транскрипційно експресують різні ПТА, які безпосередньо презентуються Т-клітинам [217]; LNSC передають ПТА до дендритних клітин, які індують анергію CD4 Т-клітин [218]; LNSC здатні безпосередньо викликати апоптоз CD4 Т-клітин [169]. Таким чином, виявлені нами зміни розподілу Т-клітин в ПЛВ у щурів з діабетом можуть бути як метаболічно-, так і Deaf1- і Aire-залежні.

Наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 6, полягав у вивченні особливостей розподілу у ПЖТ адипоцитів, експресуючих TLR-2 і TLR-4 і відносного рівня мРНК генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у ПЖТ при ЕСЦД і після введення метформіну. Адже, саме жирова тканина, що оточує панкреатичні островці може бути важливим додатковим джерелом прозапальних стимулів. Ми з'ясували, що індукція діабету збільшує кількість TLR2⁺- (на 3-й тиждень ЕСЦД – в 2,5 рази, на 5-й – на 77 %) та TLR4⁺ – адипоцитів (на 3-й тиждень ЕСЦД – в 1,9 разів), переважно підвищує щільність TLR2- і TLR4-рецепторів на їх мембрані, що дійсно свідчить про активацію прозапальної сигналізації в ПЖТ. Введенням метформіну щурам з цукровим діабетом знижують загальну кількість TLR2⁺-адипоцитів на 16 %-24 %, TLR4⁺-адипоцитів на 36 % лише на 3-й тиждень ЕСЦД, супроводжуються зменшенням щільності їх рецепторів на поверхні жирових клітин.

Також нами було встановлено, що стрептозотоцин-індуковані метаболічні зміни викликають транскрипційну активацію гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЖТ: розвиток діабету призводить до зростання вмісту мРНК *mTOR* в 6,8 разів на 3-й тиждень та в 3,6 разів на 5-й тиждень патологічного процесу. Ці зміни не впливають на експресію мРНК транскрипційного регулятора

диференціювання Т-регуляторних клітин Foxp3 на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижують її в 4,6 разів при 5-ти тижневому ЕСЦД порівняно з контрольною групою щурів.

Виявлена нами активація PRR на мембрані жирових клітин у ПЖТ закономірно підвищує рівень експресії мРНК прозапального цитокіну IL1 β – в 77,7 разів на 3-й тиждень та 51,3 рази на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД, і Th17-залежного цитокіну IL17A – відповідно у 23,5 та 5,5 разів.

В ряді інших досліджень також була показана здатність адипоцитів людини та гризунів експресувати практично весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів [42, 143]. Характерно, що наші результати показують активне залучення TLR-2. Між тим, існуючі експериментальні роботи стосуються в основному ролі TLR-4, і насамперед в патогенезі ЦД 2 типу [144].

mTOR є не тільки центральним регулятором ліпідного метаболізму, що контролює процеси адипогенезу та ліполізу, але і регулятором імунометаболізму інфільтруючих ЖТ імунних клітин [219]. Рівень прогресії діабету багато в чому лімітується субпопуляцією Treg [84], складність і гетерогенність якої підтверджується виявленням багаточисельних тканиноспецифічних Tregs, в тому числі так званих VAT Tregs (visceral adipose tissue CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells) або “Fat Tregs” [220, 221]. Такі VAT Tregs характеризуються цілим рядом унікальних властивостей: 1) по-перше, Foxp3⁺-експресуючі VAT Tregs становлять 40 %-60 % серед усіх CD4⁺ Т-клітин ЖТ, що складає набагато більший процент порівняно з їх аналогами в селезінці та лімфатичних вузлах (5 %-20 %) або нелімфоїдних тканинах (наприклад, легенях і печінці), а також в підшкірній жировій клітковині [222]; 2) по-друге, VAT Tregs характеризуються більш високим рівнем транскрипції супресорного цитокіну IL-10 (майже у 136 разів вище порівняно з його експресією в звичайних Tregs). В свою чергу, IL-10, що продукується VAT Tregs пригнічує вироблення запальних цитокінів і хемокінів, індукованих TNF α , підвищує експресію GLUT4 в адипоцитах і відновлює чутливість ЖТ до інсуліну; 3) по-третє, VAT Tregs відрізняються більш високою експресією таких хемокінів і

хемокінових рецепторів як CCR1, CCR2, CCR9, CCL6, CXCL2 і CXCL10, та більш низькими патернами експресії CCL5 і CXCR3 [223]; 4) важливе значення для акумуляції в ЖТ і функціонуванні VAT Tregs мають ядерні рецептори PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), їх специфічна делеція в Tregs перешкоджає накопиченню даних клітин в ЖТ, але не в лімфоїдних органах [224]; 5) і, нарешті, VAT Tregs експресують специфічний репертуар Т-клітинного рецептора (ТКР), що відрізняється від репертуару ТКР Tregs лімфатичних вузлів.

Виявлена нами залежність диференціювання Treg від рівня експресії mTOR показана і в ряді інших робіт [225, 23]. При цьому введення метформіну щурам з цукровим діабетом пригнічують експресію мРНК mTOR в ПЖТ у 4,5-5,9 разів. Транскрипційна репресія *mTOR* призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Treg-клітинах ПЖТ – на 80 % на 3-й тиждень та в 3,1 рази на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД.

Отримані нами результати свідчать, що введення метформіну, який здатний через АМФК пригнічувати активність mTOR, призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Treg-клітинах ПЖТ. Аналогічно Shin N. та ін. (2014) продемонстрували, що метформін збільшує кількість і процентну частку VAT Treg клітин у мишей, що знаходились на високожировій дієті [226], однак не відомо чи зачіпає цей ефект метформіну виключно VAT Treg і які молекулярні механізми опосередковують цей ефект [227].

Щодо встановленого нами зростання рівня експресії мРНК прозапальних цитокінів IL1 β та IL17A в ПЖТ, то кореляція між дисфункцією ЖТ та розвитком запальних і автоімунних захворювань була продемонстрована і в ряді інших досліджень. Коепен Т. та ін. (2011) показали, що вісцеральна жирова тканина (ВЖТ) володіє більш вираженим прозапальним потенціалом в порівнянні з підшкірною ЖТ [149]. Перипанкреатичні адипоцити (ППА) чинять як системні, так і паракринні ефекти на функцію підшлункової залози. У мишей з адипоцит-специфічною делецією SUMO-специфічної протеази (Small ubiquitin-like modifier) SENP1 розвиваються симптоми ЦД 1 типу. В

нещодавньому дослідженні Shao L. et al. (2016) показано, що ППА таких SENP1-дефіцитних мишей збільшують вироблення прозапальних цитокінів IL-6, TNF α і IL-1 β порівняно з іншими жировими депо [44]. Причому ці цитокіни не тільки надають пряму цитотоксичну дію на панкреатичні острівці, але й збільшують експресію CCL5 та інших хемокінів (CCL2, CCL21, CXCL9 і CXCL10) в сусідніх острівцях, що викликає стійке запалення в підшлунковій залозі шляхом рекрутування в них ефекторних Th1 і Th17 клітин і редукції числа Treg. SUMO може посттрансляційно зв'язуватись з клітинними білками та модулювати їх біологічні функції. Автори припускають, що сумоїлювання білка NEMO (NF-kappa-B essential modulator) підсилює активність NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) та впливає на NF-kB-залежну продукцію цитокінів, що викликають інсуліт [228]. Таким чином, ПЖТ може відігравати важливу роль в прогресії діабету, забезпечуючи нове розуміння молекулярного патогенезу ЦД 1-го типу.

Таким чином, у дисертаційній роботі ми вперше виявили цілий комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСІЦД (рис. 7.6): зміни імунометаболізму лімфоцитів, порушення формування периферичної імунологічної толерантності, активація ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах ПЛВ і адипоцитах ПЖТ, зміни розподілу ефекторних Т-клітин в ПЛВ, посилення прозапальної сигналізації в ПЖТ на тлі зменшення кількості Treg і рівня мРНК Foxp3, продемонстрували перспективність метформіну для корекції виявлених змін.

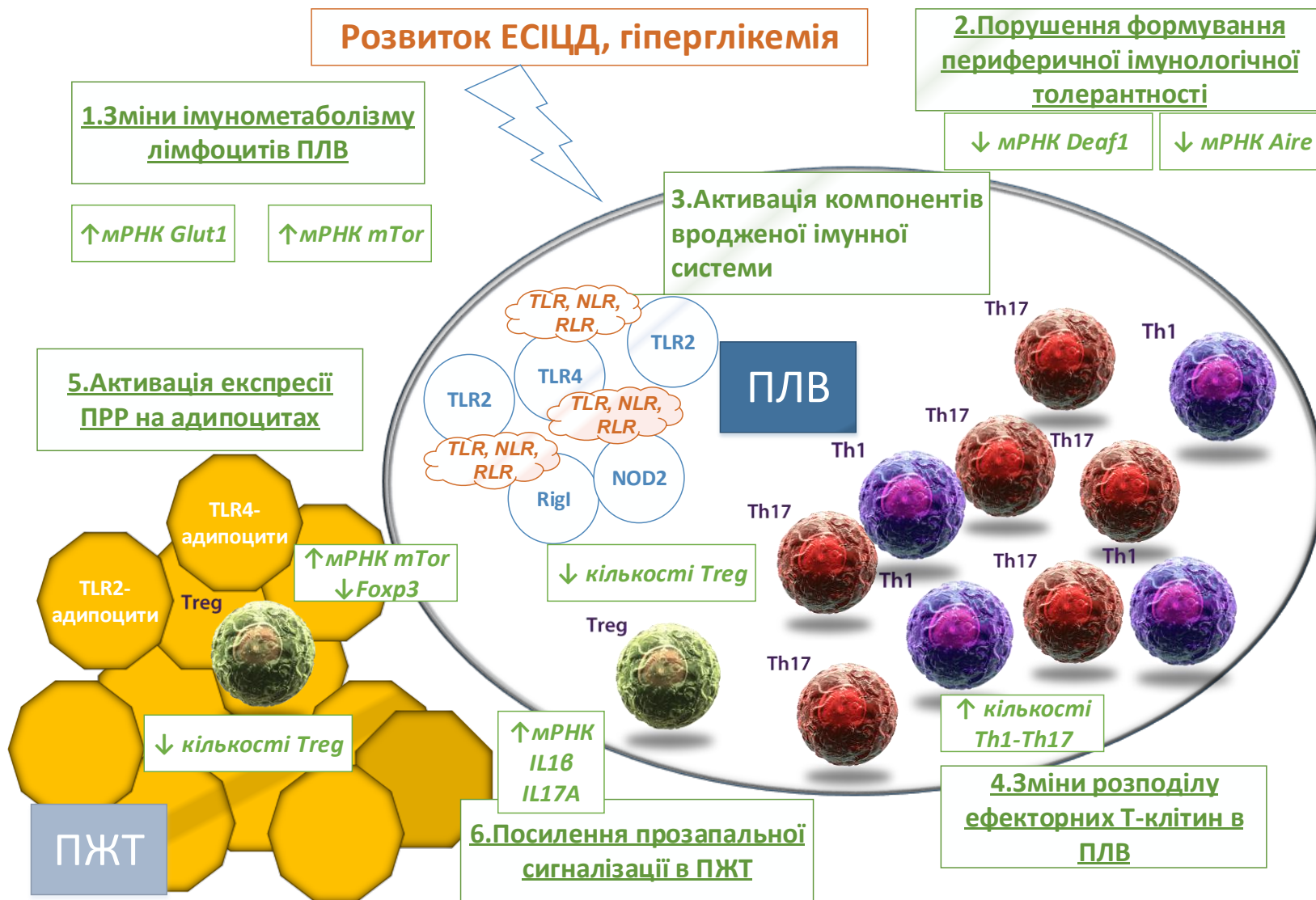


Рис. 7.6 Ключові зміни функціонального стану клітин ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСІД.

ВИСНОВКИ

Цукровий діабет – важлива медична проблема, яка обумовлена важким перебігом, тяжкими ускладненнями та значними економічними витратами на лікування. У дисертаційній роботі приведено експериментальне вирішення важливої наукової задачі – удосконалення знання про механізми змін функціонального стану лімфоцитів ПЛВ та ПЖТ при експериментальному ЦД і в динаміці їх патогенетично-обґрунтованої корекції метформіном. Отримані результати розкривають нові ланки патогенезу ЦД, що дозволяє обґрунтувати ефективні стратегії до корекції стану імунної системи у пацієнтів з діабетом.

1. Діабет викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* (в 9,9-28,9 разів) і протеїнкінази *mTOR* (в 5,3-3,3 рази) в клітинах ПЛВ, не впливає на загальну кількість $mTOR^+$ -клітин в ПЛВ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу і призводить до їх зростання на 5-й тиждень ЕСЦД – на 24 % в паракортикальній зоні і на 34 % в м'якотних тяжах переважно за рахунок збільшення щільності популяції $mTOR^+$ -малих і середніх лімфоцитів. Введення метформіну щурам з ЦД призводить до зростання рівня мРНК гену *AMPK1 α* на 87 % на 3-й тиждень та майже в 38 разів на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД та пригнічення експресії *mTOR* (в 3-14,7 разів) і *Glut 1* (в 2-5,7 разів) в ПЛВ. При цьому кількість $mTOR^+$ -клітин знижувалась на 40 % лише у м'якотних тяжах ПЛВ у тварин з 5-ти тижневим ЕСЦД.

2. Розвиток діабету супроводжується зростанням кількості $TLR2^+$ -, $TLR4^+$ -, $NOD2^+$ - і $RIGI^+$ -лімфоцитів у паракортикальній зоні і $TLR4^+$ - та $RIGI^+$ -лімфоцитів у м'якотних тяжах ПЛВ щурів, змінює щільність ПРР на імунних клітинах. Введення метформіну щурам з ЦД зменшує чисельність в ПЛВ лімфоцитів, експресуючих ПРР, за винятком $NOD2$, впливає на щільність мембранних і концентрацію цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету.

3. В умовах діабету знижується рівень транскрипційної активності генів *Deaf1* в ПЛВ щурів в 4,2 рази на 3-й тиждень і в 2,5 рази на 5-й тиждень, *Aire* – відповідно в 2 і 50 разів. Це супроводжується зменшенням сумарної щільності Treg в ПЛВ на 3-й тиждень на 25-28 %, на 5-й – на 50 % в м'якотних тяжах,

призводить до змін розподілу окремих класів $Foxp3^+$ -лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію $Foxp3$ в імунопозитивних клітинах м'якотних тяжів. Діабет призводить до збільшення кількості як $Tbet^+$ - (у паракортикальній зоні ПЛВ на 56 %-87 %, у м'якотних тяжах – в 2,3 рази – на 68 %), так і $ROR\gamma^+$ -лімфоцитів (у паракортикальній зоні ПЛВ в 2,6 разів – на 46 %, у м'якотних тяжах – на 65 %-69 %) у порівнянні з контролем, різноспрямовано впливає на концентрацію відповідних транскрипційних факторів в імунних клітинах. Введення метформіну вдвічі збільшує кількість $Treg$ на 3-й тиждень діабету, майже не впливає на розподіл $Th1^+$ -клітин у ПЛВ, за винятком паракортикальної зони у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД, де їх сумарна щільність знижується на 48 %, зменшує чисельність $Th17$ -клітин у паракортикальній зоні ПЛВ на 3-й тиждень (на 48 %), а у м'якотних тяжах – на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД (на 27 %).

4. Індукція діабету збільшує кількість $TLR2^+$ - (на 3й тиждень ЕСЦД – в 2,5 рази, на 5-й – на 77 %) та $TLR4^+$ -адипоцитів (на 3й тиждень ЕСЦД – в 1,9 разів), переважно підвищує щільність $TLR2$ - і $TLR4$ -рецепторів на їх мембрані. Введенням метформіну щурам з ЦД знижає загальну кількість $TLR2^+$ -адипоцитів на 16-24 %, $TLR4^+$ -адипоцитів на 36 % лише на 3-й тиждень ЕСЦД, супроводжуються зменшенням щільності їх рецепторів на поверхні жирових клітин.

5. Розвиток діабету викликає транскрипційну активацію гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЖТ, не впливає на експресію мРНК транскрипційного регулятора диференціювання Т-регуляторних клітин $Foxp3$ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижує її в 4,6 разів при 5-ти тижневому ЕСЦД. Ці зміни супроводжуються збільшенням рівня експресії мРНК прозапальних цитокінів $IL1\beta$ і $IL17A$ в клітинах ПЖТ. Введення метформіну щурам з ЦД пригнічує експресію мРНК *mTOR* у 4,5-5,9 разів, призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену $Foxp3$ в $Treg$ -клітинах ПЖТ – на 80 % на 3 тиждень та в 3,1 рази на 5 тиждень розвитку ЕСЦД.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Calderon B., Unanue E.R. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* 2012. Vol. 24, № 1. P. 119-28.
2. Byersdorfer C.A., Schweitzer G.G., Unanue E.R. Diabetes is predicted by the beta cell level of autoantigen. *J. Immunol.* 2005. Vol. 175, № 7. 4347-54.
3. Zhang Y. et al. TLR9 blockade inhibits activation of diabetogenic CD8⁺ T cells and delays autoimmune diabetes. *J.Immunol.* 2010. Vol. 184, № 10. P. 5645-53.
4. Mohan J.F. et al. Pathogenic CD4⁺ T cells recognizing an unstable peptide of insulin are directly recruited into islets bypassing local lymph nodes. *J. Exp. Med.* 2013. Vol. 210, №11. P. 2403-14.
5. Willcox A. et al. Germinal centre frequency is decreased in pancreatic lymph nodes from individuals with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2017. Vol. 60, №7. P. 1294-1303.
6. Buck M.D., O'Sullivan D., Pearce E.L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* 2015. Vol. 212, № 9. P. 1345-60.
7. Hotamisligil G.S. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. *Immunity.* 2017. Vol. 47, № 3. P. 406-420.
8. Freitag J. et al. Immunometabolism and autoimmunity. *Immunol. Cell. Biol.* 2016. Vol. 94, № 10. P. 925-934.
9. Palmer C.S et al. Regulators of glucose metabolism in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Int. Rev. Immunol.* 2016. Vol. 35, № 6. P. 477-488.
10. Macintyre A.N. et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell. Metab.* 2014. Vol. 20, № 1. P. 61-72.
11. Jones N. et al. Metabolic Adaptation of Human CD4⁺ and CD8⁺ T-Cells to T-Cell Receptor-Mediated Stimulation. *Front. Immunol.* 2017. № 8. P. 1516.
12. Michalek R.D. et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.* 2011. Vol. 186, № 6. P. 3299-303.

13. Almeida L. et al. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.* 2016. Vol. 28, №5. P. 514-524.
14. Basu S., Hubbard B., Shevach E.M. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* 2015. Vol. 97, № 2. P. 279-83.
15. Newton R., Priyadharshini B., Turka L.A. Immunometabolism of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2016. Vol. 17, № 6. P. 618-25.
16. Pollizzi K.N., Powell J.D. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends. Immunol.* 2015. Vol. 36, № 1. P. 13-20.
17. Vignali P.D., Barbi J., Pan F. Metabolic Regulation of T Cell Immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. № 1011. P. 87-130.
18. Foretz M. et al. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 2014. Vol. 20, № 6. P. 953-66.
19. Hardie D.G., Ashford M.L. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda).* 2014. Vol. 29, №2. P. 99-107.
20. Ma E.H. et al. The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Curr. Opin. Immunol.* 2017. № 46. P. 45-52.
21. Shan J. et al. Interplay between mTOR and STAT5 signaling modulates the balance between regulatory and effective T cells. *Immunobiology.* 2015. Vol. 220, № 4. P. 510-7.
22. Liu Y., Zhang D.T., Liu X.G. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 34, № 1. P. 50-66.
23. Chapman N.M., Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy.* 2014. Vol. 6, №12. P. 1295-311.
24. Zeng H., Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends. Immunol.* 2015. Vol. 36, № 1. P. 3-12.
25. Tai N., Wong F.S., Wen L. The role of the innate immune system in destruction of pancreatic beta cells in NOD mice and humans with type I diabetes. *J. Autoimmun.* 2016. № 71. P. 26-34.

26. Needell J.C., Zipris D. Targeting Innate Immunity for Type 1 Diabetes Prevention. *Curr. Diab. Rep.* 2017. Vol. 17, № 11. P. 113.

27. Itoh A., Ridgway W.M. Targeting innate immunity to downmodulate adaptive immunity and reverse type 1 diabetes. *Immunotargets Ther.* 2017. № 6. P. 31-38.

28. Costa F.R. et al. Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. *J. Exp. Med.* 2016. Vol. 213, № 7. P. 1223-39.

29. Jeker L., Bour-Jordan H., Bluestone J. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.* 2012. Vol. 2, № 3. P. 7807-7816.

30. Proekt I. et al. Insights into immune tolerance from AIRE deficiency. *Curr. Opin. Immunol.* 2017. № 49. P. 71-78.

31. Yip L. et al. Inflammation and hyperglycemia mediate Deaf1 splicing in the pancreatic lymph nodes via distinct pathways during type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015. Vol. 64, № 2. P. 604-17.

32. Yang S. et al. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science.* 2015. Vol. 348, № 6234. P. 589-594.

33. Gardner J., Metzger T., Mc Mahon E. Extrathymic Aire-expressing cells are a distinct bone marrow-derived population that induce functional inactivation of CD4⁺ T cells. *Immunity.* 2013. № 39. P. 560-572.

34. Ferraro A. et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2011. Vol. 60, № 11. P. 2903-13.

35. Nti B. et al. Treg cells in pancreatic lymph nodes: the possible role in diabetogenesis and beta cell regeneration in a T1D model. *Cell Mol. Immunol.* 2012. № 9. P. 455-463.

36. Sebastiani G. et al. Regulatory T-cells from pancreatic lymph nodes of patients with type-1 diabetes express increased levels of microRNA miR-125a-5p that limits CCR2 expression. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 6897.
37. Lu J. et al. Unique Features of Pancreatic-Resident Regulatory T Cells in Autoimmune Type 1 Diabetes. *Front. Immunol.* 2017. № 8. P. 1235.
38. Magnuson A.M. et al. Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015. Vol. 112, № 5. P. 1511-6.
39. Seay H.R. et al. Tissue distribution and clonal diversity of the T and B cell repertoire in type 1 diabetes. *JCI Insight.* 2016. Vol. 1, № 20. P. 88242.
40. Radenkovic M. et al. Characterization of resident lymphocytes in human pancreatic islets. *Clin. Exp. Immunol.* 2017. Vol. 187, № 3. P. 418-27.
41. Kumari M., Heeren J., Scheja L. Regulation of immunometabolism in adipose tissue. *Semin. Immunopathol.* 2017. Dec 5. P. 1-14.
42. Schäffler A., Schölmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *J. Trends Immunol.* 2010. Vol. 31, № 6. P. 228-35.
43. Kohlgruber A.C. et al. Adipose tissue at the nexus of systemic and cellular immunometabolism. *Semin. Immunol.* 2016. Vol. 24, № 16. P. 30098-7.
44. Shao L. et al. The role of adipose-derived inflammatory cytokines in type 1 diabetes. *Adipocyte.* 2016. Vol. 5, № 3. P. 270-4.
45. Panduro M., Benoist C., Mathis D. Tissue Tregs. *Annu. Rev. Immunol.* 2016. № 34. P. 609-33.
46. Becker M., Levings M.K., Daniel C. Adipose-tissue regulatory T cells: Critical players in adipose-immune crosstalk. *Eur. J. Immunol.* 2017. Vol. 47, № 11. P. 1867-1874.
47. Gagnerault M.C. et al. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J. Exp. Med.* 2002. № 196. P. 369-377.
48. Levisetti M.G. et al. Absence of lymph nodes in NOD mice treated with lymphotoxin-beta receptor immunoglobulin protects from diabetes. *Diabetes.* 2004. №53. P. 3115-3119.

49. Höglund P. et al. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 1999. № 189. P. 331-339.

50. Calderon B. et al. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. №105. P. 6121-6126.

51. Tang Q. et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat. Immunol.* 2006. Vol. 7, № 1. P. 83-92.

52. Graham K.L. et al. Autoreactive cytotoxic T lymphocytes acquire higher expression of cytotoxic effector markers in the islets of NOD mice after priming in pancreatic lymph nodes. *Am. J. Pathol.* 2011. Vol. 178, №6. P. 2716-25.

53. Turley S.J. et al. Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005. Vol. 102, № 49. P. 17729-17733.

54. Calderon B., Carrero J.A., Unanue E.R. The central role of antigen presentation in islets of Langerhans in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* 2014. № 26. P. 32-40.

55. Ovcinnikovs V., Walker L.S. Regulatory T. Cells in Autoimmune Diabetes: Mechanisms of Action and Translational Potential. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015. № 136. P. 245-77.

56. Mintern J.D. et al. Constitutive, but not inflammatory, cross-presentation is disabled in the pancreas of young mice. *Eur. J. Immunol.* 2002. Vol. 32, №4. P. 1044-51.

57. Liston A., Todd J.A., Lagou V. Beta-Cell Fragility As a Common Underlying Risk Factor in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Trends Mol. Med.* 2017. Vol. 23, №2. P. 181-194.

58. Scharfmann R. et al. Mass production of functional human pancreatic β -cells: why and how? *Diabetes Obes. Metab.* 2016. Vol. 18, № 1. P. 128-36.

59. Devaraj S. et al. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 93, № 2. P. 578-83.

60. Al Shamsi M. et al. Pam3CSK(4) enhanced beta cell loss and diabetogenesis: the roles of IFN-gamma and IL-17. *Clin. Immunol.* 2013. Vol. 149, №1. P. 86-96.
61. Pashenkov M.V., Dagil Y.A., Pinegin B.V. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. *Int. Immunopharmacol.* 2017. № 54. P. 385-400.
62. Kestra-Gounder A.M., Tsohis R.M. NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing. *Trends Immunol.* 2017. Vol. 38, № 10. P. 758-767.
63. Philpott D.J. et al. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14, № 1. P. 9-23.
64. Claes A.K., Zhou J.Y., Philpott D.J. NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. *Physiology (Bethesda).* 2015. Vol. 30, № 3. P. 241-250.
65. Petterson T. et al. Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors and retinoic acid inducible gene-like receptors in human tonsillar T lymphocytes. *Immunology.* 2011. Vol. 133, № 1. P. 84-93.
66. Lässig C., Hopfner K.P. Discrimination of cytosolic self and non-self RNA by RIG-I-like receptors. *J. Biol. Chem.* 2017. Vol. 292, № 22. P. 9000-9009.
67. Quicke K.M., Diamond M.S., Suthar M.S. Negative regulators of the RIG-I-like receptor signaling pathway. *Eur. J. Immunol.* 2017. Vol. 47, № 4. P. 615-628.
68. Kato H., Fujita T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 2015. №37. P. 40-5.
69. Anz D. et al. Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J. Immunol.* 2010. Vol. 184, №2. P. 939-46.
70. Negishi H. et al. Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat. Immunol.* 2012. Vol. 13, №7. P. 659-66.
71. Zipris D. Innate immunity in type 1 diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2011. Vol. 27, № 8. P. 824-9.

72. Yu H., Paiva R., Flavell R.A. Harnessing the power of regulatory T-cells to control autoimmune diabetes: overview and perspective. *Immunology*. 2017. Nov 20. doi: 10.1111/imm.12867.

73. Ghonaim M.M. et al. T-Regulatory Cell Subsets in Children with Type 1 Diabetes Mellitus: Relation to Control of the Disease. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets*. 2017. Vol. 17, №3. P. 238-245.

74. Hull C.M., Peakman M., Tree T.M. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia*. 2017. Vol. 60, № 10. P. 1839-1850.

75. Grinberg-Bleyer Y. et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J. Clin. Invest.* 2010. Vol. 120, № 12. P. 4558-68.

76. Long S.A. et al. Remodeling T cell compartments during anti-CD3 immunotherapy of type 1 diabetes. *Cell Immunol.* 2017. № 319. P. 3-9.

77. Zhang Q. et al. LAG3 limits regulatory T cell proliferation and function in autoimmune diabetes. *Sci. Immunol.* 2017. Vol. 2, № 9. P. 4569.

78. Azzi J. et al. PI3K γ Deficient NOD-Mice Are Protected from Diabetes by Restoring the Balance of Regulatory to Effector-T-Cells. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 1. P. 0169695.

79. Stockinger B., Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2017. Vol. 17, № 9. P. 535-544.

80. Ren J., Li B. The Functional Stability of FOXP3 and ROR γ t in Treg and Th17 and Their Therapeutic Applications. *Adv. Protein. Chem. Struct. Biol.* 2017. № 107. P. 155-189.

81. Kumar P., Subramaniam G. Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes. *Cytokine*. 2015. Vol. 71, № 2. P. 366-376.

82. Yeh W.I. et al. Avidity and Bystander Suppressive Capacity of Human Regulatory T Cells Expressing De Novo Autoreactive T-Cell Receptors in Type 1 Diabetes. *Front. Immunol.* 2017. № 8. P. 1313.

83. Vesperas A., Vignali D.A. Are Regulatory T Cells Defective in Type 1 Diabetes and Can We Fix Them? *J. Immunol.* 2016. Vol. 197, № 10. P. 3762-3770.

84. Spence A., Tang Q. Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2016. Vol. 16, № 11. P. 110.

85. Hamari S. et al. Analyses of regulatory CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T cells and observations from peripheral T cell subpopulation markers during the development of type 1 diabetes in children. *Scand. J. Immunol.* 2016. Vol. 83, № 4. P. 279-87.

86. Kuhn C. et al. Regulatory mechanisms of immune tolerance in type 1 diabetes and their failures. *J. Autoimmun.* 2016. № 71. P. 69-77.

87. Qiao Y.C. et al. Changes of regulatory T cells, transforming growth factor-beta and interleukin-10 in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Immunol.* 2016. № 170. P. 61-9.

88. Badami E. et al. Defective differentiation of regulatory FoxP3⁺ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2011. Vol. 60, № 8. P. 2120-4.

89. Zdravkovic N. et al. Regulatory T cells and ST2 signaling control diabetes induction with multiple low doses of streptozotocin. *Mol. Immunol.* 2009. Vol. 47, № 1. P. 28-36.

90. Laan M., Peterson P. The many faces of aire in central tolerance. *Front. Immunol.* 2013. Vol. 11, №4. P. 326.

91. Chentoufi A.A. et al. Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. *Scand. J. Immunol.* 2008. Vol. 68, № 1. P. 1-11.

92. Suzuki E. et al. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes. *E. Autoimmunity.* 2008. Vol. 41, № 2. P. 133-139.

93. Nagafuchi S. et al. Autoimmune regulator (AIRE) gene is expressed in human activated CD4⁺ T-cells and regulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *Microbiol. Immunol.* 2006. Vol. 50, № 12. P. 979-987.

94. Derbinski J. et al. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 2005. Vol. 202. P. 33-45.

95. Hässler S. et al. Aire deficiency causes increased susceptibility to streptozotocin-induced murine type 1 diabetes. *Scand. J. Immunol.* 2008. Vol. 67, №6. P. 569-80.

96. Yip L. et al. Reduced DEAF1 function during type 1 diabetes inhibits translation in lymph node stromal cells by suppressing Eif4g3. *J. Mol. Cell Biol.* 2013. № 5. P. 99-110.

97. Yip L. Deaf1 isoforms control the expression of genes encoding peripheral tissue antigens in the pancreatic lymph nodes during type 1 diabetes. *Nat. Immunol.* 2009. № 10. P. 1026-1033.

98. Lee J. et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 2007. Vol. 8, №2. P. 181-190.

99. Nichols L.A. et al. Deletional self-tolerance to a melanocyte/melanoma antigen derived from tyrosinase is mediated by a radio-resistant cell in peripheral and mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 2007. Vol. 179, № 2. P. 993-1003.

100. Gardner J., Devoss J., Friedman R. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science.* 2008. № 321. P. 843-847.

101. Palmer C.S. et al. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. *E Bio Medicine.* 2016. № 6. P. 31-41.

102. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 2016. Vol. 213, №1. P. 15-23.

103. Rodríguez-Prados J.C. et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* 2010. № 185. P. 605-614.

104. Krawczyk C.M. et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010. Vol. 115, № 23. P. 4742-4749.

105. Donnelly R.P. et al. mTORC1 dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J. Immunol.* 2014. Vol. 193, № 9. P. 4477-4484.

106. Shi L.Z. et al. HIF1 α dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of Th17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208, № 7. P. 1367-1376.
107. Gubser P.M. et al. Rapid effector function of memory CD8⁺ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat. Immunol.* 2013. Vol. 14, № 10. P. 1064-1072.
108. Wei J. et al. Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nat. Immunol.* 2016. № 17. P. 277-285.
109. Tannahill G.M. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL 1 β through HIF 1 α . *Nature.* 2013. № 496, P. 238-242.
110. Huynh A. et al. Control of PI(3) kinase in Treg cells maintains homeostasis and lineage stability. *Nat. Immunol.* 2015. №16. P. 188-196.
111. Palsson-McDermott E.M. Pyruvate kinase M2 regulates HIF 1 α activity and IL 1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab.* 2015. № 21. P. 65-80.
112. Chang C.H. et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell.* 2013. Vol. 153, №6. P. 1239-1251.
113. Moon J.S. et al. mTORC1 induced HK1 dependent glycolysis regulates NLRP3 inflammasome activation. *Cell Rep.* 2015. Vol. 12, №1. P. 102-115.
114. O'Sullivan D. et al. Memory CD8⁺ T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development. *Immunity.* 2014. Vol. 41, №1. P. 75-88.
115. Jha A.K. et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity.* 2015. Vol. 42, № 3. P. 419-430.
116. Michelucci A. et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. Vol. 110, №19. P. 7820-7825.

117. Everts B. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1 IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014. Vol. 15, № 4. P. 323-332.

118. Haschemi A. et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* 2012. № 15. P. 813-826.

119. Gerriets V.A. et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation. *J. Clin. Invest.* 2015. Vol. 125, № 1. P. 194-207.

120. Wang R. et al. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity.* 2011. № 35. P. 871-882.

121. van der Windt G.J. et al. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8⁺ T cell memory development. *Immunity.* 2012. № 36. P. 68-78.

122. Posokhova E. N. et al. Lipid synthesis in macrophages during inflammation in vivo: effect of agonists of peroxisome proliferator activated receptors α and γ and of retinoid X receptors. *Biochem. (Mosc).* 2008. № 73. P. 296-304.

123. Feingold K.R. et al. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2012. Vol. 92, № 4. P. 829-839.

124. Dufort F.J. et al. Glucose-dependent de novo lipogenesis in B lymphocytes: a requirement for atp-citrate lyase in lipopolysaccharide-induced differentiation. *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 10. P. 7011-7024.

125. Lee J. et al. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. *J. Immunol.* 2014. Vol. 192, №7. P. 3190-3199.

126. Berod L. et al. De novo fatty acid synthesis controls the fate between regulatory T and T helper 17 cells. *Nat. Med.* 2014. Vol. 20, № 11. P. 1327-33.

127. Carr E.L. et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. *J. Immunol.* 2010. № 185. P. 1037-1044.

128. Nakaya M. et al. Inflammatory T cell responses rely on amino acid transporter ASCT2 facilitation of glutamine uptake and mTORC1 kinase activation. *Immunity*. 2014. Vol. 40, №5. P. 692-705.
129. Rath M. et al. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* 2014. № 5. P. 532.
130. Lee G.K. et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*. 2002. Vol. 107, № 4. P. 452-460.
131. Pollizzi K.N. et al. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 2015. Vol. 125, № 5. P. 2090-108.
132. Knip M., Luopajarvi K., Härkönen T. Early life origin of type 1 diabetes. *Semin. Immunopathol.* 2017. Vol. 39, № 6. P. 653-667.
133. Jacobsen L.M. et al. T Cell Receptor Profiling in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 2017. Vol. 17, №11. P. 118.
134. Meza-Perez S., Randall T.D. Immunological Functions of the Omentum. *Trends Immunol.* 2017. Vol. 38, № 7. P. 526-536.
135. Qiu Y. et al. Adipose tissue macrophage in immune regulation of metabolism. *Sci. China Life Sci.* 2016. Vol. 59, № 12. P. 1232-1240.
136. Yao F., Zhang M., Chen L. Adipose Tissue-Specialized Immunologic Features Might Be the Potential Therapeutic Target of Prospective Medicines for Obesity. *J. Diabetes Res.* 2017. № 2017. P.4504612.
137. Sundara Rajan S., Longhi M.P. Dendritic cells and adipose tissue. *Immunology*. 2016. Vol. 149, № 4. P. 353-361.
138. Han S.J. et al. White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. *Immunity*. 2017. Vol. 47, № 6. P. 1154-1168.
139. Mc Laughlin T. et al. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *J. Clin. Invest.* 2017. Vol. 127, № 1. P. 5-13.
140. Fusaru A.M. et al. Role of innate immune receptors TLR2 and TLR4 as mediators of the inflammatory reaction in human visceral adipose tissue. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2012. № 53. P. 693-701.

141. Guven-Maiorov E., Tsai C.J., Nussinov R. Structural host-microbiota interaction networks. *PLoS Comput. Biol.* 2017. Vol. 13, № 10. P. 1005579.
142. Liu Y. et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014. Vol. 47, № 2. P. 136-47.
143. Kopp A., Buechler C., Neumeier M. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes. *J. Obesity.* 2009. № 648. P. 56.
144. Watanabe Y., Nagai Y., Takatsu K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *J. Nutrients.* 2013. Vol. 5, № 9. P. 3757-78.
145. Shi H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006. Vol. 116, № 11. P. 3015-25.
146. Tsukumo D., Carvalho-Filho M., Carvalheira J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *J. Diabetes.* 2007. Vol. 56, № 8. P.1986-98.
147. Saberi M., Woods N., de Luca C. Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. *J. Cell Metab.* 2009. № 419. P. 29.
148. Shvarts V. Physiological and pathological role of adipose tissue innate immune system receptors. *J. Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2010. № 3. P. 45-51.
149. Koenen T., Stienstra R., van Tits L. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue. *J. Endocrinology.* 2011. № 3769. P. 78.
150. Jacob A., Adams-Huet B., Raskin P. The visceral and subcutaneous fat changes in type 1 diabetes: a pilot study. *J. Diabetes Obes. Metab.* 2006. Vol. 524. P.30.
151. Камишний О.М. та ін. Імунометаболізм лімфоцитів і його зміни при експериментальному цукровому діабеті. *Патологія.* 2016. № 3(38). С. 102-108.

152. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008. Vol. 51, № 2. P. 216-226.

153. Radenković M., Stojanović M., Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2016. № 78. P. 13-31.

154. Wu J., Yan L.J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2015. № 8. P. 181-8.

155. Damasceno D.C. et al. Streptozotocin-induced diabetes models: pathophysiological mechanisms and fetal outcomes. *Biomed. Res. Int.* 2014. № 2014. P. 819065.

156. Орловский М. А. Экспериментальные исследования сахарного диабета 1 типа: причины меж- и внутривидовых различий в резистентности к диабетогенным факторам: (обзор лит. и собственных исследований). *Журн. АМН Украины*. 2006. Т. 12. № 2. С. 255–269.

157. Gutiérrez-Lara E.J. et al. Pharmacological evaluation of metformin and N-benzylbiguanide, a novel analogue of metformin, on the vasopressor responses to adrenergic system stimulation in pithed rats with fructose-induced insulin resistance. *Eur. J. Pharmacol.* 2017. № 814. P. 313-323.

158. Pandey A., Verma S., Kumar V.L. Metformin maintains mucosal integrity in experimental model of colitis by inhibiting oxidative stress and pro-inflammatory signaling. *Biomed. Pharmacother.* 2017. № 94. P. 1121-1128.

159. Soraya H. et al. Short-term treatment with metformin suppresses toll like receptors (TLRs) activity in isoproterenol-induced myocardial infarction in rat: are AMPK and TLRs connected? *J. Int. Immunopharmacol.* 2012. Vol. 14, № 4. P. 785-91.

160. Isoda K. et al. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *J. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. № 611. P. 7.

161. Andrews M., Soto N., Arredondo M. Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor- α , Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients. *Rev. Med. Chil.* 2012. Vol. 140. P. 1377-1382.

162. Hardie D. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *J. Diabetes.* 2013. Vol. 62, № 216. P. 72.

163. Путілін Д.А., Камишний О.М Особливості імунометаболізму лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну. *Морфологія.* 2016. № 2. С. 61-68.

164. Путилин Д.А., Камышный А.М. Изменения уровня экспрессии генов Glut1, mTOR и AMPK1 α лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Медицинская иммунология.* 2016. № 4. С. 349-356.

165. Kamyshny A., Putilin D. Immunometabolism of lymphocytes of pancreatic lymph nodes during experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus and after introduction of metformin. *Abstracts 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI)* (Hamburg, Germany, 27-30 September 2016). Hamburg. 2016. P. 221-222.

166. Ferretti C., La Cava A. Adaptive immune regulation in autoimmune diabetes. *Autoimmun. Rev.* 2016. Vol. 15, № 3. P. 236-41.

167. Путілін Д.А. та ін. Експресія рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну. *Проблеми ендокринної патології.* 2017. №1. С 63-70.

168. Eldershaw S., Sansom D., Narendran P. Expression and function of the autoimmune regulator (Aire) gene in non-thymic tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 2011. № 163. P. 296-308.

169. Cohen J.N. et al. Tolerogenic properties of lymphatic endothelial cells are controlled by the lymph node microenvironment. *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, №2. P. 87740.

170. Fletcher A., Malhotra D., Turley S. Lymph node stroma broaden the peripheral tolerance paradigm. *Trends Immunol.* 2011. № 32. P. 12-18.
171. Jensik P., Huggenvik J., Collard M. Identification of a nuclear export signal and protein interaction domains in deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1). *J. Biol. Chem.* 2004. № 279. P. 32692-32699.
172. Chow Z., Banerjee A., Hickey M. Controlling the fire – tissue-specific mechanisms of effector regulatory T-cell homing. *Immunol. Cell. Biol.* 2015. № 93. P. 355-363.
173. Putilin D.A., Kamyshnyi A.M. Distribution of FoxP3⁺ regulatory T-cells in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration. *Патологія.* 2015. №1. С. 39-43.
174. Putilin D.A., Kamyshnyi A.M., Kamyshna V.A. Reduced deaf1 mRNA expression during STZ-induced diabetes mellitus inhibits Foxp3⁺ regulatory T-cells differentiations in rat's pancreatic lymph nodes. *Mediterranean Journal of Biosciences.* 2016. № 1(1). С. 20-26.
175. Putilin D.A., Kamyshnyi A.M., Kamyshna V.A. Breakdown in peripheral immune tolerance in experimental diabetes mellitus. *Journal of Molecular Pathophysiology.* 2016. №3. P.31-36.
176. Камышный А.М. и др. Влияние экспериментального стрептозотоцинового диабета на дифференцировку Т-хелперов в панкреатических лимфатических узлах и кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани. *Сборник тезисов VII Всероссийского диабетологического конгресса.* (Москва, 24-27 февраля 2015). Москва. 2015. С. 56.
177. Putilin D.A., Kamyshny A.M. Changes in the expression level of transcription factor Foxp3 in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration. *Endocrine Abstracts 18th European Congress of Endocrinology* (Munich, Germany, 28 - 31 May 2016). 2016. P. 265.
178. Путілін Д.А. та ін. Особливості експресії TLR2 і TLR4 адипоцитами парапанкреатичної клітковини при експериментальному цукровому діабеті. *Biomedical and biosocial anthropology.* 2014. №22. С. 121-126.

179. Путилин Д.А., Камышный А.М. Влияние введения метформина на уровень экспрессии TLR2 и TLR4 адипоцитами парапанкреатической клетчатки при экспериментальном сахарном диабете. *Российский иммунологический журнал*. 2014. №2(1). С. 70-73.

180. Путілін Д.А. та ін. Зміни експресії генів mTOR, Foxp3, IL1 β і IL17A у парапанкреатичній жировій тканині щурів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2016. №4 (15). С. 92-97.

181. Kamyshny A.M., Putilin D.A., Chebotareva L.K. Influence of experimental diabetes mellitus on the expression of TLR2 and TLR4 adipocytes in peripancreatic adipose tissue. *Сучасні аспекти медицини та фармації: матеріали Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю* (Запоріжжя, 15-16 травня 2014р.). 2014. С. 46.

182. Kamyshny A.M., Putilin D.A. Distribution characteristics of Toll-like receptors of innate immunity in adipocytes of parapancreatic adipose tissue at an experimental diabetes mellitus and metformin administration. *Endokrynologia*. 2014. №4. P. 341.

183. Putilin D.A., Kamyshny A.M., Kamyshna V.A. Study of expression of genes mTOR, Foxp3, IL1 β and IL17A in parapancreatic adipose tissue of rats with streptozotocin-induced diabetes and after metformin administrations. *Endocrine Abstracts 19th European Congress of Endocrinology* (Lisbon, Portugal, 20 - 23 May 2017). 2017. P. 455.

184. Gerriets V., Rathmell J. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.* 2012. Vol. 33, № 4. P. 168-73.

185. Xu X. et al. mTOR, linking metabolism and immunity. *Semin. Immunol.* 2012. Vol. 24, № 6. P. 429-435.

186. Yang K., Chi H. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation. *J. Semin. Immunol.* 2012. Vol. 24, № 6. P. 421-8.

187. Waickman A.T., Powell J.D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *J. Immunol. Rev.* 2012. Vol. 249, № 1. P. 43-58.

188. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat. Rev. Immunol.* 2012. Vol. 12, № 5. P. 325-38.
189. Powell J.D. et al. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu. Rev. Immunol.* 2012. № 30. P. 39-68.
190. Russo G.L., Russo M., Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *J. Biochem. Pharmacol.* 2013. Vol. 86, № 3. P. 339-50.
191. Zarrouk M. et al. Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase-independent effects of metformin in T cells. *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 9. P. 106710.
192. Rolf J. et al. AMPK α 1: A glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. *Eur. J. Immunol.* 2013. Vol. 43, № 4. P. 889-96.
193. Kang K.Y. et al. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *International Immunopharmacology.* 2013. Vol. 16, №1. P. 85-92.
194. Pearce E.L. et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 2009. № 460. P. 103-107.
195. Nath N. et al. Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology.* 2009. № 182. P. 8005-8014.
196. Green A.S. et al. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood.* 2010. Vol. 116, № 20. P. 4262-4273.
197. Dworacki G. et al. Thymic emigration patterns in patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Immunology.* 2015. Vol. 146, № 3. P. 456-69.
198. Yin Y. et al. Glucose Oxidation Is Critical for CD4⁺ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* 2016. Vol. 196, № 1. P. 80-90.

199. Shin S. et al. Metformin Suppresses MHC-Restricted Antigen Presentation by Inhibiting Co-Stimulatory Factors and MHC Molecules in APCs. *Biomol. Ther. (Seoul)*. 2013. Vol. 21, № 1. P. 35-41.
200. Forslund K. et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015. Vol. 528, № 7581. P. 262-66.
201. Kim H.S. et al. Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. *Immunity*. 2007. Vol. 27, № 2. P. 321-333.
202. Burrows M.P. et al. Microbiota regulates type 1 diabetes through Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. Vol. 112, №32. P. 9973-7.
203. Filippi C.M. et al. TLR2 signaling improves immunoregulation to prevent type 1 diabetes. *J. Immunol*. 2011. Vol. 41, № 5. P. 1399-1409.
204. Karumuthil-Melethil S. et al. Induction of innate immune response through TLR2 and dectin 1 prevents type 1 diabetes. *Immunol*. 2008. Vol. 181, №12. P. 8323-8334.
205. Karumuthil-Melethil S. et al. TLR2- and Dectin 1-associated innate immune response modulates T-cell response to pancreatic β -cell antigen and prevents type 1 diabetes. *Diabetes*. 2015. Vol. 64, № 4. P. 1341-1357.
206. Bednar K.J. et al. Reversal of New-Onset Type 1 Diabetes With an Agonistic TLR4/MD-2 Monoclonal Antibody. *Diabetes*. 2015. Vol. 64, № 10. P. 3614-26.
207. Wen L. et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008. № 455. P. 1109-1113.
208. Kawai T., Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol*. 2009. Vol. 21, № 4. P. 317-337.
209. Wada J., Makino H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol*. 2016. Vol. 12, №1. P. 13-26.
210. Needell J.C., Zipris D. The Role of the Intestinal Microbiome in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Curr. Diab. Rep*. 2016. Vol. 16, № 10. P. 89-97.
211. Yip L., Fathman C. Type 1 diabetes in mice and men: gene expression profiling to investigate disease pathogenesis. *Immunol. Res*. 2014. № 58. P. 340-350.

212. Tonkin D., Haskins K. Regulatory T cells enter the pancreas during suppression of type 1 diabetes and inhibit effector T cells and macrophages in a TGF-beta-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 2009. № 39. P. 1313-1322.

213. Willcox A. et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 2009. № 155. P. 173-181.

214. Yaochite J.N. et al. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis. *Immunobiology.* 2013. Vol. 218, № 3. P. 338-52.

215. Sun J. et al. Macrophages overexpressing Aire induce CD4⁺Foxp3⁺ T cells. *Mol. Med. Rep.* 2013. Vol. 7, № 1. P. 159-165.

216. Hammerschmidt S. et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2008. № 205. P. 2483-2490.

217. Rouhani S. et al. Regulation of T-cell tolerance by lymphatic endothelial cells. *J. Clin. Cell Immunol.* 2014. №5. P. 1000242.

218. Dubrot J. et al. Lymph node stromal cells acquire peptide-MHCII complexes from dendritic cells and induce antigen-specific CD4⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 2014. № 211. P. 1153-1166.

219. Ferrante A.W. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes Metab.* 2013. № 15, Suppl 3. P. 34-8.

220. Zhou X. et al. Tissue resident regulatory T cells: novel therapeutic targets for human disease. *Cell Mol. Immunol.* 2015. Vol. 12, № 5. P. 543-52.

221. Chen X., Wu Y., Wang L. Fat-resident Tregs: an emerging guard protecting from obesity-associated metabolic disorders. *Obes. Rev.* 2013. Vol. 14, № 7. P. 568-78.

222. Feuerer M. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 2009. Vol. 15, №8. P. 930-9.

223. Cipolletta D. et al. Tissue-resident T(regs): a unique population of adipose-tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impacts organismal metabolism. *Semin. Immunol.* 2011. Vol. 23, № 6. P. 431-7.

224. Cipolletta D. et al. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature.* 2012. Vol. 486, №7404. P. 549-53.

225. Zeng H. et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish Treg-cell function. *Nature.* 2013. №499. P. 485-490.

226. Shin N.R. et al. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut.* 2014. Vol. 63, № 5. P. 727-35.

227. Daniela Cipolletta. Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology.* 2014. Vol. 142, № 4 P. 517-525.

228. Shao L. et al. SENP1-mediated NEMO deSUMOylation in adipocytes limits inflammatory responses and type-1 diabetes progression. *Nature communications.* 2015. № 6. P. 8917.

ДОДАТОК А1

"ЗАТВЕРДЖУЮ"

Проректор з науково-педагогічної роботи
Запорізького державного медичного
університетупрофесор Візір В.А.
"08" вересня 2018 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Найменування пропозиції для впровадження: „Механізми змін функціонального стану клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну”.
2. Установа, автор: Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, здобувач Путілін Д.А.
3. Джерело інформації: Проблеми ендокринної патології 2017 №5 с 63-70: „Експресія рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозоточиновому діабеті та після введення метформіну”.
Виявлено що розвиток діабету супроводжується зростанням кількості TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні і TLR4⁺- та RIGI⁺-лімфоцитів у м'якотних тяжках панкреатичних лімфатичних вузлів щурів, змінює щільність PPP на імунних клітинах.
4. Де і коли впроваджено: На кафедрі патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету у лекційному курсі та проведенні практичних занять за темами: "Патологічна фізіологія імунної і ендокринної системи".
5. Результати впровадження: Використання результатів наукових досліджень Д.А. Путіліна у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про експресію рецепторів вродженого імунітету при розвитку експериментального цукрового діабету.
6. Термін впровадження: 2017-2018 навчальний рік.
7. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету.
8. Зауваження та пропозиції: не вносились.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри
патологічної фізіології, д.мед.н., професор

Ганчева О.В.

ДОДАТОК А2



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Найменування пропозиції для впровадження: „Механізми змін функціонального стану клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну”.
2. Установа, автор: Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, здобувач Путілін Д.А.
3. Джерело інформації: «Патологія» №33, 2015р. с. 39-43.: «Distribution of FoxP3⁺ regulatory T-cells in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration»
При розвитку експериментального цукрового діабету кількість Treg в панкреатичних лімфатичних вузлах знижується, а метформін демонструє здатність збільшувати щільність їх популяції.
4. Де і коли впроваджено: На кафедрі фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини Запорізького національного університету у лекційному курсі та проведенні практичних занять за темами: "Фізіологія імунної та ендокринної систем".
5. Результати впровадження: Використання результатів наукових досліджень Д.А. Путіліна у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль транскрипційного фактора FoxP3⁺ при експериментальному цукровому діабеті та дає підстави вважати, що зміни рівня експресії в панкреатичних лімфатичних вузлах можуть впливати на розвиток цукрового діабету, а метформін демонструє здатність збільшувати щільність їх популяції.
6. Термін впровадження: 2017-2018 навчальний рік.
7. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету.
8. Зауваження та пропозиції: не вносились.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри

фізіології, імунології і біохімії

з курсом цивільного захисту та медицини

д.біол.н., професор

В.Д. Бовт

ДОДАТОК АЗ



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Найменування пропозиції для впровадження: „Механізми змін функціонального стану клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та паранкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну”.
2. Установа, автор: Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, здобувач Путілін Д.А.
3. Джерело інформації: «Патологія» №33, 2015р. с. 39-43.: «Distribution of FoxP3⁺ regulatory T-cells in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration»
При розвитку експериментального цукрового діабету кількість Treg в панкреатичних лімфатичних вузлах знижується, а метформін демонструє здатність збільшувати щільність їх популяції.
4. Де і коли впроваджено: На кафедрі патологічної фізіології Вищого державного навчального закладу України “Буковинський державний медичний університет” у лекційному курсі та проведенні практичних занять за темами: "Патологічна фізіологія імунної та ендокринної системи”.
5. Результати впровадження: Використання результатів наукових досліджень Д.А. Путіліна у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль транскрипційного фактора FoxP3 при експериментальному цукровому діабеті та дає підстави вважати, що зміни рівня експресії в панкреатичних лімфатичних вузлах можуть впливати на розвиток цукрового діабету, а метформін демонструє здатність збільшувати щільність їх популяції.
6. Термін впровадження: 2015-2016 навчальний рік.
7. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету.
8. Зауваження та пропозиції: не вносились.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри
патологічної фізіології, д.мед.н., професор

Ю. С. Роговий

ДОДАТОК А4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Харківського національного
медичного університету
д. мед. н., професор В.Д. Марковський

«20» 01. 2018 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень Путіліна Д.А. в навчальний процес

- Назва впровадження:** «Механізми змін функціонального стану клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну».
- Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, здобувач Путілін Д.А.
- Джерело інформації:** Проблеми ендокринної патології, 2017. №5. С. 63-70. Експресія рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну.
Виявлено, що розвиток діабету супроводжується зростанням кількості TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні і TLR4⁺- та RIGI⁺-лімфоцитів у м'якотних тяжках панкреатичних вузлів щурів, змінює щільність PPP на імунних клітинах.
- Де впроваджено:** В Харківському національному медичному університеті на кафедрі патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна у курсі лекцій та практичних занять за темами «Імунологічна реактивність», «Патофізіологія ендокринної системи».
- Терміни впровадження:** 2017-2018 навч. рік.
- Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Путіліна Д.А. в навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо експресії рецепторів вродженого імунітету при розвитку експериментального цукрового діабету.
- Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету.
- Зауваження та пропозиції:** Немає.

Відповідальний за впровадження:

зав. кафедри патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна
Харківського національного медичного університету
д. мед. н., професор

Зав. кафедрою
Т.М. АБАЙЧЕНКО

Ніколаєва О.В.

ДОДАТОК Б

НАУКОВІ ПРАЦІ, ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Путілін Д.А., Камишний О.М., Коновалова О.О., Камишна В.А. Особливості експресії TLR2 і TLR4 адипоцитами парапанкреатичної клітковини при експериментальному цукровому діабеті. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2014. №22. С. 121-126. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).
2. Путилин Д.А. Камышный А.М. Влияние введения метформина на уровень экспрессии TLR2 и TLR4 адипоцитами парапанкреатической клетчатки при экспериментальном сахарном диабете. *Российский иммунологический журнал*. 2014. №2(1). С.70-73. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).
3. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M. Distribution of FoxP3⁺ regulatory T-cells in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration. *Патологія*. 2015. №1. С. 39-43. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані, проведено їх статистичну обробку та сформульовані висновки).
4. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M., Kamyshna V.A. Reduced deafl mRNA expression during STZ-induced diabetes mellitus inhibits Foxp3⁺ regulatory T-cells differentiations in rat's pancreatic lymph nodes. *Mediterranean Journal of Biosciences*. 2016. № 1(1). С. 20-26. (Дисертантом самостійно проведено імунофлюоресцентне дослідження, обробка даних та підготовка матеріалу до друку).
5. Путілін Д.А., Камишний О.М. Особливості імунометаболізму лімфоцитів панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну. *Морфологія*. 2016. № 2. С.61-68. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).
6. Путилин Д.А. Камышный А.М. Изменения уровня экспрессии генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1α* лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов

крыс при експериментальному сахарному діабеті. *Медицинская иммунология*. 2016. № 4. С. 349-356. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

7. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M., Kamyshna V.A. Breakdown in peripheral immune tolerance in experimental diabetes mellitus. *Journal of Molecular Pathophysiology*. 2016. №3. P.31-36. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

8. Камишний О.М., Путілін Д.А., Сухомлінова І.Є., Камишна В.А. Імунометаболізм лімфоцитів і його зміни при експериментальному цукровому діабеті. *Патологія*. 2016. №3 (38). С. 102-108. (Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та сформульовані висновки).

9. Путілін Д.А., Камишний О.М., Камишна В.А., Сухомлінова І.Є. Зміни експресії генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у парапанкреатичній жировій тканині щурів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2016. №4 (15). С 92-97. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

10. Путілін Д.А., Камишний О.М., Камишна В.А., Сухомлінова І.Є. Експресія рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами панкреатичних лімфатичних вузлів при експериментальному стрептозотоциновому діабеті та після введення метформіну. *Проблеми ендокринної патології*. 2017. №1. С 63-70. (Дисертантом самостійно проведено імунофлюоресцентне дослідження, обробка даних та підготовка матеріалу до друку).

11. Камишний О.М., Жеребят'єв О.С., Топол І.О., Деген А.С., Тарасевич Ю.В., Прозорова Т.М., Путілін Д.А., Камишна В.А. Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин: пат. 102400, Україна, МПК G01N 21/00. № u201504559; заявл.12.05.15; опубл. 26.10.15 Бюл. № 20. (Дисертант співвиконавець розробки методики виділення РНК).

12. Kamyshny A.M., Putilin D.A., Chebotareva L.K. Influence of experimental diabetes mellitus on the expression of TLR2 and TLR4 adipocytes in peripancreatic adipose tissue. Сучасні аспекти медицини та фармації: матеріали Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю (Запоріжжя, 15-16 травня 2014р.). Запоріжжя, 2014. С. 46. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та сформульовані висновки, доповідь).*

13. Kamyshny A.M., Putilin D.A. Distribution characteristics of Toll-like receptors of innate immunity in adipocytes of parapancreatic adipose tissue at an experimental diabetes mellitus and metformin administration. Abstracts of the VIIth meeting of the association of endocrinologist of Ukraine (Kyiv, October 20-22, 2014). *Endokrynologia*. 2014. №4. P. 341. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).*

14. Камышный А.М., Путилин Д.А., Деген А.С., Камышная В.А. Влияние экспериментального стрептозотоцинового диабета на дифференцировку Т-хелперов в панкреатических лимфатических узлах и кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани. Сборник тезисов VII Всероссийского диабетологического конгресса. (Москва, 24-27 февраля 2015). Москва, 2015. С. 56. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).*

15. Putilin D.A., Kamyshny A.M. Changes in the expression level of transcription factor Foxp3 in rat's pancreatic lymph nodes under streptozotocin-induced diabetes and metformin administration. Endocrine Abstracts 18th European Congress of Endocrinology (Munich, Germany, 28 - 31 May 2016). Munich, 2016. P.265. *(Дисертантом самостійно проведено аналіз даних та написання тез).*

16. Kamyshny A., Putilin D. Immunometabolism of lymphocytes of pancreatic lymph nodes during experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus and after introduction of metformin. Abstracts 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, Germany, 27-30 September 2016). Hamburg,

2016. P.221-222. *(Дисертантом особисто проведено аналіз даних та написання тез).*

17. Putilin D.A., Kamyshny A.M., Kamyshna V.A. Study of expression of genes *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* and *IL17A* in parapancreatic adipose tissue of rats with streptozotocin-induced diabetes and after metformin administrations. Endocrine Abstracts 19th European Congress of Endocrinology (Lisbon, Portugal, 20 - 23 May 2017). Lisbon, 2017. P.455. *(Дисертантом особисто проведено аналіз даних та написання тез).*

ДОДАТОК В

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

- Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні аспекти медицини та фармації” (Запоріжжя, 2014), *(усна доповідь і публікація)*;
- VIIth meeting of the association of endocrinologist of Ukraine (Kyiv, 2014), *(усна доповідь і публікація)*;
- VII Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2015), *(публікація)*;
- 18th European Congress of Endocrinology (Munich, 2016), *(стендова доповідь і публікація)*;
- 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, 2016), *(стендова доповідь і публікація)*;
- 19th European Congress of Endocrinology (Lisbon, 2017), *(стендова доповідь і публікація)*;
- International conference Novel Concepts in Innate Immunity (Tübingen, 2017), *(стендова доповідь)*.