

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ПРОЗОРОВА ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА**

УДК 612.12:611/383]-053.2:[616.379-  
008.64:618.3]-085.252.349.7.032.31-  
092.9]:599.323.4

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЛІМФОЦИТІВ БРИЖОВОГО  
ЛІМФАТИЧНОГО ВУЗЛА У НАЩАДКІВ ЩУРІВ З  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕСТАЦІЙНИМ ДІАБЕТОМ І В УМОВАХ  
ІНДУКЦІЇ ОРАЛЬНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ІНСУЛІНУ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

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

\_\_\_\_\_ Т.М. Прозорова

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

Запоріжжя – 2020

## АНОТАЦІЯ

*Прозорова Т.М.* Функціональний стан лімфоцитів брижового лімфатичного вузла у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 «Патологічна фізіологія» – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

Дисертаційна робота присвячена з'ясуванню особливостей змін функціонального стану лімфоцитів брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну з допомогою імуофлюоресцентних і молекулярно-генетичних методів.

Встановлено, що у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом спостерігається значне зниження вмісту мРНК аутоімунного регулятора *Aire* в 8,1 рази у 1-місячних та в 2,3 рази у 6-місячних щурів. Вміст мРНК транскрипційного регулятора *Deaf1* у 1-місячних тварин достовірно не змінювався, а у 6-місячних нащадків спостерігалось її зменшення в 9,2 рази. Що стосується мРНК транскрипційного фактору *Foxp3*, то у 1-місячних щурів виявлено значне його зменшення – у 50 раз, а у 6-місячних – в 2,5 рази у порівнянні з контролем. Транскрипційна репресія гена *Foxp3* призводить до дефіциту супресорної сигналізації, що підтверджується пригніченням експресії генів супресорного цитокіну IL-10 та негативної костимуляторної молекули *Ctla4*. Групи тварин, нащадків щурів з ЕГД, яким перорально протягом перших 14 днів життя вводили інсулін показали наступні результати: у 1-місячних щурів спостерігалася транскрипційна індукція гену *Aire* – вміст мРНК аутоімунного регулятора збільшувався в 13,2 рази, у 6-місячних – в 2 рази. Транскрипційний регулятор *Deaf1* в першій віковій групі продемонстрував значне зростання – в

11,5 разів. Дослідження експресії транскрипційного фактору *Foxp3* показало, що у 1-місячних щурів відбулося збільшення вмісту його мРНК в 5,2 рази, а у 6-місячних – в 3,3 рази.

В експериментальних групах, що отримували перорально інсулін, також були досліджені експресія мРНК коstimуляторних молекул *Ctla4* та *Treg*-залежного супресорного цитокіну *IL-10*. Були отримані наступні результати: у віці 1 місяця відносна кількість мРНК гену *Ctla4* зросла у 12,2 рази, а у віці 6 місяців – достовірно не змінювалась. Вміст мРНК *IL-10*, навпаки, у першій віковій групі не змінювався, проте в 6-місячних щурів він зріс у 15 разів.

Доведено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігається значне збільшення вмісту мРНК гену *Ccr7* – в 26,8 рази у 1-місячних та в 21 раз у 6-місячних нащадків. Що стосується вмісту мРНК рецептору *Sxcr4*, то в обох вікових групах він достовірно не змінився. Відносна нормалізована кількість мРНК адресину *MAdCAM-1* у віці 1 місяця зросла у 2,4 рази, а в 6 місяців – в 2,3 рази. При дослідженні експресії гену *Slpr1* були отримані такі результати: у першій віковій групі вміст мРНК *S1PR1* збільшився у 3,6 рази, у старших тварин цей показник зріс у 5 раз. Групи тварин, нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом, яким перорально протягом перших 14 днів життя вводили інсулін показали наступні результати: кількість мРНК гену *Ccr7* у 1-місячних тварин зменшилась на 81 %, а у 6-місячних щурів достовірних змін не виявлено. Експресія гену *Sxcr4* не зазнала достовірних змін у обох вікових групах. Кількість мРНК адресину *MAdCAM-1* у віці 1 місяця зменшилась на 95 %, тоді як у 6-місячних щурів збільшилась в 3,9 рази. Вміст мРНК гену *Slpr1* у щурів першої вікової групи знизився на 65 %, а старшої – на 96 %.

Результати проведених експериментальних досліджень показали, що розвиток ЕГД супроводжується транскрипційною індукцією гена *Nlrp3* в БЛВ у нащадків, рівень мРНК якого зростав в 5 разів у 1-місячних і в 3 рази у 6-місячних тварин. Введення глібенкламіду під час вагітності інгібує транскрипцію гена *Nlrp3* лише у віці 1 міс. в 5,3 рази і не змінюється у старшій віковій групі.

Встановлено, що у нащадків щурів з ЕГД зростає щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ, більш виразно на ранніх термінах спостереження. Прийом глібенкламід у знижує кількість NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів лише у віці 1 міс, тоді як у 6-місячних нащадків їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає.

Відмічено, що пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, більш виразно на 1 місяць життя, змінює щільність PPP на імунних клітинах. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшується чисельність TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – TLR2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-клітин. Динаміка по зменшенню кількості клітин, імунопозитивних до PPP у корковому плато БЛВ зберігається до 6-місячного віку, супроводжується переважним зменшенням щільності мембранних і концентрації цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету в обох вікових групах, насамперед у лімфобластів. Введення глібенкламід вагітним самкам знижують у корковому плато БЛВ 1-місячних нащадків кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів, у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-клітин, взагалі не впливають на їх чисельність у мозкових тяжках, переважно зменшують щільність PPP на імунопозитивних лімфоцитах БЛВ на ранніх термінах спостереження.

З'ясовано, що пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, більш виразно на 1 місяць життя, а також призводить до зменшення кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та змінює щільність PPP на імунних клітинах. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшується чисельність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – RORγt<sup>+</sup>-клітин. У віці 6 місяців можна стверджувати про значне зменшення сумарної щільності T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>- лімфоцитів на тлі зростання кількості Foxp3<sup>+</sup>-клітин. Введення глібенкламід вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, призводить до зниження у БЛВ 1-місячних та 6-місячних нащадків кількості лише RORγt<sup>+</sup>-клітин. Також збільшується кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

Наукова новизна. В результаті роботи за допомогою сучасних молекулярно-генетичних і імуофлюоресцентних методів виявлено комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД та в умовах формування оральної толерантності до інсуліну: порушення формування периферичної імунологічної толерантності, активація ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах БЛВ, зміни розподілу ефекторних Т-клітин в БЛВ, посилення прозапальної сигналізації на тлі зменшення рівня мРНК *Foxp3*.

Виявлено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігаються такі порушення імунотолерантності: репресія гена *Aire*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*. Зниження кількість Т-регуляторних клітин. Пероральне введення інсуліну в перші 2 тижні нівелює ці зміни. Воно викликає транскрипційну активацію генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il10*.

Встановлено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігається значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *Slpr1*. Формування оральної толерантності до інсуліну супроводжується зниженням мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *Slpr1* в клітинах БЛВ.

Виявлено, що розвиток ЕГД супроводжується транскрипційною індукцією гена *Nlrp3* в БЛВ у нащадків. Введення глібенкламіду під час вагітності інгібує транскрипцію гена *Nlrp3*. У нащадків щурів з ЕГД зростає щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ, більш виразно на ранніх термінах спостереження. Прийом глібенкламіду знижує кількість NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів лише у віці 1 міс, тоді як у 6-місячних нащадків їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає.

Експериментально доведено активацію компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЕГД і зростання кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів у БЛВ у нащадків, більш виразно на 1 місяць життя, змінює щільність ПРР на імунних клітинах. Введення глібенкламіду вагітним самкам знижують у БЛВ 1-місячних нащадків кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів, у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-клітин.

З'ясовано, що пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, а також призводить до зменшення кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та змінює щільність PPP на імунних клітинах. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у нащадків зменшується чисельність T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>- лімфоцитів на тлі зростання кількості Foxp3<sup>+</sup>-клітин. Введення глібенкламід у вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, призводить до зниження у БЛВ 1-місячних та 6-місячних нащадків кількості лише RORγt<sup>+</sup>-клітин. Також збільшується кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

Обґрунтована доцільність застосування пероральних введень інсуліну для корекції імунних порушень, що виникають у нащадків, що народжені від матерів з гестаційним діабетом. Вперше продемонстрована здатність глібенкламід впливати на транскрипційну активність гена *Nlrp3*, зменшувати чисельність лімфоцитів, експресуючих PPP, змінювати розподіл TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів а також кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-клітин у у нащадків щурів з ЕГД.

Практичне значення. Проведені дослідження становлять практичний інтерес для сучасної діабетології, ендокринології, імунології і доводять, що порушення функціонування клітин БЛВ 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 пероральних введень інсуліну для корекції імунних порушень, що виникають у нащадків, що народжені від матерів з гестаційним діабетом.

**Ключові слова:** експериментальний гестаційний діабет, лімфоцити, оральна толерантність, брижові лімфатичні вузли.

## ANNOTATION

*Prozorova T.M.* Functional state of the mesenteric lymph nodes' lymphocytes in the offspring of experimental rats with gestational diabetes and after induction of oral insulin tolerance. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis is submitted for a candidate degree in Medical Sciences in specialty 14.03.04 "Pathological physiology" – Zaporizhzhya State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhya, 2020.

Zaporizhzhya State Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhya, 2020.

The dissertation is devoted to the clarification of the peculiarities of changes in the functional state of the mesenteric lymph nodes in the rats with experimental gestational diabetes and in the induction of oral insulin tolerance by means of immunofluorescence and molecular genetic methods.

It has been established that in the offspring of experimental rats with gestational diabetes, a significant decrease in the content of mRNA of the autoimmune regulator *Aire* was 8.1 times in the 1-month and 2.3-fold in the 6-month rats. The content of mRNA of the transcriptional regulator *Deaf1* in 1-month-old animals did not significantly change, and in the 6-month-old descendants it was observed to decrease by 9.2 times. Regarding mRNA of the transcription factor *Foxp3*, in the 1-month-old rats, a significant decrease was detected – 50-fold, and 6-month – two-fold, compared to control. Animal groups, the descendants of rats with EGD, which were injected insulin over the first 14 days of life, showed the following results: in the 1-month-old rats, transcriptional induction of the *Aire* gene was observed: the content of the autoimmune regulator mRNA increased by 13.2 times, at 6 months at 2 times. The transcriptional regulator *Deaf1* in the first age group showed a significant increase – 11.5 times. The *Foxp3* transcription factor expression study showed that in one-month-old rats, the content of its mRNA increased by 5.2-fold, and in the 6-month-old – by 3.3-fold.

In the experimental groups receiving oral insulin, the expression of the mRNA of the costimulatory molecules *Ctla4* and the Treg-dependent suppressor cytokine IL-

10 was also studied. The following results were obtained: at the age of 1 month, the relative number of mRNA of the *Ctla4* gene increased by 12.2 times, and at the age of 6 months, it did not change significantly. The IL-10 mRNA content, on the contrary, did not change in the first age group, but in the 6-month-old rats it increased 15-fold.

It has been shown that in the offspring of rats with EGD there is a significant increase in the content of the mRNA of the gene *Ccr7* – 26.8 times in 1-month and 21 times in the 6-month-old descendants. Regarding the content of the mRNA receptor *Cxcr4*, in both age groups it has not significantly changed. Relative normalized amount of mRNA addresses *MAdCAM-1* at the age of 1 month increased by 2.4 times, and in 6 months – by 2.3 times. In the study of expression of the *Slpr1* gene, the following results were obtained: in the first age group, the S1PR1 mRNA content increased 3.6-fold; in older animals, this figure increased 5-fold. Animal groups, the descendants of experimental gestational diabetes mice who were given oral insulin during the first 14 days of life showed the following results: the amount of mRNA of the *Ccr7* gene in 1-month-old animals decreased by 81 %, and no significant changes were observed in 6-month-old rats. Expression of the gene *Cxcr4* has not undergone a significant change in both age groups. The number of mRNA addresses MAdCAM-1 at the age of 1 month decreased by 95 %, while in the 6-month rats, the increase was 3.9-fold. The content of the mRNA of the *Slpr1* gene in rats in the first age group decreased by 65 % and the older ones by 96 %.

The results of experimental studies have shown that the development of EGD is accompanied by transcriptional induction of the *Nlrp3* gene in the MLN in descendants, the level of mRNA which increased 5 times in 1-month and 3-fold in 6-month-old animals. Introduction of glibenclamide during pregnancy inhibits the transcription of the *Nlrp3* gene only at the age of 1 month in 5.3 times and does not change in the older age group.

It was established that the descendants of rats with EGD increase the population density of NLRP3<sup>+</sup> lymphocytes in MLN, more clearly in the early stages of observation. Admission of glibenclamide reduces the number of NLRP3<sup>+</sup> lymphocytes



only at the age of 1 month, while in the 6-month-old descendants, their number in the brains even increases.

It is noted that prenatal hyperglycemia leads to an increase in the number of TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup>, NOD2<sup>+</sup> and RIG-I<sup>+</sup> lymphocytes in the MLN in the offspring, more definitely for 1 month of life, and changes the density of PRP on the immune cells. In the conditions of the formation of oral insulin tolerance in the 1-month offspring, the number of TLR2<sup>+</sup> and TLR4<sup>+</sup> lymphocytes decreases in the cornea of the MLN, in the brain strains TLR2<sup>+</sup> and RIG-I<sup>+</sup> cells. The dynamics of the decrease in the number of cells immune to PRP in the cornea of the MLN remains up to 6 months of age, accompanied by a predominant decrease in the membrane density and the concentration of the cytoplasmic receptors of innate immunity in both age groups, primarily in the lymphoblasts. Introduction of glibenclamide to pregnant females reduces the number of TLR4<sup>+</sup> and RIG-I<sup>+</sup>-lymphocytes in the cortical plateau of MLN 1-month-old descendants, in the 6-month-old TLR2<sup>+</sup>-cells, they generally do not affect their number in the brains, preferentially reduce the density of PRP on immunoposition lymphocytes MLN in the early stages of observation.

Prenatal hyperglycemia has been shown to increase the number of T-bet<sup>+</sup>- and RORγt<sup>+</sup>-lymphocytes in the MLN in the offspring, more definitely for 1 month of life, and also leads to a decrease in the number of Foxp3<sup>+</sup> lymphocytes and changes in the density of PRP on the immune cells. In the conditions of the formation of oral insulin tolerance in 1-month offspring, the number of T-bet<sup>+</sup>-lymphocytes in the cornea platelet MLN decreases, in the brain strains, the RORγt<sup>+</sup>-cells. At the age of 6 months, a significant decrease in the total density of T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- and Foxp3<sup>+</sup>-cells can be confirmed. Introduction of glibenclamide to pregnant females does not change the total amount of T-bet<sup>+</sup>-lymphocytes, leading to a decrease in the lone 1-month and 6-month offspring of the amount of only the RORγt<sup>+</sup>-cell in the MLN. Also increases the number of Foxp3<sup>+</sup>-cells.

Scientific novelty. As a result of work with the help of modern molecular genetic and immunofluorescence methods, a complex of key pathophysiological and functional changes in MLN cells in the offspring of rats with EGD and in conditions

of formation of oral insulin tolerance was found: violation of the formation of peripheral immunological tolerance, activation of PRR of the congenital immune system on lymphocytes MLN, changes in the distribution of effector T-cells in MLN, increased pro-inflammatory signaling against the background of decreasing *Foxp3* mRNA levels.

For the first time, it was found that the following offsprings of immune tolerance were observed in the offspring of EGD rats: *Aire* gene repression, *Deaf1* mRNA decrease, transcription factor *Foxp3*. Decrease the number of T-regulatory cells. Oral administration of insulin in the first 2 weeks reduces these changes. It causes transcriptional activation of *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* and *Il10* genes.

For the first time, it was found that there is a significant increase in the content of the *Ccr7*, *MAdCAM* and *Slpr1* mRNA in the offspring of the EGD rats. The formation of oral insulin tolerance is accompanied by a decrease in the mRNA of the *Ccr7*, *Madcam1* and *Slpr1* genes in MLN cells.

It was first established that the development of EGD is accompanied by the transcriptional induction of the *Nlrp3* gene in the MLN in descendants. Introduction of glibenclamide during pregnancy inhibits the transcription of the *Nlrp3* gene. In the offspring of rats with EGD the density of the population of NLRP3<sup>+</sup>-lymphocytes in MLN increases, more clearly in the early stages of observation. Admission of glibenclamide reduces the number of NLRP3<sup>+</sup> lymphocytes only at the age of 1 month, while in the 6-month-old descendants, their number in the brains even increases.

Experimentally proved the activation of the components of the congenital immune system in the development of EGD and the increase in the number of TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup>, NOD2<sup>+</sup> and RIG-I<sup>+</sup> lymphocytes in the MLN in the offspring, more definitely for 1 month of life, changes in the density of PRR in immune cells. Introduction of glibenclamide to pregnant females reduces the number of TLR4<sup>+</sup> and RIG-I<sup>+</sup> lymphocytes in the BLL, and the TLR2<sup>+</sup>-cell alone in the 6-month-old.

It has been shown that prenatal hyperglycemia leads to an increase in the number of T-bet<sup>+</sup>- and RORγt<sup>+</sup>-lymphocytes in the MLN in descendants, and also leads to a decrease in the number of Foxp3<sup>+</sup> lymphocytes and changes in the density of PRR on

immune cells. With the formation of oral insulin tolerance, the number of T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- and Foxp3<sup>+</sup>- cells decreases in the offspring. Introduction of glibenclamide to pregnant females does not change the total amount of T-bet<sup>+</sup>-lymphocytes, leading to a decrease in the lone 1-month and 6-month offspring of the amount of only the RORγt<sup>+</sup>-cell in the MLN. Also increases the number of Foxp3<sup>+</sup>-cells.

The expediency of the use of oral insulin injections for correcting immune disorders occurring in descendants from mothers with gestational diabetes is substantiated. The ability of glibenclamide to influence the transcriptional activity of the *Nlrp3* gene, reduce the number of lymphocytes expressing PRP, change the distribution of TLR4<sup>+</sup> and RIG-I<sup>+</sup> lymphocytes, as well as the number of T-bet<sup>+</sup>- and RORγt<sup>+</sup> cells in the offspring of rats with EGD, was demonstrated for the first time.

Practical meaning. The conducted researches are of practical interest for modern diabetes, endocrinology, immunology and prove that violations of the functioning of the MLN cells play an important role in the immunopathogenetic mechanisms of diabetes mellitus and can be one of the factors that support the development and progression of the pathological process. The expediency of oral administration of insulin for the correction of immune disorders occurring in descendants from mothers with gestational diabetes has been substantiated.

**Key words:** *experimental gestational diabetes, lymphocytes, mesenteric lymph nodes, immune metabolism.*

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Камышный А.М., Прозорова Т.М., Камышная В.А. Влияние экспериментального гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК AIRE и характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup>клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства. *Морфология*. 2015. Т. 9, № 2. С. 29-35. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)
2. Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3,CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології*. 2016. № 3(57). С.50-59. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)
3. Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Mechanisms of oral tolerance to insulin in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*. 2017. V.2 (2), P. 27-33. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)
4. Прозорова Т.М., Камишний О.М., Топол І.О. Транскрипційна індукція генів – регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів *madcam1*, *s1pr1*, *sxcr4* і *ccr7* в умовах експериментального гестаційного діабету, що впливає на розподіл Т-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2017. № 1. С. 23–33. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)
5. Камишний О.М., Прозорова Т.М., Камишна В.А. Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламіду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 2(40), С. 149–155. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

6. Прозорова Т.М., Камишна В.А., Морозова О.В., Коваль Г.Д., Камишний О.М. Особливості експресії рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2018. Т. 17, № 2 (64). С. 63–69. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

7. Прозорова Т.М., Крупей К.С., Камишний О.М. Ключові функціональні зміни у клітинах брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2020. № 1, С. 36–41. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

8. Prozorova T., Tokarskyu O., Fedoniuk L., Harbuzova V., Morozova O., Egorov A., Kamyshnyi A. Changes in the Transcriptional Activity of the Lymphocyte Homing Regulatory Genes *Madcam1*, *Cxcr3*, *Ccr7* and *S1pr1* Affect Structure of the Population of *T-bet<sup>+</sup>*, *Roryt<sup>+</sup>* and *Foxp3<sup>+</sup>* cells in Mesenteric Lymph Nodes in Offspring of Rats with Experimental Gestational Diabetes *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*. 2020. Vol. 27(3), P. 185–194 (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

9. Прозорова Т.М. Характер розподілу Th17-клітин в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я: Збірка тез доповідей*. (м. Запоріжжя 26–27 березня 2015р.). Запоріжжя. 2015. С. 63.

10. Prozorova T., Kamyshny A. Reduction of autoimmune regulator Aire mRNA and number of Treg-cells in mesenteric lymph nodes in the offspring of rats with experimental gestational diabetes. *18th European Congress of Endocrinology*. (Munich, 28–31 May 2016). Munich. 2016. Vol. 41, P. 260. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).

11. Prozorova T., Kamyshny A. Expression level of Aire, Deaf1, Foxp3, Ctla4 and Il-10 mRNA in the offspring of rats with experimental gestational diabetes and in conditions of insulin oral tolerance formation. *Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI)*. (Hamburg, 27–30 Sept. 2016). Hamburg. 2016. P. 319. *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*.

12. Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Changes in gene expression MADCAM1, S1PR1, CXCR4 and CCR7 in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *19th European Congress of Endocrinology*. (Lisbon, 20–23 May 2017) Lisbon. 2017. Vol. 49, P454 *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*

13. 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)*.

## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.....	21
Вступ.....	23
Розділ 1 Роль брижових лімфатичних вузлів у розвитку і прогресії цукрового діабету 1 типу (огляд літератури).....	31
1.1 Гестаційний цукровий діабет і його наслідки для нащадків .	31
1.2 БЛВ як центр формування оральної толерантності до антигенів і рециркуляції лімфоцитів в КАЛТ...	34
1.3 Глібенкламід як фактор корекції імунних порушень при ГД..	41
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження.....	47
2.1 Експериментальні тварини .....	47
2.2 Групи експериментальних досліджень .....	47
2.3 Експериментальні моделі .....	49
2.3.1 Моделювання експериментального гестаційного діабету .....	49
2.3.2 Введення глібенкламїду .....	50
2.4 Методи імунофлюоресцентного дослідження.....	52
2.4.1 Дослідження експресії TLR2 і TLR4 рецепторів за допомогою реакції прямої імунофлюоресценції у брижових лімфатичних вузлах.....	52
2.4.2 Дослідження розподілу NOD2 <sup>+</sup> , RIG-I <sup>+</sup> , Nlrp3 <sup>+</sup> , T-bet <sup>+</sup> , RORγt <sup>+</sup> і Foxp3 <sup>+</sup> лімфоцитів за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції у БЛВ.....	55
2.5 Методи молекулярно-генетичного дослідження.....	57
2.5.1 Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін.....	57
2.5.2 Виділення тотальної РНК.....	58
2.5.3 Зворотна транскрипція (виділення кДНК).....	59

2.5.4	Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.....	59
2.6	Методи статистичних досліджень .....	62
Розділ 3.	Визначення рівня транскрипційної активності генів <i>Aire</i> , <i>Deaf1</i> , <i>Foxp3</i> , <i>Ctla4</i> і <i>Il10</i> в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну.....	63
3.1	Дослідження експресії мРНК генів <i>Aire</i> та <i>Deaf1</i> та <i>Foxp3</i> .....	65
3.2	Дослідження експресії мРНК генів <i>Ctla4</i> і <i>Il10</i> .....	69
Розділ 4.	Вплив ЕГД на кількісний рівень транскриптів генів-регуляторів <i>Madcam1</i> , <i>Slpr1</i> , <i>Cxcr4</i> і <i>CCR7</i> , а також характер експресії мРНК NLRP3-інфламасоми і розподілу NLRP3 <sup>+</sup> -клітин в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, та в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну і після введення глібенкламіді .....	72
4.1	Дослідження експресії мРНК генів <i>Ccr7</i> , <i>Cxcr4</i> , <i>Madcam1</i> і <i>Slpr1</i> .....	72
4.2	Характер експресії мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3 <sup>+</sup> -клітин в БЛВ.....	76
4.2.1	Характер експресії мРНК NLRP3-інфламасоми в БЛВ.....	76
4.2.2	Особливості експресії <i>Nlrp3</i> в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.....	78
4.2.3	Особливості експресії <i>Nlrp3</i> в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введення глібенкламіді вагітним самкам	81
4.2.4	Особливості експресії <i>Nlrp3</i> в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	85



Розділ 5. Розподіл рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, NOD2 і RIG-I серед лімфоцитів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, після введень глібенкламід, в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну.....	87
5.1 Характер розподілу TLR2 <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ.....	87
5.1.1 Особливості експресії TLR2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету .....	87
5.1.2 Особливості експресії TLR2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введень глібенкламід вагітним самкам	88
5.1.3 Особливості експресії TLR2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	90
5.2 Характер розподілу TLR4 <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ.....	94
5.2.1 Особливості експресії TLR4 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету .....	94
5.2.2 Особливості експресії TLR4 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введень глібенкламід вагітним самкам	97
5.2.3 Особливості експресії TLR4 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	100
5.3 Зміни розподілу NOD2 <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ.....	102
5.3.1 Особливості експресії NOD2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії	102

	Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету .....	
5.3.2	Особливості експресії NOD2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введення глібенкламіду вагітним самкам	104
5.3.3	Особливості експресії NOD2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	108
5.4	Зміни розподілу RIG-I <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ.....	110
5.4.1	Особливості експресії RIG-I в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету .....	110
5.4.2	Особливості експресії RIG-I в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введення глібенкламіду вагітним самкам	113
5.4.3	Особливості експресії RIG-I в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	115
Розділ 6 Вивчення клітинного складу субпопуляцій Т-хелперів T-bet <sup>+</sup> (Th1), RORγt <sup>+</sup> (Th17) і Foxp3 <sup>+</sup> -лімфоцитів (Treg) в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД в цих же експериментальних групах.....		
6.1	Аналіз клітинного складу T-bet <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ.....	119
6.1.1	Особливості розподілу T-bet <sup>+</sup> -лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.....	119

6.1.2	Особливості експресії T-bet в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введень глібенкламід у вагітним самкам	120
6.1.3	Особливості експресії T-bet в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	124
6.2	Аналіз клітинного складу ROR $\gamma$ <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ .....	125
6.2.1	Особливості експресії ROR $\gamma$ в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.....	125
6.2.2	Особливості експресії ROR $\gamma$ в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введень глібенкламід у вагітним самкам	127
6.2.3	Особливості експресії ROR $\gamma$ в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	127
6.3	Аналіз клітинного складу Foxp3 <sup>+</sup> -лімфоцитів в БЛВ .....	131
6.3.1	Особливості експресії Foxp3 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету .....	131
6.3.2	Особливості експресії Foxp3 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введень глібенкламід у вагітним самкам	134
6.3.3	Особливості експресії Foxp3 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.....	135
	Розділ 7 Аналіз і узагальнення результатів дослідження.....	139

Висновки.....	161
Список використаних джерел.....	163
Додаток А Акти впровадження.....	184
Додаток Б Список опублікованих автором праць на тему дисертації	189
Додаток В Відомості про апробацію результатів дисертації	192

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ЦД	– цукровий діабет
ЕГД	– експериментальний стрептозотоцин-індукований гестаційний діабет
БЛВ	– брижові лімфатичні вузли
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
RIG-I	– (retinoic acid-inducible gene 1), рецептор групи RLR, фермент хеліказа
Aire	– аутоімунний регулятор
Deaf1	– (deformed epidermal autoregulatory factor 1), транскрипційний регулятор експресії периферичних антигенів
ПТА	– периферичні тканиноспецифічні антигени
IL1 $\beta$	– інтерлейкін 1 $\beta$
IL17A	– інтерлейкін 17A
Th1	– Т-хелпери 1 типу
Th17	– Т-хелпери 17 типу
Treg	– Т-регуляторні клітини
Foxp3	– (forkhead box P3) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Treg
T-bet	– (T-box transcription factor) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-клітин у напрямку Th1
ROR $\gamma$ t	– (ретиноїд-орфан рецептор $\gamma$ t) фактор транскрипції, який

	спрямовує диференціювання Т- клітин у напрямку Th17
STZ	– стрептозотонин
eTACs	– екстратимічні клітини, що експресують Aire
ДК	– дендритні клітини
АПК	– антиген-презентуючі клітини
GAPDH	– гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
PBI	– рецептори вродженого імунітету

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Гестаційний цукровий діабет (ГД) – це порушення толерантності до глюкози різного ступеня тяжкості, що виявляється у 2–6 % всіх вагітностей [1–3]. Різні звіти вказують на те, що материнський імунітет змінюється під час вагітності [4]. Менше відомо про те, як внутрішньоутробна гіперглікемія змінює імунне мікросередовище нащадків. ГД є одним з чинників ризику розвитку надалі у потомства імунних порушень, зокрема ЦД 1 і 2 типу. Вагітність у нормі викликає зміни імунного статусу у напрямку імуносупресії, що нівелюється в умовах ГД. Так, у жінок з ГД відбувається зростання маркерів активації Т-лімфоцитів, кількості самих Т-клітин та зменшення CTLA-4. Таким чином, гіперглікемія, що розвивається у матері при ГД, може чинити вплив на морфогенез органів імунної системи [5–6].

Одним з найважливіших механізмів, що попереджує розвиток аутоімунних захворювань (АІЗ), є формування імунологічної толерантності до власних антигенів (Аг). В останні роки була знайдена екстратимічна експресія цілого ряду периферичних тканиноспецифічних антигенів (PTSAs – peripheral tissue-specific antigens). Серед них такі панкреатичні Аг як інсулін та його попередник проінсулін, регулятором ектопічної транскрипції яких виступає аутоімунний регулятор (Aire) [7]. Велика кількість екстратимічних Aire-експресуючих клітин (eTACs – extrathymic Aire-expressing cells) знаходиться в лімфатичних вузлах (ЛВ) та представляють собою ключовий фактор формування саме периферичної імунної толерантності (ПІТ) [8–9]. PTSAs експресуються клітинами строми ЛВ [10], а їх експресія регулюється не лише eTACs, але й наявністю транскрипційного регулятора Deaf1 (deformed autoregulatory factor 1) [11]. Обидва регулятора, Aire та Deaf1 в свою чергу впливають на диференціювання індукцибельних Т-регуляторних клітин (iTreg), які експресують транскрипційний фактор Foxp3. Згадана популяція лімфоцитів безпосередньо контролює і попереджує розвиток аутоімунних захворювань (АІЗ) [12]. Робота iTreg полягає у продукції ряду супресорних цитокінів – IL-10, IL-13, IL-35 та TGFβ і безпосередньо залежить від рівня експресії негативних коstimуляторних

молекул, таких як CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) [13–14]. Так, клітини стромы брижових лімфатичних вузлів (БЛВ), що експресують Deaf1, виробляють ретиноеву кислоту, яка поліпшує утворення Foxp3<sup>+</sup>-регуляторних Т-лімфоцитів [15]. Yang S. та ін. довели здатність Aire сприяти формуванню в перинатальному періоді популяції Foxp3<sup>+</sup>Treg-клітин, яка зберігається і у дорослих мишей [25]. Ключове значення для утворення підкласу регуляторних Т-клітин і механізму індукції толерантності має місце представлення Аг [26–27].

БЛВ – це основне місце для індукції оральної толерантності (ОТ) до різноманітних Аг серед інших лімфоїдних тканин [28–30]. Презентація харчових Аг відбувається саме в БЛВ, а не пейєрових бляшках, а ОТ не може бути індуквана у мишей, позбавлених БЛВ, але це не впливає на тварин, в яких було видалено пейєрові бляшки [31]. Найголовніше, що саме БЛВ є головним пунктом транзиту для пула рециркулюючих лімфоцитів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ). Головними регуляторами “хоумінга” лімфоцитів до БЛВ є адресин MAdCAM-1, хемокінові рецептори CXCR4 і CCR7 [29, 32, 33]. В свою чергу, вихід лімфоцитів з БЛВ регулюється сфінгозин-1-фосфат (S1P) рецепторами (S1PR1–S1PR5) [34], серед яких лімфоцитами найбільш активно експресується 1 тип – S1PR1 [35].

Використання слизової оболонки є дуже привабливим для вироблення периферичної толерантності, особливо у здорових дітей. У експериментах з використанням тваринних моделей, оральне або інтраназальне введення антигену індукувало ПТТ, а головним місцем для індукції ПТТ є брижові лімфатичні вузли (БЛВ), в яких відбувається інтенсивна активація наївних Т-лімфоцитів та їх диференціювання в субпопуляцію ефекторних клітин [29, 36].

Отже, використання слизових оболонок є привабливим шляхом для введення Аг як толерогенів, зокрема основного β-клітинного Аг – інсуліну, особливо у ранньому віці [37]. Крім того, важливою ланкою патогенезу ГД є активація одного з NOD-подібних рецепторів вродженого імунітету (РВІ) – NLRP3-інфламасоми [38]. Насамперед доцільно звернути увагу на глібенкламід,



який серед інших інгібіторів інфламасоми також ефективно коригує гіперглікемію у вагітних [39].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом планових науково-дослідних робіт 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, терміни виконання 2012–2017рр.) та «Молекулярно-генетичний аналіз змін транскриптому генів імунної відповіді і кишкового мікробіому в умовах експериментальної патології та розробка методів їх корекції» (державний реєстраційний номер 0118U007141, терміни виконання 2018–2022 рр.). Дисертант є їх співвиконавцем.

**Мета дослідження** – з'ясувати патогенетичні особливості змін функціонального стану лімфоцитів брижових лімфатичних вузлів у нащадків самиць з експериментальним стрептозотоцин-індукованим гестаційним діабетом (ЕГД), самиць з ЕГД після введення глібенкламіду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

#### **Завдання дослідження.**

1. З'ясувати особливості формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів шляхом визначення рівня транскрипційної активності генів Aire, Deaf1, Foxp3, Ctla4 і Il10 в БЛВ у нащадків самиць-щурів з ЕГД, самиць з ЕГД після введення глібенкламіду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

2. Визначити кількісний рівень транскриптів генів-регуляторів рециркуляції і «хоумінгу» лімфоцитів Madcam1, S1pr1, Cxcr4 і CCR7, характер експресії мРНК NLRP3-інфламасоми і розподілу NLRP3<sup>+</sup>-клітин в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, самиць з ЕГД після введення глібенкламіду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

3. Вивчити розподіл рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, NOD2 і RIG-I серед лімфоцитів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, самиць з ЕГД після

введення глібенкламіду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

4. Дослідити динаміку клітинного складу субпопуляцій Т-хелперів T-bet<sup>+</sup> (Th1), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (Th17) і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів (Treg) в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, самиць з ЕГД після введення глібенкламіду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

*Об'єкт дослідження.* Експериментальний гестаційний діабет і його патогенетична корекція у нащадків.

*Предмет дослідження.* Морфо-функціональний стан клітин БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, самиць з ЕГД після введення глібенкламіду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

*Методи дослідження:* патофізіологічні (моделювання експериментального гестаційного 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<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, RIG-I<sup>+</sup>-, T-bet<sup>+</sup>-, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>-клітин), метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (оцінка відносного рівня мРНК генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз (розрахунок абсолютної і відносної щільності розподілу різних імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах БЛВ, 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 БЛВ у нащадків щурів з ЕГД.

Дослідження показало зміни експресії регуляторів рециркуляції і «хоумінгу» лімфоцитів, дало можливість виявити порушення формування

периферичної імунологічної толерантності та активацію патерн-розпізнавальних рецепторів (ППР) вродженої імунної системи на лімфоцитах БЛВ.

В роботі підтверджено наукові факти щодо впливу хронічної пренатальної гіперглікемії у постнатальному періоді на розподіл ефекторних Т-клітин в БЛВ із посиленням прозапальної сигналізації на тлі зменшення рівня мРНК *Foxp3*.

Виявлено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігаються порушення імунотолерантності, які формуються через репресію гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*, та зниження кількості Т-регуляторних клітин. Підтверджено позитивний ефект перорального введення інсуліну в перші 2 тижні життя нащадків, що нівелює ці зміни та викликає транскрипційну активацію генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il10*.

Встановлено, що через пренатальну гіперглікемію у нащадків відбувається значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *S1pr1*, тоді як індукція оральної толерантності до інсуліну його багаторазовим введенням із першої доби життя, супроводжується вже на першому місяці від народження зниженням мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *S1pr1* в клітинах БЛВ, тобто її формуванням *de novo*.

Експериментально підтверджено, що гіперглікемія під час ембріогенезу призведе до зростання щільності популяції  $NLRP3^+$ -лімфоцитів та індукуює транскрипцію гена *Nlrp3* в БЛВ, тоді як введення глібенкламиду під час вагітності самкам пригнічує його транскрипцію у нащадків та знижує кількість  $NLRP3^+$ -лімфоцитів лише у віці 1 місяця, тоді як у 6-місячних їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає.

Доведений вплив ЕГД на активацію компонентів вродженої імунної системи і зростання кількості  $TLR2^+$ -,  $TLR4^+$ -,  $NOD2^+$ - і  $RIG-I^+$ -лімфоцитів та щільності ППР на імунних клітинах у БЛВ нащадків. Найбільш яскраві зміни притаманні 1 місяцю їх життя. Введення глібенкламиду вагітним самкам знижує у БЛВ 1-місячних нащадків кількість  $TLR4^+$ - та  $RIG-I^+$ -лімфоцитів, а у 6-місячних лише  $TLR2^+$ -клітини.

Комплексне дослідження показало, що пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості  $T-bet^+$ - і  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів в БЛВ у нащадків,

сприяє зменшенню кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та зміні щільності ПРР на імунних клітинах. Індукція оральної толерантності до інсуліну у нащадків зменшує чисельність T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-клітин. На відміну, введення глібенкламиду вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, але сприяє зниженню кількості RORγt<sup>+</sup>-клітин у БЛВ 1-місячних і 6-місячних нащадків та збільшенню чисельності Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Проведені дослідження становлять практичний інтерес для сучасної діабетології, ендокринології, імунології і доводять, що порушення функціонування клітин БЛВ грають важливу роль в імунопатогенетичних механізмах розвитку цукрового діабету і можуть бути одними з факторів, що підтримує розвиток і прогресування патологічного процесу. Експериментально обґрунтована доцільність пероральних введень інсуліну для корекції імунних порушень, що виникають у нащадків, народжених від матерів з гестаційним діабетом.

Дисертант, спільно зі співавторами, брала 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; пат. на корисну модель Україна, МПК G01N 21/00, №72775).

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, були впроваджені в навчальний процес кафедр патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету, на кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології ім. Підвисоцького Одеського національного медичного університету, на кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії, кафедрі функціональної і лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського та на кафедрі патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

**Особистий внесок здобувача.** Автор самостійно провела 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 технічну компетентність № 033/18 від 26 грудня 2018р.).

**Апробація результатів дисертації.** Апробація дисертаційної роботи відбулася 30 червня 2020 р. на спільному засіданні кафедр анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; патологічної фізіології; нормальної фізіології; гістології, цитології та ембріології; медбіології, паразитології та генетики; фармакології та медичної рецептури; мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету МОЗ України.

Результати досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, оприлюднені на конференції Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2016); 18th European Congress of Endocrinology (Munich, 2016); Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, 2016); 19th European Congress of Endocrinology (Lisbon, 2017).

**Публікації.** Результати дисертаційного дослідження висвітлено у 13 наукових працях, серед яких 4 статті у фахових виданнях України, 2 статті у закордонних періодичних виданнях, 2 статті, які індексуються міжнародними наукометричними базами, 4 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 дослідження, висновків, списку використаних джерел (202 найменування, у тому числі 14 – кирилицею та 188 – латиницею) та додатків. Дисертація викладена на 192 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 36 таблицями та 46 рисунками.

**РОЗДІЛ 1**  
**РОЛЬ БРИЖОВИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ У РОЗВИТКУ І**  
**ПРОГРЕСІЇ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ**  
**(огляд літератури)**

**1.1 Гестаційний цукровий діабет і його наслідки для нащадків**

Гестаційний цукровий діабет (ГД) – це порушення толерантності до глюкози різного ступеня тяжкості, що виявляється у 2–6 % всіх вагітностей за Європейськими даними і дещо відрізняється в різних регіонах [40]. Таким чином, ГД є одним з найпоширеніших порушень вагітності. Відсутність лікування збільшує ризик ускладнень, таких як прееклампсія і передчасні пологи. ГД також призводить до макросомії плоду, що викликає проблеми під час пологів як для матері, так і для дитини, включаючи розриви під час пологів, необхідність кесарева розтину і проблеми протягом неонатального періоду [41]. Частині цих ускладнень можна запобігти шляхом правильного лікування під час вагітності [42–43]. У більшості жінок з ГД толерантність до глюкози нормалізується незабаром після пологів [44]. Але ГД може мати довготривалі наслідки для здоров'я як для матері, так і для дитини.

ГД не тільки посилює експресію генів імунної відповіді у вагітних [45], але й призводить до порушень функціонування вроджених і адаптивних компонентів імунної системи у нащадків. Так, Лі та ін. показали, що при гестаційному цукровому діабеті у нащадків збільшилась продукція ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-10 клітинами селезінки. Вплив гестаційного цукрового діабету на продукцію ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-10 був незалежним від постнатальної дієти [46].

Lapolla та ін. досліджували потенційні імунологічні маркери для прогнозування діабету 1 типу у пацієнтів з гестаційним цукровим діабетом (ГД) і імунологічні порушення у новонароджених. Оцінювали загальний об'єм лімфоцитів, субпопуляцій Т-лімфоцитів CD3 і CD8, що експресують Т-клітинні рецептори (TCR) альфа/бета або гамма/дельта, CD16 і CD19, панкреатичні аутоантитіла і цитокіни (ІЛ-5, ІЛ-2, розчинний рецептор ІЛ-2). Було виявлено що

матері з ГД мали більш високі рівні загального числа лімфоцитів, CD8-клітин, що експресують TCR гамма/дельта, і більш низькі рівні CD3, що експресують TCR альфа/бета у порівнянні з контрольною групою. Матері з ГД, які отримували інсулін, мали більш низькі рівні CD4 і CD4/CD8 співвідношення, а рівні CD8 і IL-5 були вище, ніж у матерів з ГД, які отримували спеціальну дієту або в групі контролю. Не було ніяких істотних відмінностей в концентрації TNF- $\alpha$  пуповинної крові обох груп [47].

Таким чином у нащадків, що народилися від матерів з гестаційним діабетом найбільшу увагу треба приділяти маркерам, що сигналізують про аутоімунні порушення, специфічні для стану, що передуює початку цукрового діабету.

ГД – порушення вуглеводного обміну, що вперше виявляється або виникає під час вагітності та призводить до гіперглікемії різного ступеня вираженості [48]. ГД є основною причиною розвитку макросомії плоду (частота пологів крупним плодом коливається в межах 8–18,5 %) і одним з чинників ризику розвитку надалі у потомства як інсулін-залежного, так і інсулін-незалежного цукрового діабету [49]. Вагітність у нормі викликає зміни імунного статусу у напрямку імуносупресії. Дослідження кількості активованих Т-лімфоцитів у жінок з гестаційним діабетом та здорових вагітних дає привід припустити, що природна материнська імуносупресія є менш ефективною у жінок з ГД [50]. Так, у них відбувається зростання маркерів активації Т-лімфоцитів, а також самих Т-клітин та дефіцит CTLA-4 [6].

До таких маркерів можна віднести підвищений рівень TLR-рецепторів та зростання їх експресії – основний показник запальної реакції. У хворих на цукровий діабет типу 1 ці показники достовірно підвищені. [51]. Крім того, активація TLR-рецепторів призводить до порушення фосфорилування субстрату інсулінового рецептора IRS1 (insuline receptor substrate – 1), що створює умови для виникнення інсулінорезистентності, та розвитку ЦД2 типу. TLR4 є членом сім'ї TLR, і його активація здатна викликати запальні реакції, що



відображає зв'язок між вродженими та адаптивними імунними системами. У досліджах Хіе та ін. доведена роль TLR4 у пацієнтів з гестаційним цукровим діабетом (ГД). Рівні експресії TLR4 у моноцитах материнської периферичної крові та рівні TNF- $\alpha$  у сироватці були підвищені у жінок з ГД у порівнянні з здоровими вагітними жінками. Ці результати вказують на те, що TLR4-опосередковане вивільнення запальних цитокінів може бути одним із факторів, що приводить до підвищення рівня глюкози у пацієнтів з ГД. Крім того, можна стверджувати, TLR4 є однією з ланок патогенезу ГД [52]. Це підтверджується Kuzmicki та ін. В останньому дослідженні також вказано на роль підвищення TLR2, як показника ранніх метаболічних порушень в розвитку ГД [53].

Про роль TLR-рецепторів йдеться в роботі Yanaï та ін. Дані їх дослідження вказують на те, що ГД інтенсивну індукує запалення у новонароджених через TLR5- або TLR1/2-опосередкований шлях активації імунної відповіді [54].

Різні звіти вказують на те, що материнський імунітет змінюється під час вагітності [4]. Менше відомо про те, як внутрішньоутробний вплив ГД змінює імунне мікросередовище нащадків. Раніше була створена модель ГД щурів та встановлено, що нащадки самок з ГД демонструють підвищений рівень циркулюючої глюкози, інсуліну та вільних жирних кислот, а також системну резистентність до інсуліну у порівнянні з нащадками контрольних самок. Дослідження тваринних моделей дали підтвердження ролі активації TLR при ожирінні та інсулінорезистентності. Наприклад, у TLR2-нокаутних мишей при годуванні високожирною дієтою спостерігалось менша вираженість ожиріння, печінкового стеатозу та макрофагальної інфільтрації а також знижена експресія гена прозапального цитокіну, який пов'язаний з підвищенням чутливості до інсуліну [55]. Дієт-індуковане ожиріння збільшувало експресію та активність TLR4 у мишей, позаяк нокаутні за цим геном миші були захищені від дієт-індукованої інсулінорезистентності, що пов'язується зі зменшенням запалення в тканинах [56]. Пальмітат, що додавали до культури клітин, збільшував рівень TLR4 в 8 разів, а також активував їх, що призводило до продукції прозапальних

цитокінів. У багатьох випадках програмування в ранньому житті не викликає чітко визначеного патологічного фенотипу, але коли з віком нащадки піддаються впливу нових чинників, таких як нездорова дієта, патологічні фенотипи стають очевидними. Відповідно до цього було запропоновано концепцію «другого удару», згідно з якою впливи у ранньому віці індукують підвищену реактивність на вторинний несприятливий вплив середовища через зміну їхніх біологічних реакцій при дії «другого удару». Тому результати Li та ін. узгоджуються з цією концепцією та демонструють, що ГД сам по собі не викликає підвищеного продукування цитокінів клітинами селезінки, а скоріше, комбінація пренатального впливу ГД та "другого удару", викликаного активацією рецепторів TLR2/4, необхідні для ініціювання підвищеної імунної відповіді клітин селезінки [46].

## **1.2 Брижові лімфатичні вузли як центр формування оральної толерантності до антигенів і рециркуляції лімфоцитів в кишковоасоційованій лімфоїдній тканині**

Можливим механізмом участі БЛВ у розвитку імунних порушень у нащадків є порушення диференціювання таких субпопуляцій Т-клітин, як натуральні CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Т-регуляторні клітини (Treg), Th17- і Th1-клітини. Багато досліджень свідчать про важливу роль популяції Treg у забезпеченні імунологічної ауто толерантності і негативному контролі як патологічних, так і фізіологічних імунних реакцій [57–58]. При елімінації або інактивації цих клітин спостерігається розвиток важких автоімунних захворювань, а також посилюється імунна відповідь на алоантигени [59–60]. Дефект супресорних функцій Treg клітин був виявлений і у пацієнтів з ЦД 1 типу, що проявлялося зниженням продукції IL – 10 і зміною вмісту внутрішньоклітинного CTLA4 [61]. Можливо, що даний дефект викликаний зміною рівня експресії транскрипційного фактору Foxp3 і спричиняє наступні зміни кількості адаптивних (індуцибельних) Treg-клітин, супресорна активність яких

обумовлена продукованими ними цитокінами IL-10 і TGF- $\beta$  [62]. Важливу роль у механізмах формування дисбалансу Т-хелперів може відіграти рівень експресії в клітинах БЛВ транскрипційного фактору ROR $\gamma$ t (retinoid – related orphan receptor), що є регулятором диференціювання з незрілих лімфоцитів найбільш агресивної й продіабетогенної субпопуляції – Th17-клітин які в останні роки розглядають у якості важливого посередника розвитку багатьох автоімунних захворювань [63]. Головною особливістю цієї субпопуляції клітин є здатність продукувати значну кількість прозапальних цитокінів, високі рівні яких, зокрема IL-17, були знайдені у людей з автоімунними захворюваннями, а також у відповідних моделях експериментальних тварин [64–65]. Так, блокада функцій Th17-клітин за допомогою анти-IL-17 антитіл перешкоджає прогресії цукрового діабету у мишей лінії NOD [66]. Цікаво, що популяція Treg клітин має спільність генерації з Th17-клітинами: якщо в ролі індуктора диференціювання виступає тільки TGF $\beta$ , то диференціювання йде в напрямку Т-reg, а якщо разом з TGF $\beta$  діє й IL-6, то утворюються Th17-клітини [67]. Відомо, що ГД призводить до зміни субпопуляційного складу лімфоцитів в крові, проте даних про зміни рівня Treg в органах імунної системи у потомства практично немає. Так, у новонароджених від матерів з ГД в пуповинній крові був вище рівень CD8-лімфоцитів з Т-клітинним рецептором гамма / дельта і нижче CD16-клітин, ніж у дітей групи контролю. Характерно, що кількісний рівень Treg в крові, а також прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і ФНО був підвищений, проте супресорна активність регуляторних клітин – знижена [47].

Під час диференціювання лімфоцитів створюється практично необмежений репертуар рецепторів В- і Т-клітин для розпізнавання всіх видів різних антигенів. В результаті цього розвивається велика кількість лімфоцитів які здатні реагувати на власні антигени організму, а також нешкідливі для організму антигени, такі як їжа і коменсальні бактерії. Патологічні імунні відповіді проти власних антигенів зазвичай запобігаються процесом негативного відбору або центральною толерантністю, при якій Т і В-клітини що розвиваються

в тимусі і кістковому мозку будуть елімінуватися. Додатково, деякі Т-клітини розпізнають власні антигени з високою афінністю які експресують фактор транскрипції Foxp3 і стають природними регуляторними Т-клітинами (nTregs). Центральна толерантність Т-клітин і диференціювання nTreg вимагають взаємодії Т-клітинного рецептора з його спорідненим антигеном в тимусі. Отже, обидва ці механізми непридатні для запобігання імунним відповідям проти антигенів, які надходять з кишківника і які не присутні або не виражені в місці диференціювання лімфоцитів. Таким чином, додаткові механізми периферичної толерантності необхідні для забезпечення толерантності до таких антигенів, як продукти харчування і комменсальні мікрорганізми [68].

У присутності TGF- $\beta$  і IL-6 наївні CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup>-Т-клітини можуть бути диференційовані в IL-17-продукуючі CD4<sup>+</sup> Т (Th17) клітини які сприяють запаленню. Іншим підтипом периферично індукованих Tregs є регуляторні Т клітини типу 1 (Tr1). Клітини Tr1 є CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцитами пам'яті, які експресують поверхневі маркери CD49b і LAG-3, але є Foxp3 негативними. Після активації клітини Tr1 секретують великі кількості IL-10 і TGF- $\beta$ , змінні рівні IFN- $\gamma$ , IL-5 і GM-CSF, а також IL-17. Tr1-клітинні супресивні властивості пов'язані з вивільненням IL-10 і TGF- $\beta$  при активації TCR спорідненим антигеном [30].

Брижові лімфатичні вузли (БЛВ) – це основне місце для індукції оральної толерантності серед інших лімфоїдних тканин. Презентація харчових антигенів відбувається саме в БЛВ, а не пєєрових бляшках (ПБ) та дрібних лімфоїдних структурах кишкової стінки. Гіпотеза, що кишкові імунні реакції залежать виключно від поглинання антигену М-клітинами в пєєрових бляшках (ПБ) епітелію, була оскаржена останні спостереженнями, які спостерігали індукцію оральної толерантності в кишківнику з видаленими ПБ. Оральна толерантність не може бути індукована у мишей, позбавлених БЛВ (і периферичних лімфатичних вузлів), але це не впливає на тварин, в яких було видалено пєєрові бляшки. Крім того, було показано, що дендритні клітини (ДК) стабільно мігрували з кишкового епітелію і ПБ в БЛВ, так що є чіткий механізм, згідно з

яким антиген з поверхні епітелію шлунково-кишкового тракту доставляється в БЛВ, де відбувається Т-клітинне становлення імунної толерантності [31].

Взаємодія антиген-презентуючих клітин і наївних Т-клітин, як вважають, може індукувати як толерантність, так і імунну відповідь. Після першої зустрічі з антигеном починається активація і клональна експансія антиген-специфічних Т-клітин. Незабаром після цього, активовані Т-клітини, будуть продовжувати створювати захисну імунну відповідь, тоді як Т-клітини активовані толерогенними субстанціями не отримують класичні ефекторні функції. Той факт, що активовані антиген-специфічні Т-клітини можуть бути знайдені по всій імунній системі тварин, які отримували антигени з їжею, поряд з іншими спостереженнями, привели до припущення, що індукція толерантності спрацьовує одночасно у всіх лімфоїдних органах. Як варіант, проліферируючі Т-клітини, присутні в периферичних лімфоїдних тканинах могли праймуватися в кишкової імунній системі, а потім мігрувати для поширення в периферичних лімфоїдних тканинах.

Дослідження Worbs та ін. добре демонструє, що у мишей БЛВ є обов'язковими і єдиними місцями індукції оральної толерантності. Через 2 дні після подачі антигена в БЛВ, але не раніше четвертого дня в периферичних лімфатичних вузлах спостерігалася проліферація TCR трансгенних Т-лімфоцитів, переданих наївним мишам. Використання препаратів FTY720 або хірургічне видалення БЛВ блокувало вихід Т-клітин з БЛВ. Вони показали, що не тільки антигенспецифічні Т-клітини в системних лімфатичних вузлах були нащадками клітин, що походять з БЛВ, а також те, що оральна толерантність в системній імунній відповіді залежить від Т-клітин, що мігрували із БЛВ [69].

Автори використовували дві експериментальні системи, для демонстрації того, що антигеннавантажені ДК, мігруючі з кишкової стінки до БЛВ можуть викликати толерантність БЛВ-резидентних Т-клітин. Перша модель: тварина з трансплантованим кишківником, в якому кровеносні судини анастомозовані з господарем, а лімфатична система відділена. Пероральне введення білка

стимулювало Т-клітини тільки в господаря, а в трансплантованих БЛВ, які необхідно було стимулювати, цього не спостерігалось. Друга: миші, дефіцитні по хемокіновим рецепторам CCR7, з порушенням міграції ДК в БЛВ. У цієї групи були відсутні, як Т-клітинна стимуляція, так і функціональна оральна толерантність. Ці експерименти дозволили їм зробити висновок, що оральна толерантність генерується виключно в БЛВ з антигенами, які транспортуються ДК з поверхні кишківника через аферентні лімфатичні судини.

Хоча автори не бачать ніяких доказів прямої периферичної індукції толерантності, вони показують, що внутрішньовенне введення білків в дозі в 100 разів нижче, ніж дається при індукції оральної толерантності призводить до еквівалентної проліферації в периферичних лімфатичних вузлах і БЛВ. Доза антигену, що досягає системного кровотоку в більшості експериментів по індукції оральної толерантності безпосередньо виміряти неможливо, але можна припустити, що в деяких експериментальних моделях антиген досягає кровотоку (наприклад, при ентеропатії низького ступеня, що супроводжується певним мікробним статусом) з огляду на ранню системну Т-клітинну проліферацію, яка спостерігалася в деяких дослідженнях. Індукція оральної толерантності вочевидь БЛВ-залежна у дуже чистих мишей; але кишковий епітеліальний бар'єр залишається тонким і вразливим, тому печінкова або системна толерізація може спостерігатися, коли антиген йде в кровотік.

Унікальна здатність кишкової імунної системи, формування толерантності до перорально вводиться антигенів відкриває привабливі стратегії для профілактики або лікування аутоімунних захворювань. Такі підходи могли б ефективно використовувати виборчі природні імуносупресивні механізми, тим самим уникаючи небажаних побічних ефектів, викликаних виснажливим і тривалим лікуванням імуномодулюючими препаратами.

Інсулін був першим аутоантигеном  $\beta$ -клітин описаним у пацієнтів з ЦДІ [70]. Біологічно активна форма інсуліну утворюється від свого попередника, препроінсуліну (PPIs), шляхом послідовних ферментативних реакцій, в ході

яких відщеплюється початковий пептид (при цьому утворюється проінсулін; PIns) а потім С-пептид. Роль інсуліну в якості аутоантигену при ЦД1 у людини і NOD мишей було всебічно проаналізовано [71]. У людини у якої нещодавно дебютував цукровий діабет, присутні аутоантитіла, специфічні і для інсуліну і для проінсуліну [72], а також є СД1-асоційовані Т-клітини націлені на множинні епітопи інсуліну і його попередників [73]. У NOD-мишей, наявність аутоантитіл до інсуліну у віці 8 тижнів пов'язують з високим ризиком раннього початку ЦД1 [74], у переддіабетичного NOD мишей були зареєстровані численні внутрішньоостровкові інсулін-специфічні CD4<sup>+</sup> Т-клітинні реакції [75–76]. Є істотні докази, що вказують на інсулін в якості ініціюючого аутоантигена при СД1 [77].

Для попередження розвитку цукрового діабету були апробовані різні методи. Введення інсуліну оральним [78–79], парентеральним [80], назальним [81–82] і внутрішньовенним [83] шляхом показало різну ефективність в запобіганні ЦД1 у NOD-мишей.

В одному з досліджень, родичі першого чи другого ступеня споріднення з 26 %–50 % прогнозованим ризиком розвитку ЦД1 в 5-річний термін (що визначався метаболічними, імунологічними і генетичними аналізами) отримували інсулін перорально (7,5 мг / добу), або плацебо. Середній період спостереження склав 4,3 роки. В цілому, метод не запобіг і не відстрочив початок ЦД1 [84]. Проте, аналіз підгруп показав, що оральне введення інсуліну зробило сприятливий вплив на пацієнтів з високим рівнем аутоантитіл до інсуліну. На підставі цих результатів, TrialNet провели Клінічне дослідження щодо попередження розвитку ЦД1 (Oral Insulin Prevention Trial). Були набрані особи з характеристиками аналогічними зазначеним вище – родичів з нормальною толерантністю до глюкози, але що мають як мінімум, два види діабетичних аутоантитіл в сироватці крові, одні з яких до інсуліну, і мають 35 % ризик розвитку ЦД1 протягом 5 років [85]. У імунотерапевтичних дослідженнях ЦД1 (IMDIAB) хворим з нещодавнім початком цукрового діабету (протягом 4 тижнів

після постановки діагнозу) інсулін (5 мг / добу) давався перорально в поєднанні з інтенсивною підшкірною інсулінотерапією протягом 12 місяців. Отримані результати свідчать про те, що оральному інсуліну не вдалося зберегти рівень С-пептиду і зменшити потребу в інсуліні за підсумками 12 місяців спостереження [86]. Крім того, є свідчення прискореної втрати  $\beta$ -клітин у пацієнтів молодше 15 років. У T1D Insuline Orale study, пероральне введення інсуліну щодня (2,5 мг або 7,5 мг / г) теж не увінчалось успіхом – не вдалося призупинити розвиток нещодавно дебютувавшего ЦД1 [87]. Нарешті, недавні клінічних випробування з 12 хворими з недавнім початком діабету (в межах 3 місяців після постановки діагнозу), яким одноразово внутрішньом'язово вводили В-ланцюг/ІФА інсуліну, показали, що цей метод викликає стійкі антитіла і Т-клітинну відповідь проти інсуліну не викликаючи побічних ефектів [88]. Проте, ніяких істотних відмінностей в рівні С-пептиду між двома групами не було виявлено. Очевидно, якщо методи, які перевіряються на людях не випробувані раніше на гризунах на подібних стадіях розвитку хвороби, і механізми дії не вивчені повністю, успіх подібних імунотерапевтичних підходів в клінічних випробуваннях малоймовірний.

Відомо, що БЛВ є не лише головним місцем індукції периферичної імунологічної толерантності до різноманітних антигенів, в тому числі і панкреатичних [29], а й також основним “перехідним” пунктом для пула рециркулюючих лімфоцитів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ). Головними регуляторами “хоумінга” лімфоцитів в БЛВ є адресин MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1) – молекула адгезії венул з високим ендотелієм лімфоїдних утворень КАЛТ, хемокінові рецептори CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) і CCR7 (C-C chemokine receptor type 7), лігандами для яких відповідно є CXCL12 та CCL19 і CCL21. Хемокін-хемокін рецепторна взаємодія між парами CCL19/21-CCR7 та CXCL12-CXCR4, а також MAdCAM-1 та його лігандом інтегрином  $\alpha 4\beta 7$  регулюють потрапляння в ЛВ більшості імунних клітин [33]. В свою чергу, вихід лімфоцитів з БЛВ контролюється



групою сфінгозин-1-фосфатних (S1P) рецепторів (S1PR1–S1PR5) [34], серед них лімфоцити найбільш активно експресують 1 тип – S1PR1 [35].

### **1.3 Глібенкламід як фактор корекції імунних порушень при гестаційному діабеті**

Для корекції гіперглікемії у вагітних в Україні та світі використовують інсулін (Про затвердження клінічних протоколів з акушерської та гінекологічної допомоги), хоча вже є достатня кількість досліджень про успішні використання похідних сульфонілсечовини для контролю гестаційного діабету, зокрема глібенкламід. Він є найбільш широко використовуваним препаратом сульфонілсечовини для лікування цукрового діабету 2 типу в Сполучених штатах Америки [89] і тому був першим пероральним препаратом протестованим та використаним для контролю гестаційного діабету (ГД) [90].

У статті Langer та ін. доведена його ефективність шляхом порівняння контролю ГД з використанням глібенкламідом та стандартної схеми, що включає інсулін. Глібенкламід був рівним до інсуліну в досягненні глікемічного контролю, оцінюючи індивідуальні значення глюкози протягом 1 тижня лікування, і середньої концентрації глюкози в цей час. Важливі неонатальні наслідки були аналогічними між лікованими інсуліном та глібенкламідом жінками, включаючи макросомію > 4000 г, гіпоглікемію, необхідність інтенсивної терапії новонароджених та виявлені аномалії розвитку плода. Концентрації інсуліну в пуповинній крові були приблизно рівні, а глібенкламід не було виявлено в сироватці пуповинної крові дітей з цієї групи [91].

Для порівняння в іншому дослідженні було взято одразу два пероральні цукрознижуючі препарати: метформін та глібенкламід, що також показали хороші результати. Частина жінок повністю нормалізували рівень глюкози крові. Додаткової терапії інсуліном потребували 46 % жінок, що приймали метформін та до 21 % жінок на глібенкламіді [92]. Ефективність прийому препаратів підтверджена також Nicholson та ін. Жінки, яким не вдалося коригувати глікемію глібенкламідом були старші, більш імовірно, мали другу та більше вагітність,

ймовірно, їм було поставлено діагноз в <25 тижнів, а також вони мали більш високі значення рівні глюкози натще. Такі жінки можуть насправді представляють собою групу з невиявленим ЦД2, і ці характеристики можуть краще виявляти жінок, які не є кандидатами для первинної терапії пероральними цукрознижуючими препаратами. В цілому, однак, адекватний глікемічний контроль може бути досягнутий з глібенкламідом у багатьох жінок з ГД і знижує кількість гіперглікемія-асоційованих наслідків [93].

У дослідженні, проведеному з використанням безперервного моніторингу глюкози, жінки, що використовували інсулін, переносили 4.1 асимптоматичних гіпоглікемічних епізоди, в той час як у тих, хто приймав глібенкламід, таких епізодів було 2.1; епізоди пов'язані з інсуліном були частіше досить гострими < 40мг/дл (2,2 ммоль/л). Однак, епізоди гіпоглікемії в групі з глібенкламідом були порівну і вдень, і вночі, на відміну від переважно нічних випадків з інсуліном, і це має бути важливою частиною консультування пацієнтів, в тому числі знання ознак і певних стратегій для уникання гіпоглікемії [94]. Інші побічні ефекти є більш поширеними, але в цілому керованими, в тому числі шлунково-кишкові симптоми, включаючи легку нудоту, печію, або відчуття ситості, дерматологічні ефекти, включаючи м'який свербіж або висип на шкірі, а також підвищеній функції печінки тестів, які вкрай рідко пов'язані з жовтяницею.

У глібенкламіду є особливість, що робить його досить перспективним в якості експериментального препарату, що знижує імунну відповідь до інсуліну у нащадків, народжених від жінок, що страждають на гестаційний діабет. Він в цілому добре переноситься хворими, завдяки йому досягається адекватний глікемічний контроль, хоч він і проходить через плаценту, але жодного зв'язку з вродженими аномаліями не було знайдено [95–97].

Препарат працює шляхом пригнічення АТФ-чутливих  $K^+$  (КАТР) каналів в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози [98]. КАТР канали це октамірні комплекси з чотирьох  $Kir6.x$  ( $Kir6.1$  or  $Kir6.2$ ) та чотирьох сульфонілсечовинних рецепторів (SUR; SUR1 or SUR2) [99]. SUR субодиниці належать до сімейства АТФ-зв'язуючих касетних (ABC) білків [100] та виступають як регуляторні

субодиниці, надаючи каналу Kir6.x чутливість до пригнічення сульфонілсечовиною, наприклад, такими препаратами як глібенкламід і гліпізид [98]. Разом із КАТР каналами, ABC переносник ABCA1 також був запропонований в якості передбачуваної мішені для глібенкламїду [101].

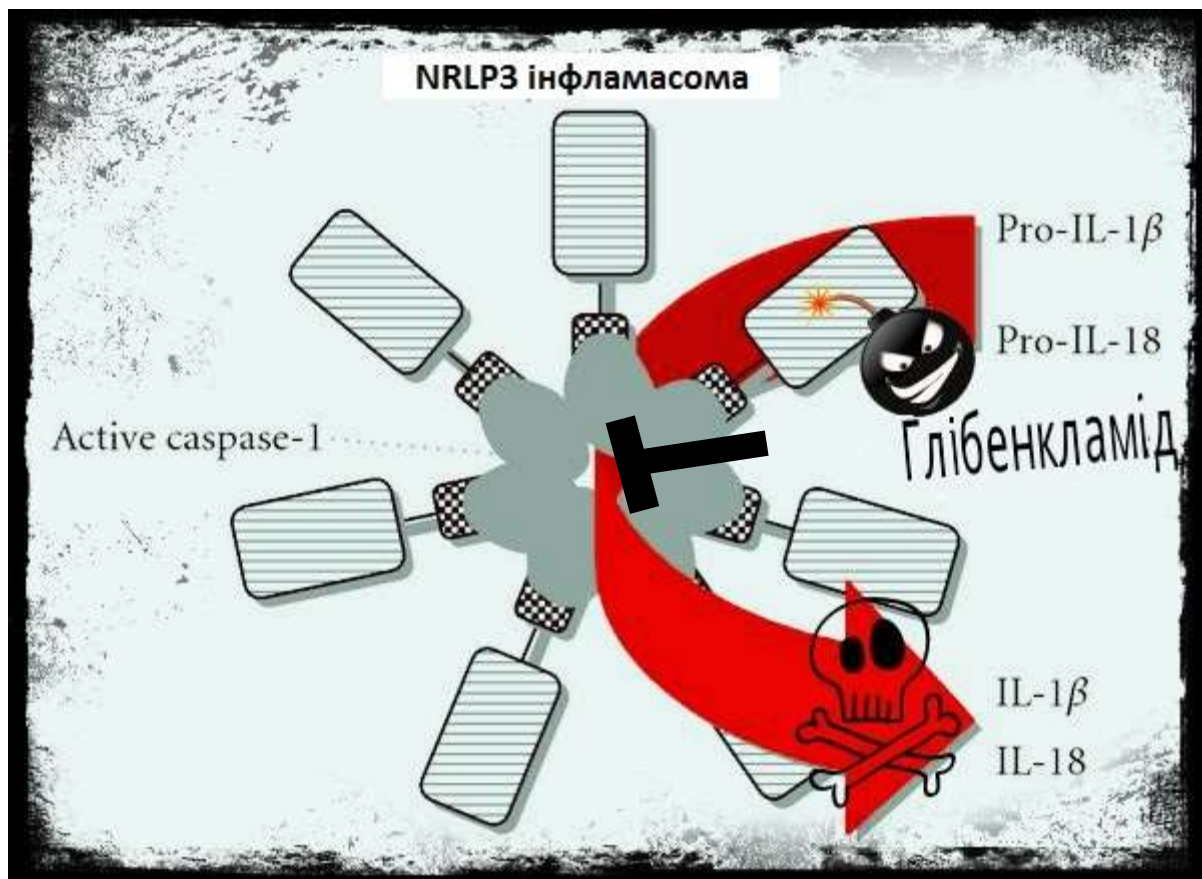


Рисунок 1.1 – Вплив глібенкламїду на активацію інфламасоми NLRP3

До додаткових ефектів можна віднести пригнічення активації інфламасоми NLRP3, що призводить до зниження рівня IL1 $\beta$  (рис. 1.1). Інфламасома, це один з видів патерн-розпізнаючих рецепторів, є кількох видів: в тому числі NLRP1, NLRP2, NLRP3, сенсорний білок, здатний розпізнавати дволанцюгову ДНК (dsDNA) відсутній при меланомі 2 (AIM2) та NLRC4 [102]. Найбільш добре описана NLRP3 інфламасома, названа так тому, що білок NLRP3 в комплексі належить до сімейства nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors (NLRs) і також відомий як “pyrin domain-containing protein 3” [103–104]. На додачу до NLRP3 білка, NLRP3 інфламасома також містить цитозольний

адаптерний білок (apoptosis-associated speck-like protein (ASC)) та прокаспаза-1 [105–106]. Взаємодії між цими трьома білками щільно регулюють функцію інфламасоми, щоб забезпечити імунну активність тільки тоді, коли це необхідно. Інфламасома традиційно розглядалася в якості одного з найбільш істотних компонентів вродженого імунітету, необхідного для виявлення та усунення патогенів. Останнім часом з'явилися докази прямої експресії NLRP3 лімфоцитами мишей і людини [107]. Так, нещодавно Arbore та ін. показали, що NLRP3 активно експресується в CD4<sup>+</sup> Т-клітинах людини, та ініціює активність каспаза-1-залежної секреції IL-1 $\beta$ , сприяючи виробленню гамма-інтерферону та диференціювання Т-хелперів 1 типу (Th1) аутокринним шляхом. Ненормальна активність NLRP3-інфламасоми в Т-клітинах впливає на розвиток запальних і аутоімунних захворювань у людей та в мишачих експериментальних моделях запалення та інфекції. Вочевидь, діяльність NLRP3-інфламасоми не обмежується "вродженими імунними клітинами", а є невід'ємною частиною нормальних адаптивних Th-відповідей. Порушення активності NLRP3 в CD4<sup>+</sup>-Т-клітинах при експериментальних моделях колітів призводить до неконтролюємої інфільтрації кишківнику Th17 клітинами та загостренню захворювання. Таким чином, аутокринна активність NLRP3-інфламасоми в лімфоцитах контролює Th1–Th17 баланс в умовах експериментальних запальних захворювання кишківника [108]. Крім того, Bruchard M. та ін. нещодавно показали здатність NLRP3 діяти в якості ключового фактора транскрипції, що керує Th2-диференціювання. В Th2-клітинах NLRP3 зв'язується з промотором IL4 і трансактивує його в сукупності з фактором транскрипції IRF4 [109]. На відміну від Th1, у яких NLRP3 за допомогою методів імунофлуоресцентної мікроскопії виявляється головним чином в цитоплазмі, в Th2-клітинах вона локалізована переважно в ядрі. Можливо, що така ядерна локалізація може сприяти транскрипційній функції інфламасоми. Ця робота показала, що NLRP3 слід розглядати не лише як ключовий компонент інфламасоми, але і як фактор транскрипції в клітинах CD4<sup>+</sup> Th2.

У той же час, NLRP3-інфламасоми є одним з сенсорів метаболічного стресу, що розвивається при діабеті [110]. NLRP3-дефіцитні NOD-миші захищені від розвитку ЦД шляхом зниження міграції діабетогенних лімфоцитів в панкреатичні островці, у них зменшена кількість CD4<sup>+</sup> Т-клітин, CD19<sup>+</sup> В-клітин та CD11b<sup>+</sup> АПК в селезінці і PLN, але не в тимусі [111].

Активна участь інфламасоми NLRP3 в широкому діапазоні захворювань робить її вельми бажаним об'єктом для фармацевтичного впливу. На щастя, були описані численні перспективні інгібітори активації інфламасоми NLRP3, деякі з яких коротко описані нижче разом з їх фармакологічними механізмами. Два інгібітора інфламасоми NLRP3 з малою молекулярною масою були описані в новаторських доповідях в *Nature Medicine* цього року [112–113]. Було виявлено, що MCC950, сполука, що містить діарілсульфанілсечовину, пригнічує каспаза-1-залежний процесинг of IL-1 $\beta$  [114], а також пригнічує обидва шляхи активації NLRP3 інфламасоми. Інші фактори також можуть активувати NLRP3 інфламасому. До них відносяться пошкодження мітохондрій або їх дисфункція спричинена перевантаженням мітохондрій Ca<sup>2+</sup> [115–116], лізосомальні порушення [117–119], аутофагічна дисфункція [120–122] та активність тіоредоксин-взаємодіючого білку [123–124].

У дослідженні Lamprigianou та ін. було доведено, що глібенкламід захищає мишачі клітини інсуліноми MIN6 від апоптозу і втрати Cx36, які індуковані прозапальними цитокінами; залежно від дози, захищає diabetes-prone NOD мишей від прогресування гіперглікемії, а також від втрати інсулінпродукуючих  $\beta$ -клітин і експресії Cx36; не зупиняє розвиток інсуліту, але індукує зсув фенотипу імунних клітин, що залишаються в панкреатичних лімовузлах до CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup> ефекторного профілю. Ці результати демонструють привабливу можливість того, що шляхом підвищення Cx36 сигналізації та модуляції імунної відповіді, глібенкламід може *in vivo* сприяти виживанню  $\beta$  клітин у діабетогенних умовах [125].

Таким чином, проведений ретельний аналіз даних наукової літератури вказує на доцільність більш глибокого вивчення ролі БЛВ в розвитку імунних

порушень у нащадків. Значний інтерес має спроба сформувати оральну толерантність до інсуліну як головного  $\beta$ -клітинного антигену. Залишається не з'ясованими вплив глібенкламіду на функціональний стан лімфоцитів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД. Загалом, невирішеність цих питань і зумовила актуальність даної роботи.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Експериментальні тварини

Дослідження були проведені на щурах лінії Wistar: 48 самках (вік 8–9 місяців) та 96 самцях, їх нащадках, віком 1 і 6 місяців. Щури, які приймали участь у експерименті, були отримані з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (м. Київ). Всі дослідження проводили в осінньо-зимовий період у віварії Запорізького державного медичного університету. Щури знаходилися у приміщенні з температурою повітря 20–25°C, світловому режимі день/ніч з вільним доступом до їжі і води. Всі тварини знаходилися на стандартному харчовому раціоні. Комісія з питань біоетики Запорізького державного медичного університету МОЗ України встановила, що дослідження проведені у відповідності з національними «Спільними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з директивою Ради 2010/63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року по захисту тварин, що використовують для наукових цілей (Council Directive 2010/63EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Експериментальні тварини в останній день досліджень декапітувалися під наркозом. Об'єктом дослідження у експериментальних тварин були брижові лімфатичні вузли, периферична кров.

#### 2.2 Групи експериментальних досліджень

Експериментальні тварини були поділені на 8 експериментальних груп по 20 щурів (табл. 2.1).

Група 1 – нащадки контрольних щурів Wistar віком 1 місяць; група 2 – нащадки контрольних щурів Wistar віком 6 місяців. Група 3 – одномісячні нащадки щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, яким на 15-у добу датованої вагітності одноразово в/очередно вводили стрептозотин в дозі 45 мг/кг; група 4 – шестимісячні нащадки щурів лінії

Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, яким на на 15-у добу датованої вагітності одноразово в/очередно вводили стрептозотоцин в дозі 45 мг/кг.

Таблиця 2.1 – Розподіл нащадків щурів в експериментальних серіях

Серії досліджень	Кількість тварин
1. Нащадки контрольних щурів Wistar – 1 місяць	12
2. Нащадки контрольних щурів Wistar – 6 місяців	12
3. Нащадки щурів Wistar з ЕГД – 1 місяць	12
4. Нащадки щурів Wistar з ЕГД – 6 місяців	12
5. Нащадки щурів Wistar з ЕГД + глібенкламід – 1 місяць	12
6. Нащадки щурів Wistar з ЕГД + глібенкламід – 6 місяців	12
7. Нащадки щурів Wistar з ЕГД + інсулін – 1 місяць	12
8. Нащадки щурів Wistar з ЕГД + інсулін – 6 місяців	12
Всього тварин	96

Група 5 – одномісячні нащадки щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, яким з 15-ї доби датованої вагітності поряд з одноразовим в/очередним введенням стрептозотоцину в дозі 45 мг/кг на протязі 7 діб перорально внутрішньошлунково вводили глібенкламід (Фармак, Україна) в дозі 5мг/кг; група 6 – шестимісячні нащадки щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, яким з 15-ї доби датованої вагітності поряд з одноразовим в/очередним введенням стрептозотоцину в дозі 45 мг/кг на протязі 7 діб перорально внутрішньошлунково вводили глібенкламід (Фармак, Україна) в дозі 5мг/кг; група 7 – одномісячні нащадки щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, яким перорально за допомогою піпетки протягом перших 14 днів життя вводили людський інсулін короткої дії (*ACTRAPID® HM, NOVO NORDISK, Данія*) в дозі 30 МО (1050 мкг=1,05мг, 1 МО відповідає 35 мкг безводного людського інсуліну); група 8 – шестимісячні нащадки щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, яким перорально за



допомогою піпетки протягом перших 14 днів життя вводили людський інсулін короткої дії (*ACTRAPID® HM, NOVO NORDISK, Данія*) в дозі 30 МО (1050 мкг=1,05мг, 1 МО відповідає 35 мкг безводного людського інсуліну).

## **2.3 Експериментальні моделі**

### **2.3.1 Моделювання експериментального гестаційного діабету.**

Для вивчення пренатального впливу хронічної гіперглікемії на плід було використано розроблену на кафедрі патологічної фізіології ЗДМУ під керівництвом проф. Колесника Ю.М. методику експериментального гестаційного діабету (ЕГД) у самок щурів лінії Вістар [129]. ЕГД моделювали одноразовим введенням стрептозотоцину в дозі 45 мг/кг ваги тварини на 14–15 добу датованої вагітності, що відповідає останньому триместру вагітності. Після індукції діабету самок випоюють в перший день 20 % розчином глюкози, на другий день – 10 % розчином глюкози для зниження ризику розвитку гострої гіпоглікемії, яка розвивається внаслідок значної одномоментної деструкції β-клітин і підвищення концентрації інсуліну в крові. На 3 добу після введення стрептозотоцину у всіх самок після 10-годинного голодування визначали рівень глюкози венозної крові з хвостової вени глюкозооксидазним методом.

Групі контрольних самиць внутрішньоочеревинно вводили 1 мл 0,1 М цитратного буферу рН 4,5. У контрольну групу відбиралися вагітні інтактні самиці з рівнем глюкози до 5,5 ммоль/л, а у групу з самиць з ЕГД – з глікемією більше 8 ммоль/л. Новорожденних щурят від самок з ЕГД відселяють через місяць після народження. Дослідження проведені на 1-місячних і 6-місячних самцях – нащадках щурів з ЕГД, яких виводили з експерименту шляхом одномоментної декапітації під тіопенталнатрієвим наркозом (40 мг/кг внутрішньоочеревинно). В експериментальних групах визначали концентрацію глюкози глюкозооксидазним методом, концентрацію інсуліну в плазмі крові визначали імуноферментним методом з використанням наборів фірми Peninsula Laboratories Inc. (США), проводили глюкозо-толерантний тест (ГТТ). Оцінку чутливості тканин до інсуліну проводили за рахунок визначення індексу НОМА.

Необхідно відзначити, що використана модель ЕГД має низку переваг перед іншими моделями гестаційного діабету. Зокрема, найбільш близьким технічно є спосіб, розроблений в НДІ ендокринології м.Харкова, який полягає в моделюванні гестаційного діабету у самок щурів лінії Вістар шляхом внутрішньочеревного введення субдіабетогеної дози стрептозотоцину (45 мг/кг ваги тварини) на другий день вагітності. Істотним недоліком даного способу є те, що введення стрептозотоцину здійснюється на другий день вагітності, що не відповідає термінам розвитку патологічного процесу при гестаційному діабеті. На другий день вагітності здійснюється закладка тканин і органів, тому введення стрептозотоцину в ці терміни може призвести до порушення даного процесу, в той час як гестаційний діабет у людини розвивається в останньому триместрі вагітності, коли закладка органів вже здійснилася, але відбувається формування контактів і зв'язків в нейро-імунно-ендокринної системи.

Не менш важливим аспектом в моделюванні гестаційного діабету є можливість виключення або зведення до мінімуму токсичної дії стрептозотоцину на плід. Стрептозоточин як низькомолекулярна речовина здатний частково проникати через плацентарний бар'єр. Однак,  $\beta$ -клітини панкреатичних острівців плода є надзвичайно резистентні до його дії, в порівнянні з  $\beta$ -клітинами матері. Крім того, літературні дані свідчать про те, що висока резистентність до стрептозотоцину відзначається не тільки у плодів, але навіть і у новонароджених щурят. Саме цим пояснюється той факт, що при моделюванні неонатальних стрептозоточин-індукованих моделей цукрового діабету (n-STZ) доводиться вводити новонародженим щурятами стрептозоточин в високих дозах (80–120 мг/кг) на 1-шу (n0-STZ модель), 2-гу (n2-STZ модель) або 5-ту добу (n5-STZ модель) життя [128].

### **2.3.2 Введення глібенкламід**

Для фармакологічної корекції використовувався глібенкламід (Фармак, Україна), який вводили вагітним самицям щурів лінії Wistar з

експериментальним гестаційним діабетом внутрішньошлунково (в/ш) в дозі 5 мг/кг на протязі 7 діб щоденно, починаючи з 1 дня індукції ЕГД.

Дози для введення визначали на підставі даних, детально описаних в літературі по дослідженню вищевказаного препарату у щурів [130–131]. Усі експерименти, як без вживання препаратів, так і експерименти із застосуванням препаратів були проведені в абсолютно однакових, стандартизованих умовах з використанням перерахованих методик.

Глібенкламід — синтетичний препарат з класу сульфонамідів II покоління. Його механізм дії полягає у вибіркового зв'язуванні з регуляторною субодиницею КАТФ-каналів  $\beta$ -клітин підшлункової залози, що стимулює секрецію інсуліну острівцевими клітинами підшлункової залози, поліпшує інсулінозалежний обмін глюкози периферичних тканин, а також пригнічує глюконеогенез у печінці. Глібенкламід відзначається дуже високою спорідненістю з рецепторами  $\beta$ -клітин підшлункової залози і має пряму залежність ефекту від дози препарату. Він працює як при підвищеному рівні глюкози в крові, так і при нормальному її рівні й при гіпоглікемії. Однак висока ефективність глібенкламіда досить часто спричинює виникнення гіпоглікемій при його застосуванні, особливо при помірній гіперглікемії, нерегулярних прийомах їжі, надмірному вживанню алкоголю та у хворих похилого віку. Для попередження виникнення гіпоглікемій препарат рекомендують приймати після їжі. Також була розроблена особлива мікронізована форма глібенкламіду, що має уповільнене наростання гіпоглікемічного ефекту для зниження ймовірності гіпоглікемії в пацієнтів [132].

Відомо, що активація адаптивної імунної відповіді, зокрема диференціювання субпопуляції Treg, неможлива без попередньої сигналізації з боку рецепторних компонентів вродженої, а саме цілої низки мембранних толл-подібних рецепторів (TLR), цитоплазматичних Nod- (NLR) та RIG-I-подібних рецепторів (RLR), які після активації індукують через фактори транскрипції сімейства NF- $\kappa$ B синтез і секрецію цитокінів і коstimуляторних молекул [133].

Крім того, важливою ланкою патогенезу ЕГД є активація одного з NOD-подібних рецепторів вродженого імунітету (PBI) – NLRP3-інфламасоми [38]. В групі препаратів-інгібіторів інфламасоми перспективним є глібенкламід, який дозволено для корекції гіперглікемії у вагітних [39].

## **2.4 Методи імуофлюоресцентного дослідження**

### **2.4.1 Дослідження експресії TLR2 і TLR4 рецепторів за допомогою реакції прямої імуофлюоресценції у брижових лімфатичних вузлах.**

Для дослідження toll-подібних рецепторів TLR2 і TLR4 у зразках тканин БЛВ використовували метод прямої імуофлюоресценції. Для цього аналізували серійні гістологічні зрізи, оцінюючи їх морфометричні, денситометричні параметри, і таким чином вивчали розподіл імунопозитивних клітин. Досліджували TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-клітини, розташовані в корковому плато і мозкових тяжках БЛВ

1. У тварин після декапітації вилучалися БЛВ і поміщалися в фіксатор Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після цього фіксатор відмивали в проточній холодній воді протягом 2 годин.

2. Проводження в етанолі з висхідною концентрацією:

- 50 %,
- 60 %,
- 70 %,
- 80 %,
- 90 %,
- 96 %,
- 100 %-1,
- 100 %-2,
- етанол 100 % + хлороформ 2:1,
- етанол 100 % + хлороформ 1:1,
- етанол 100 % + хлороформ 1:2,

- хлороформ,
- хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ( $t = + 37^{\circ}\text{C}$ ),
- рідкий парапласт ( $t = + 56^{\circ}\text{C}$ ) на 1 годину

3. Потім укладали в парапластові блоки. Для проведення подальших досліджень використовували ротаційний мікроском MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) Робили серійні зрізи БЛВ товщиною 5 мікрон.

4. Отримані зрізи спочатку депарафінували в ксилолі, потім проводили регідrataцію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивали у фосфатному буфері (0,1 М,  $\text{pH}=7,4$ ).

5. Потім проводили інкубацію з TLR2 або TLR4 моноклональними антитілами щурів (див. табл. 2.2), що кон'юговані з флюоресцентним ізотіоціанатом (FITC) протягом 18 годин у вологій камері з температурою  $+4^{\circ}\text{C}$ .

6. Після цього зрізи промивали тричі по 10 хвилин у фосфатному буфері (0,1 М,  $\text{pH}=7,4$ ) і наносили на зрізи суміш із гліцерину та фосфатного буферу у співвідношенні 1:9 для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

7. Зображення отримували на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) з використанням пакета програм AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації. Зображення оброблених гістологічних зрізів вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Визначалися області зі статистично значущою флюоресценцією.

Основні морфометричних характеристик клітин це площа, периметр, максимальний (Major) і мінімальний (Minor) еліптичні діаметри. Додатково визначали циркулярність (Circularity) та округлість (Roundness).

Циркулярність обчислювалась за допомогою формули:

$$\text{Circularity} = 4\pi * \text{Area} / \text{Perim}^2 \quad (2.1),$$

де Circularity – циркулярність, Area – площа, Perim – периметр

Округлість обчислювалась як відношення площі до максимального діаметра:

$$\text{Roundness} = 4 * \text{Area} / \pi * (\text{Major axis})^2 \quad (2.2),$$

де Roundness – округлість, Area – площа, Major axis – максимальний діаметр.

8. Щільність рецепторів була визначена за інтенсивністю флюоресценції імунопозитивних клітин і неспецифічної, фонові флюоресценції. Знаючи ці показники обчислювалась коректована клітинна флюоресценція, що вимірюється в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції  $UO_{1\phi}$ :

Коректована клітинна флюоресценція = інтегрована щільність – (площа виділених клітин \* середню флюоресценцію фона).

9. В результаті морфометричного аналізу визначили наступні підкласи імунопозитивних клітин: лімфобласти площею  $\text{Area} \geq 30,0 \text{ мкм}^2$ ; середні лімфоцити  $16,0 > \text{Area} \geq 11,0 \text{ мкм}^2$  та малі лімфоцити  $11,0 > \text{Area} \geq 5,0 \text{ мкм}^2$ .

І обчислили щільність розподілу імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах БЛВ: абсолютну (кількість клітин на  $1 \text{ мм}^2$  площі тканини) і відносну (відсоткову).

Таблиця 2.2 – Антитіла використані в імунофлюоресцентному дослідженні

Специфічність	Клон	Ізотип	Кон'югат	Виробник (номер за каталогом)
1	2	3	4	5
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

## Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4	5
RIG-I	H-300	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-98911
T-bet	H-210	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-21003
ROR $\gamma$ t	H-190	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-28559
Foxp3	150D/ E4	Mouse IgG <sub>1</sub> *	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-130666
Nlrp3	H-66	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-66846
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<sup>+</sup>, RIG-I<sup>+</sup>, Nlrp3<sup>+</sup>, T-bet<sup>+</sup>, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> і Foxp3<sup>+</sup> лімфоцитів за допомогою реакції непрямої імунофлюоресценції у брижових лімфатичних вузлах.

Для визначення NOD2, RIG-I, Nlrp3, T-bet, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у серійних зрізах БЛВ застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод. Досліджували структуру популяції імунопозитивних клітин розташованих у корковому плато і мозкових тяжках БЛВ і даних їх морфометричних і денситометричних параметрів. Початкові етапи цього дослідження аналогічні методу прямої імунофлюоресценції:

1. У тварин після декапітації вилучалися БЛВ і поміщалися в фіксатор Буена на 20 годин за кімнатної температури. Після цього фіксатор відмивали в проточній холодній воді протягом 2 годин.

2. Проводження в етанолі з висхідною концентрацією:

- 50 %,

- 60 %,
- 70 %,
- 80 %,
- 90 %,
- 96 %,
- 100 %-1,
- 100 %-2,
- етанол 100 % + хлороформ 2:1,
- етанол 100 % + хлороформ 1:1,
- етанол 100 % + хлороформ 1:2,
- хлороформ,
- хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ( $t = + 37^{\circ}\text{C}$ ),
- рідкий парапласт ( $t = + 56^{\circ}\text{C}$ ) на 1 годину

3. Потім укладали в парапластові блоки. Для проведення подальших досліджень використовували ротаційний мікротом MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) Робили серійні зрізи БЛВ товщиною 5 мікрон.

4. Отримані зрізи спочатку депарафінували в ксилолі, а потім проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %) та відмивали у фосфатному буфері (0,1 М, рН = 7,4).

5. Оброблення та інкубація з поліклональними антитілами до Foxp3, NOD2, RIG-I, Nlrp3, T-bet і ROR $\gamma$ t протягом 18 годин у вологій камері за температури + 4°C (див. табл. 2.2). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин у вологій камері при температурі +37°C з вторинними антитілами в розведенні 1:64. (антитіла до повної молекули IgG кролика або миші, кон'юговані з FITC).

6. Після цього зрізи тричі по 10 хвилин промивають у 0,1 М фосфатному буфері (рН=7,4) та наносять на зрізи суміш із гліцерину та фосфатного буферу у співвідношенні 1:9 для подальшої люмінесцентної мікроскопії.

7. Зображення отримували використовуючи мікроскоп PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за



допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) з пакетом програм AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації. Зображення оброблених гістологічних зрізів вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Визначалися області зі статистично значущою флюоресценцією за методикою, аналогічною описаній в пункті 2.4.1. Додатково для кращої візуалізації Nlrp3<sup>+</sup>-клітин в БЛВ також проводили імуногістохімічну реакцію з вторинними кролячими антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому (ImmunoCruz™ Staining system Santa Cruz Biotechnology, США)

## **2.5 Молекулярно-генетичні методи. Метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР).**

В якості об'єкта дослідження були БЛВ експериментальних тварин, залиті у парафін після стандартної гістологічної підготовки.

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

1. Зразки тканин, взяті з парафінового блоку гомогенізували за допомогою ступки з 1 мл 100 % ксилолу. Протягом 5 хв інкубували гомогенат у мікропробірці «Eppendorf» (Axugen, США), потім перемішування з використанням вортексу і центрифугували протягом 1 хв для осадження тканини. Ксилол обережно видаляли, не чіпаючи осад.

2. Повторно додавали 1 мл 100 % ксилолу і інкубували впродовж 5 хв. Потім перемішували за допомогою вортексу і нагрівали для розплавлення парафіну протягом 3 хв при температурі + 50°C. Для осадження тканини зразки центрифугували протягом 2 хв при кімнатній температурі на максимальній швидкості – 16000 об/хв. Ксилол обережно видаляли, не чіпаючи осад

3. До зразку додавали 1 мл 100 % етанолу, інкубували 5 хв і перемішували на вортексі. Для осадження центрифугували 2 хв при максимальній швидкості. Етанол обережно видаляли не порушуючи осаду.

4. Додавали 1 мл 96 % етанолу і проводили інкубацію впродовж 5 хв, перемішували на вортексі. Центрифугували зразок протягом 2 хв при максимальній швидкості для осадження тканини. Обережно видаляли надосадкову рідину, не чіпаючи осад.

5. Додавали 1 мл 70 % етанолу до зразку і проводили інкубацію впродовж 5 хв, перемішували за допомогою вортекса. Центрифугували протягом 2 хв на максимальній швидкості для осадження. Обережно видаляли рідину не порушуючи осаду. Осад висушували протягом 30 хв на повітрі для видалення залишку етанолу.

### **2.5.2 Виділення тотальної РНК.**

Тотальну РНК з тканини щурів виділяли з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («ИЗОГЕН», РФ) за наступним протоколом:

1. Зразки тканини по 100 мкл поміщали в пробірки об'ємом 1,5 мл, туди додавали 1 мл Trizol reagent та перемішували до утворення гомогенної емульсії. Інкубували при температурі + 4°C протягом 5 хв.

2. Додавали 200 мкл хлороформу та знову перемішували до гомогенності вмісту. Інкубували при температурі + 4°C протягом 5 хв.

3. Центрифугували пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об/хв. Після цього відбирали прозору верхню фазу з РНК та переносили в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл.

4. До пробірок додавали 600 мкл ізопропанолу.

5. Суміш інтенсивно перемішували та поміщали у пробірках до морозильної камери на 30 хв при температурі -20°C.

6. Центрифугували пробірки з сумішшю 15 хв при 14000 об/хв. Повністю видаляли надосадкову рідину шляхом перевертанням пробірки.

7. До вмісту додавали 1 мл холодного 75 % етилового спирту, перемішували вміст пробірок 4–5 разів перевертанням, центрифугували 5 хв при 14000 об/хв та знову обережно видаляли надосадову рідину перевертанням пробірки.

8. Осад просушували при температурі + 65°C протягом 3 хв.

9. До пробірок додавали 100 мкл реагенту ExtraGene E.

10. Вміст перемішували на вортексі впродовж 20 с та залишали при кімнатній температурі на 15–20 хв. Потім ще раз перемішували.

### **2.5.3 Зворотна транскрипція (виділення кДНК).**

Для етапу зворотної транскрипції використовували «Набор реагентів для проведення обратной транскрипции» («СИНТОЛ», РФ). Підготовку та проведення реакції проводили відповідно до протоколу набору:

1. В пробірці на льоду готували реакційну суміш: до 2 мкл тотальної РНК додавали 1 мкл Random-6 праймеру та 11 мкл деіонізованої води, очищеної від нуклеаз. Загальний об'єм – 14 мкл. Перемішували.

2. Наступним кроком до пробірки додавали 10 мкл реакційної суміші 2,5x та 1 мкл зворотної транскриптази MMLV-RT. Загальний об'єм – 25 мкл. Перемішували і центрифугували.

3. Інкубували суміш 45 хв при температурі + 45°C.

4. Реакцію зупиняли прогріванням 5 хв при температурі + 92°C. Після цього пробірки поміщали на лід.

### **2.5.4 Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.**

Останнім етапом молекулярно-генетичних досліджень була полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу. Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували набір Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) і ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США) за наступною схемою: початкова денатурація 95 °C – 10 хв; 50 циклів: денатурація – 95 °C – 15сек., віджиг праймерів – 62 °C

–30 сек., елонгація – 72 °С – 30 сек. Наприкінці стадії елонгації кожного циклу автоматично відбувалася реєстрація інтенсивності флуоресценції по каналу SybrGreen.

Реакційну суміш готували відповідно до протоколу набору:

1. В пробірку при кімнатній температурі поміщали: 12,5 мкл 2-кратного Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) та суміш прямого та зворотнього праймерів по 0,3 мкМ кожного.

2. Суміш перемішували і розподіляли у пробірки відповідних обсягів для ПЛР.

3. Додавали кДНК ( $\leq 500$  нг / реакція) та деіонізовану воду до об'єму 25 мкл.

4. Після обережного перемішування зразки поміщали в ампліфікатор.

За допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (НИН, США) для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані специфічні пари праймерів (табл. 2.3), що виготовлені фірмами Metabion (Німеччина) і ThermoScientific (США). В якості референс-гену був використаний ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH) для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів. Його обчислювали використовуючи порівняльний Ct метод ( $\Delta\Delta Ct$  метод). Розрахунки проводили за формулами:

$$\Delta Ct (\text{гена-мішені}) = Ct (\text{гена-мішені}) - Ct (\text{гена-калібратора} / ACT1);$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{гена-мішені}) - \Delta Ct (\text{базисного гена}).$$

Відносний рівень експресії виражали в  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Для статистичного аналізу даних ПЛР використовували програмне забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Для досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР були підібрані оптимальні умови. Усі реакції ампліфікації повторювали тричі.

Таблиця 2.3 – Специфічні праймери використані в ЗТ-ПЛР

Ген	Праймер	T <sub>m</sub> , °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>Aire</i>	F = GCCTAAAGCCAGTGATCCGA R = TCTCTACCCTGGGTTCCTTT	59.82 59.85	43	850/ 851
<i>Deaf1</i>	F = GCAGAGAGGAAGGAGCAGTC R = GTGCACTCACTCATGGCCT	59.82 60	59	1605/ 1606
<i>Foxp3</i>	F = CGAGACTTGGAAGTCAGCCAC R = TCTGAGGCAGGCTGGATAACG	60.94 61.91	61	214/ 215
<i>IL10</i>	F=AGTGGAGCAGGTGAAGAATGA R=GACACCTTTGTCTTGGAGCTTATTA	59.02 59.06	49	445/ 446
<i>Ctla4</i>	F = TACAGTTTCCTGGTCACCGC R = AGGACTTCTTTTCTTTAGCGTCCT	59.97 59.96	57	567/ 568
<i>Cxcr4</i>	F=TGCCATGGAAATATACACTTCGG R = TCCAGACCCTACTTCTTCGGA	58.87 59.64	52	81/82
<i>Ccr7</i>	F = CTGGTCATTTTCCAGGTGTGC R = TGGTGTTCCTCGCCGATGTAG	59.73 59.83	67	138/139
<i>Madcam1</i>	F = CCAAAGTGGTGCTGACACAT R = TCTGGCTCTGTAGGACTGGAA	58.68 59.92	51	662/663
<i>S1pr1</i>	F= CGGATCGCGCGGTGTAG R= GAAACAGCAGCCTCGCTCAA	60.73 61.23	70	61/62
<i>Nlrp3</i>	F = AGCTAAGAAGGACCAGCCAG R = CGTGCATGCATCATTCCTC	59 60	40	713/ 714
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R =GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/ 826

Примітка 1. F – прямий праймер;

Примітка 2. R – зворотний праймер;

Примітка 3. T<sub>пл</sub> – температура плавлення.

## 2.6 Методи статистичних досліджень

Для статистичної обробки даних експериментального дослідження використовували персональний комп'ютер з програмою «Statistica for Windows 6.0» (StatSoftInc., ліцензія №AXXR712D833214FAN5). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки ( $M$ ), її дисперсії і помилки середньої ( $m$ ). Для визначення достовірності при порівнянні даних використовували параметричний  $t$ -критерій Стьюдента, а також 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™ (Bio-Rad, США). Результати є у паперовій та електронній базах даних.

### РОЗДІЛ 3

## ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ТРАНСКРИПЦІЙНОЇ АКТИВНОСТІ ГЕНІВ *AIRE*, *DEAF1*, *FOXP3*, *CTLA4* І *IL10* В БРИЖОВИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛАХ У НАЩАДКІВ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕСТАЦІЙНИМ ДІАБЕТОМ І В УМОВАХ ІНДУКЦІЇ ОРАЛЬНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ІНСУЛІНУ

У представленому розділі наведені результати досліджень відносного рівня мРНК *Aire* та *Deaf1* – регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну, а також визначення рівня транскрипційної активності генів *Foxp3*, *Ctla4* та *IL10*, для чого використовували високочутливі і високоспецифічні молекулярно-генетичні методи. Для визначення рівня експресії мРНК генів *Aire* (NM\_001106379.1), *Deaf1* (NM\_031801.1), *Foxp3* (NM\_001108250.1), *IL10* (NM\_012854.2) та *Ctla4* (NM\_031674.1) проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Відносний рівень експресії вищезазначених генів оцінювали за методом  $\Delta\Delta C_t$ , нормалізуючи за референс-геном *GAPDH*.

В якості моделі хронічної пренатальної гіперглікемії і порушеної толерантності до глюкози було використано розроблену і запатентовану на кафедрі патофізіології ЗДМУ модель експериментального гестаційного діабету (ЕГД) у самок щурів лінії Вістар [129]. Спочатку був проведений аналіз стану вуглеводного обміну у нащадків самиць з ЕГД шляхом визначення базального рівня глікемії і концентрації інсуліну в плазмі. З'ясувалось, що у самців, нащадків самиць з ЕГД, концентрація глюкози натще знаходилась в еуглікемічному діапазоні і достовірно не відрізнялась в контрольних і експериментальних групах (табл. 3.1). Концентрація інсуліну в плазмі крові у 1-місячних нащадків самиць з ЕГД не змінювалась, але в 6-місячному віці цей показник достовірно перевищував аналогічний показник групи контролю (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Концентрація глюкози і інсуліну в периферичній крові у самців, нащадків самок з експериментальним гестаційним діабетом ( $M \pm m$ )

Вік тварин	Концентрація глюкози, ммоль/л		Концентрація інсуліну, мкОД/мл		Індекс НОМА	
	контроль	нащадки самок з ЕГД	контроль	нащадки самок з ЕГД	контроль	нащадки самок з ЕГД
1 місяць	4,22±0,05	4,70±0,15	2,11±0,10	3,18±0,25	0,4	0,66
6 місяців	4,59±0,10	5,63±0,14	1,35±0,13	5,47±0,43*	0,27	1,37*

Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Тим не менш, концентрація глюкози натще в межах норми у самців-щурів, що є нащадками самиць із ЕГД, ще не свідчить про відсутність порушень вуглеводного обміну. Тому, для виявлення латентних змін метаболізму глюкози у щурів розраховувався індекс НОМА, що достовірно демонструє формування «прихованої» інсулінорезистентності, та проводився ГТТ, який один з критеріїв діагностики порушеної толерантності тканин до вуглеводів.

Для оцінки чутливості тканин до інсуліну вираховували індекс НОМА, який розраховується наступним чином:

Індекс НОМА = концентрація інсуліну в плазмі натще (мкОД / мл) x концентрація глюкози в плазмі натще (ммоль / л) / 22.5. Чим вище індекс НОМА, тим нижче чутливість до інсуліну і, отже, вище інсулінорезистентність. Використання в нашій роботі цього індексу свідчить про формування інсулінорезистентності у 6-місячних нащадків самиць з ЕГД, так як у контрольних самців він склав 0,27, а у нащадків самиць з ЕГД – 1,37 (див. табл. 3.1).

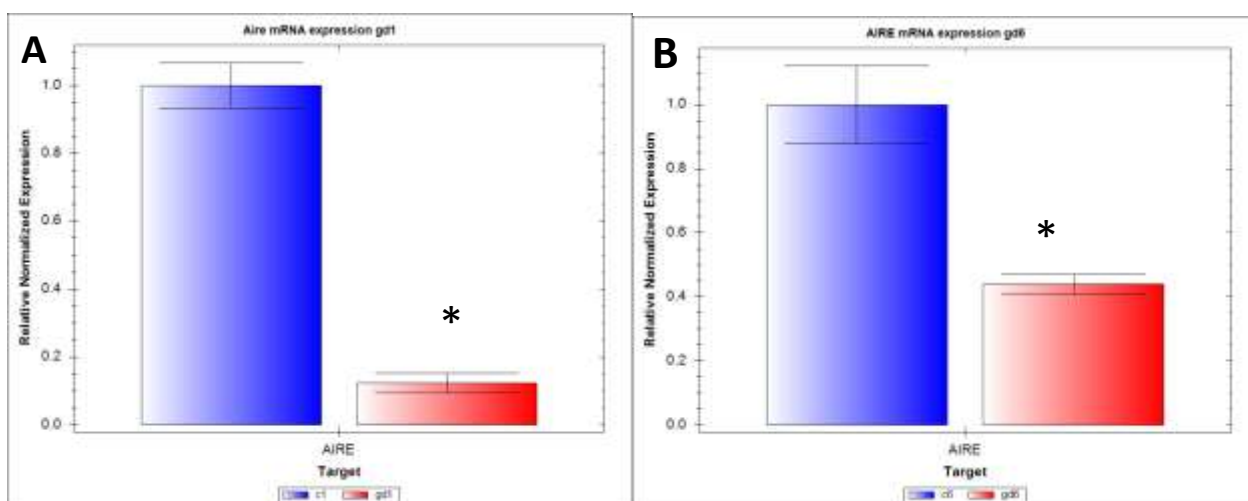
Іншим методом, що оцінює чутливість тканин до інсуліну, є ГТТ. В ході його проведення в експериментальних групах тварин було відзначено, що у



контрольних щурів у всіх вікових групах достовірних відмінностей в кривій ГТТ не спостерігалось. Це дозволило створити загальну контрольну групу тварин. У віці 1 місяць достовірних змін не було, проте у 6-місячних нащадків самиць з ЕГД були відзначені зміни в ГТТ. По-перше, це піздня поява піку гіперглікемії в крові – не з 15-ї, а з 30-ї хвилини. По-друге, еуглікемічний рівень не досягався ні до 30-ї, ні до 90-ї хвилини тесту. Тобто, у 6-ти місячних тварин, нащадків самиць з ЕГД, при проведенні ГТТ спостерігався діабетичний тип глікемічної кривої, для якої характерне порушення ранньої та пізньої фаз секреції інсуліну з розвитком інсулінорезистентності, про що свідчить високий рівень глікемії в постабсорбційний період тесту (після 90-ї хвилини).

### 3.1 Дослідження експресії мРНК генів *Aire*, *Deaf1* та *Foxp3*

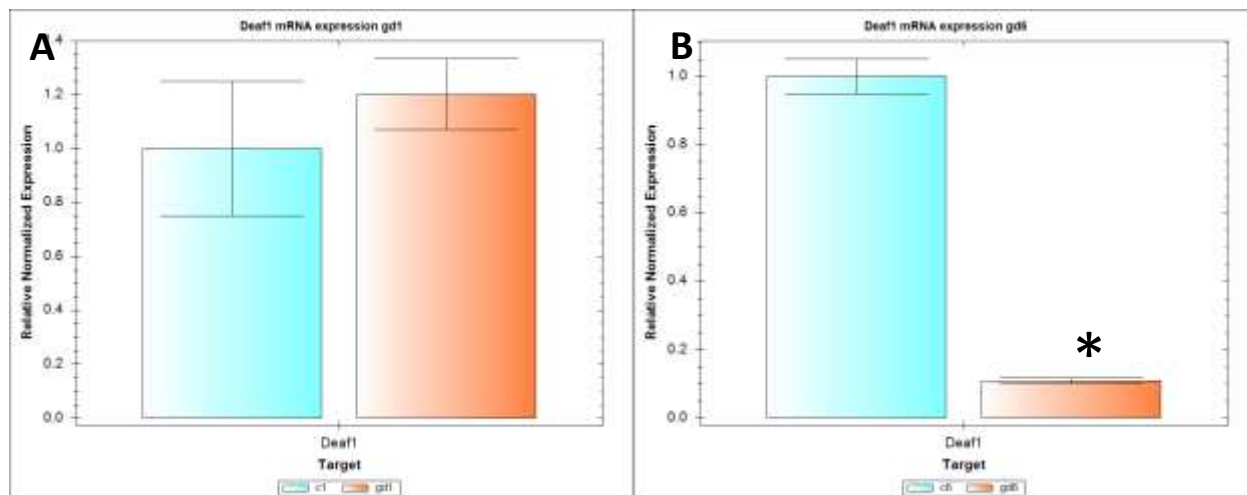
Дослідження експресії гену *Aire* в БЛВ продемонструвало, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігається значне зменшення вмісту мРНК цього аутоімунного регулятора (в 8,1 рази ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних та в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних нащадків у порівнянні з контрольною групою тварин (рис.3.1 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок. 3.1 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Aire* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

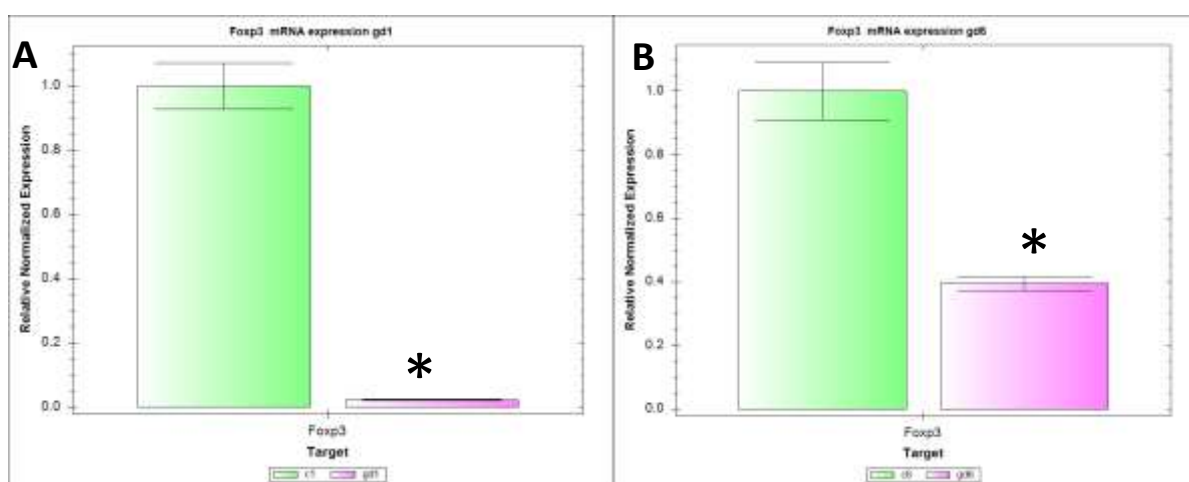
Вміст мРНК транскрипційного регулятора *Deaf1* у 1-місячних тварин достовірно не змінювався, а у 6-місячних нащадків спостерігалось її зменшення в 9,2 рази ( $p < 0,05$ ) (рис.3.2 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 3.2 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Deaf1* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

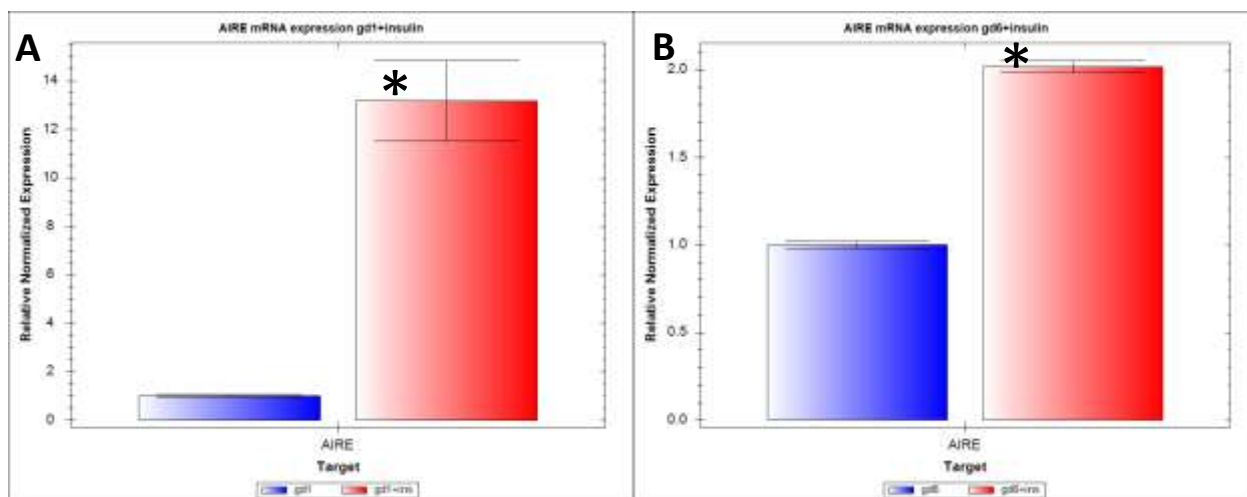
Що стосується мРНК транскрипційного фактору *Foxp3*, то у 1-місячних щурів цієї групи виявлено значне його зменшення – у 50 раз ( $p < 0,05$ ), в той же час у 6-місячних – в 2,5 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем (рис.3.3 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 3.3 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Foxp3* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

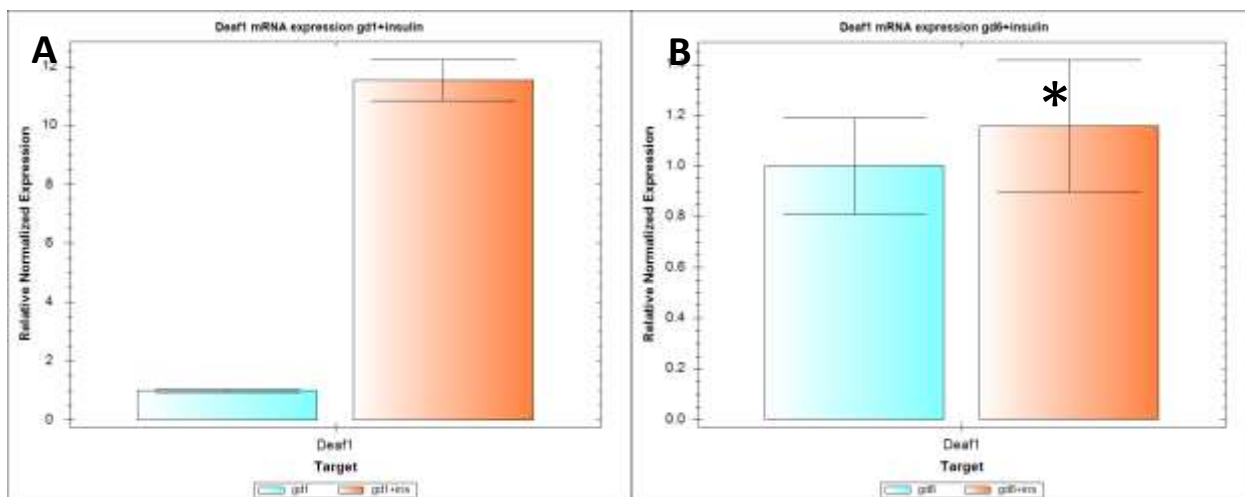
Групи тварин, нащадків щурів з ЕГД, що отримували перорально інсулін протягом перших 14 днів життя, показали наступні результати: у 1-місячних щурів спостерігалася транскрипційна індукція гену *Aire* – вміст мРНК аутоімунного регулятора збільшувався в 13,2 рази ( $p < 0,05$ ), у 6-місячних – в 2 рази ( $p < 0,05$ ) (рис.3.4 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 3.4 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Aire* в клітинах БЛВ у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після перорального введення інсуліну

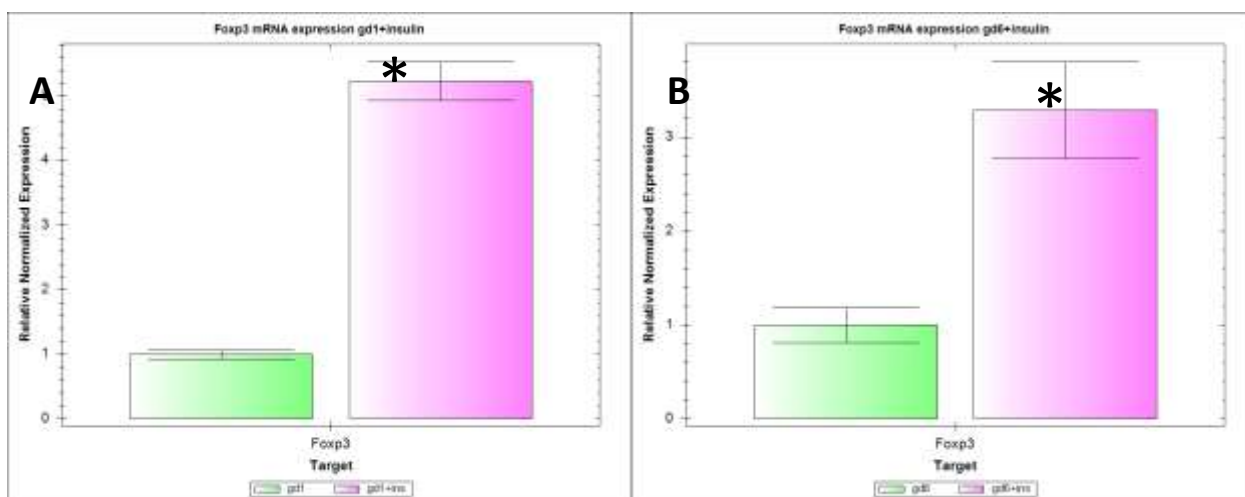
Транскрипційний регулятор *Deaf1* в першій віковій групі продемонстрував значуще зростання – в 11,5 раз ( $p < 0,05$ ), а в наступній повертався до рівня ЕГД (рис.3.5 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 3.5 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Deaf1* в клітинах БЛВ у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після введень інсуліну.

Дослідження експресії транскрипційного фактору *Foxp3* показало, що у 1-місячних щурів відбулося збільшення вмісту його мРНК в 5,2 рази ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних – в 3,3 рази ( $p < 0,05$ ) (рис.3.6 А і В).

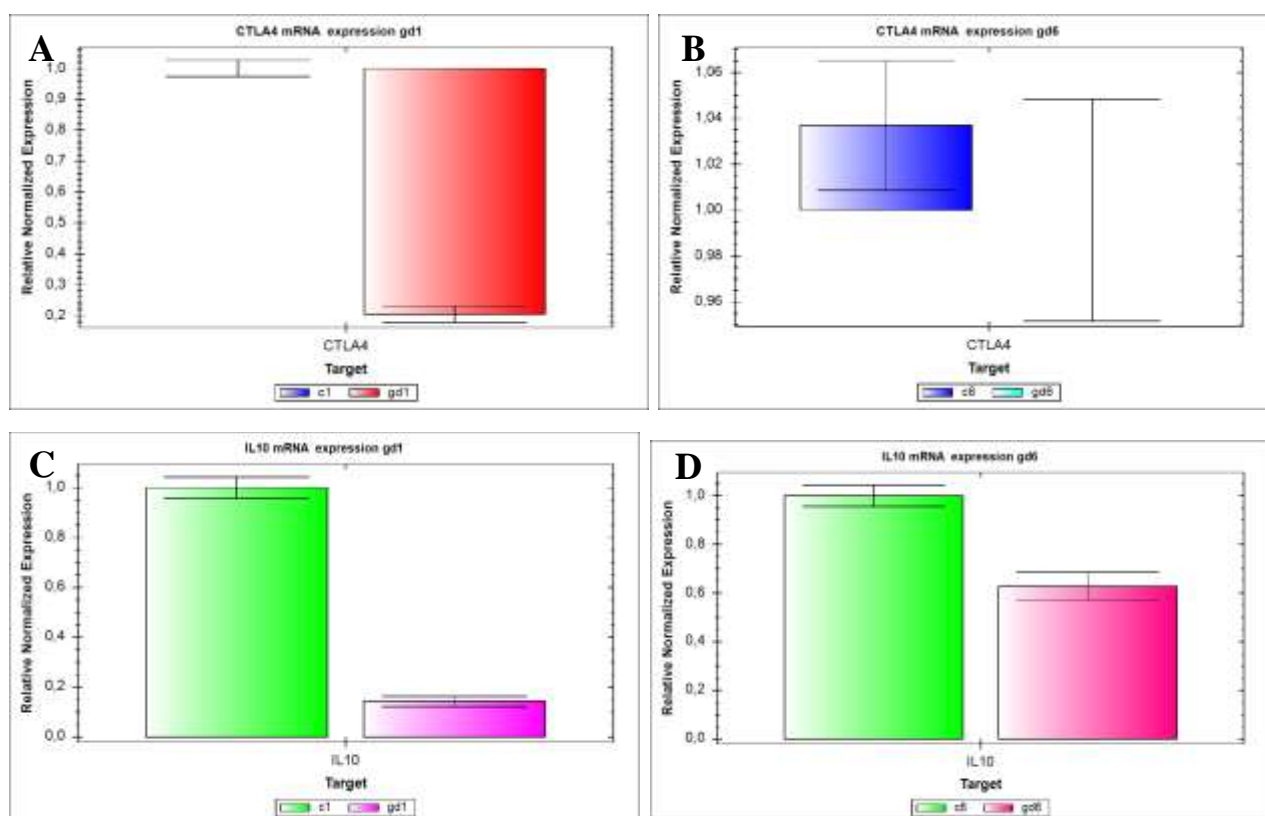


Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 3.6 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Foxp3* в клітинах БЛВ у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після введень інсуліну.

### 3.2 Дослідження експресії мРНК генів *Ctla4* і *Il10*

Дослідження експресії гену *Ctla4* в БЛВ показало, що у 1-місячних нащадків щурів з ЕГД спостерігається зниження вмісту мРНК цієї негативної коstimуляторної молекули (в 4,9 рази,  $p < 0,05$ ) з наступним поверненням до контрольних значень у 6-місячних нащадків (рис.3.7 А і В). Вміст мРНК супресорного цитокіну ІЛ-10 у 1-місячних тварин зменшувався в 6,9 разів ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних нащадків не змінювався (рис.3.7 С і D).

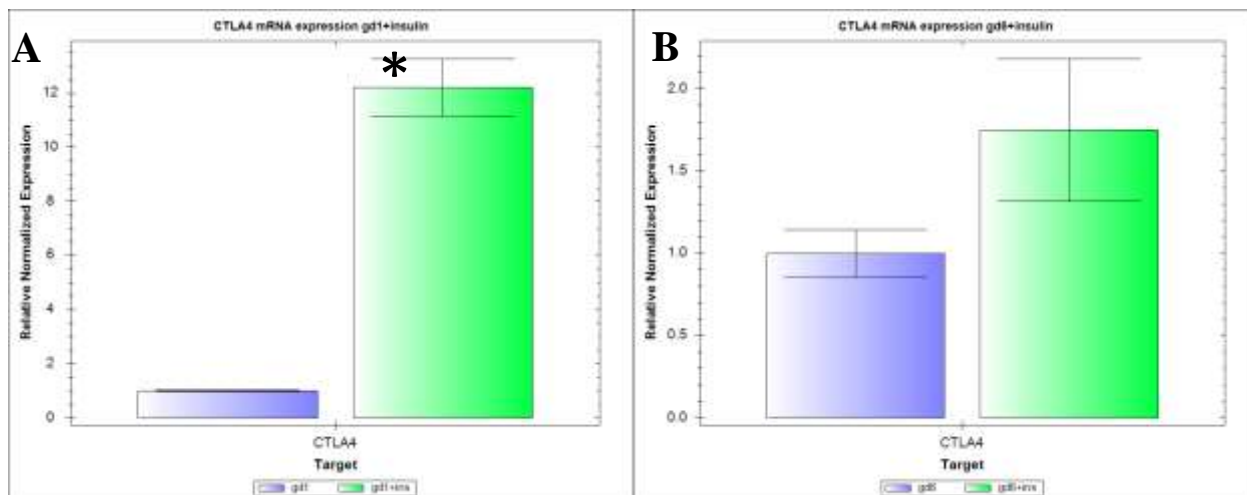


Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 3.7 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *CTLA4* (А, В) і *IL10* (С, D) в клітинах БЛВ. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta Ct$  з референс-геном GAPDH. c1, c6-контроль 1 і 6 міс.; gd1, gd6 – нащадки щурів з ЕГД.

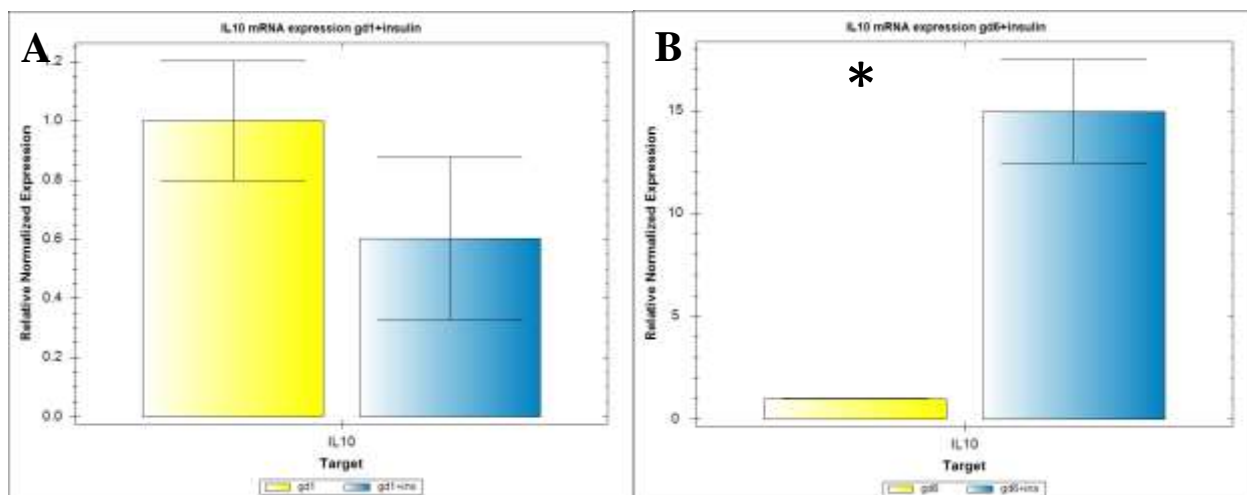
В експериментальних групах, що отримували перорально інсулін, також були досліджені експресія мРНК коstimуляторної молекули *Ctla4* та Treg-залежного супресорного цитокіну ІЛ-10. Були отримані наступні результати: у віці 1 місяця відносна кількість мРНК гену *Ctla4* зросла у 12,2 рази ( $p < 0,05$ ), а у

віці 6 місяців – достовірно не змінювалась (рис.3.7 А і В). Вміст мРНК *IL10*, навпаки, у першій віковій групі не змінювався, проте в 6-місячних щурів він зріс у 15 раз ( $p<0,05$ ) (рис. 3.8 А і В).



Примітка Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p<0,05$  (\*)

Рисунок 3.8 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ctla4* (А,В) в клітинах БЛВ. gd1, gd6 – нащадки щурів з ЕГД; gd1+ins, gd6+ins – після введень інсуліну.



Примітка Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p<0,05$  (\*)

Рисунок 3.9 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *IL10* (А,В) в клітинах БЛВ. gd1, gd6 – нащадки щурів з ЕГД; gd1+ins, gd6+ins – після введень інсуліну.

Узагальнюючи результати розділу, можна зробити наступні висновки:

1. Дослідження рівня мРНК генів-регуляторів периферичної імунологічної толерантності показало, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігалися такі порушення імунотолерантності: репресія гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*. Транскрипційна репресія гена *Foxp3* призводить до дефіциту супресорної сигналізації, що підтверджується також пригніченням експресії генів супресорного цитокіну ІЛ-10 та негативної костимуляторної молекули *Ctla4*.

2. Пероральне введення інсуліну в перші 2 тижні нівелювало ці зміни. Воно викликало транскрипційну активацію генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il10*.

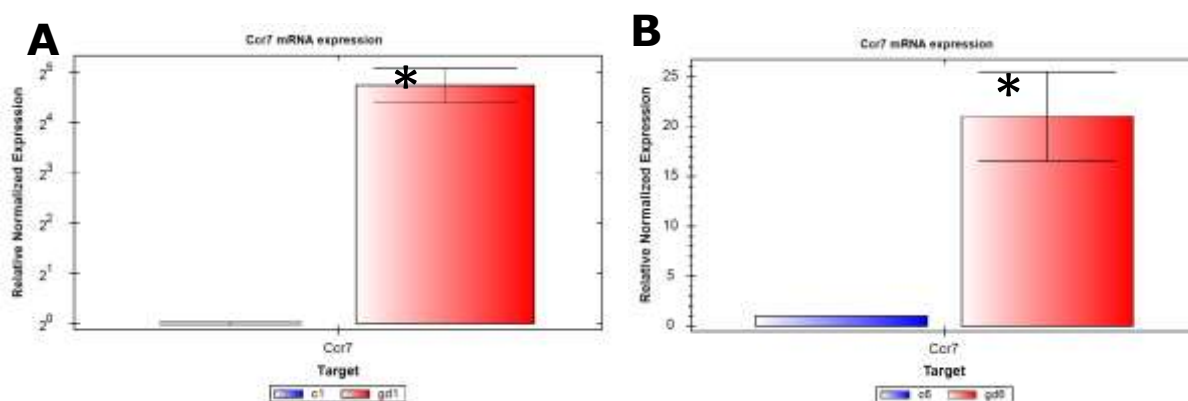
Матеріали, викладені в даному розділі, опубліковані в наукових працях автора [134–135].

## РОЗДІЛ 4

# ВПЛИВ ЕГД НА КІЛЬКІСНИЙ РІВЕНЬ ТРАНСКРИПТІВ ГЕНІВ-РЕГУЛЯТОРІВ *MADCAM1*, *SIP1*, *CXCR4* І *CCR7*, А ТАКОЖ ХАРАКТЕР ЕКСПРЕСІЇ мРНК NLRP3-ІНФЛАМАСОМИ І РОЗПОДІЛУ NLRP3+ КЛІТИН В БРИЖОВИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛАХ У НАЩАДКІВ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕСТАЦІЙНИМ ДІАТЕТОМ, ТА В УМОВАХ ІНДУКЦІЇ ОРАЛЬНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ІНСУЛІНУ І ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ ГЛІБЕНКЛАМІДУ

### 4.1 Дослідження експресії мРНК генів *Ccr7*, *Cxcr4*, *Madcam1* і *Slpr1*

Дослідження експресії гену *Ccr7* в БЛВ показало, що нащадки щурів з ЕГД демонструють значне збільшення вмісту мРНК цих хемокінових рецепторів – в 26,8 рази ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних та в 21 раз ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних нащадків у порівнянні з контрольною групою тварин (рис. 4.1 А і В).

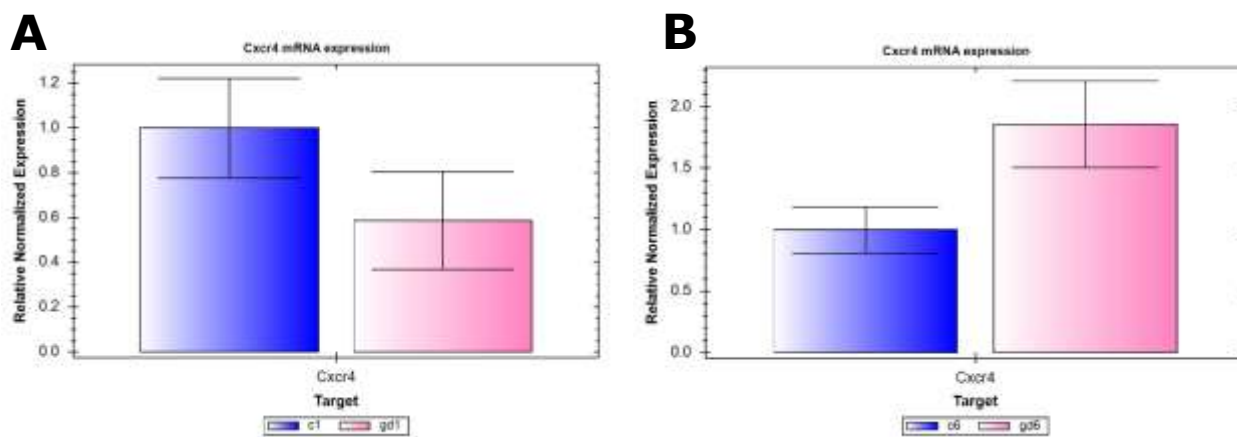


Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.1. – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ccr7* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

Щодо вмісту мРНК рецептору *Cxcr4*, то він достовірно не змінився в обох вікових групах (рис. 4.2 А і В).

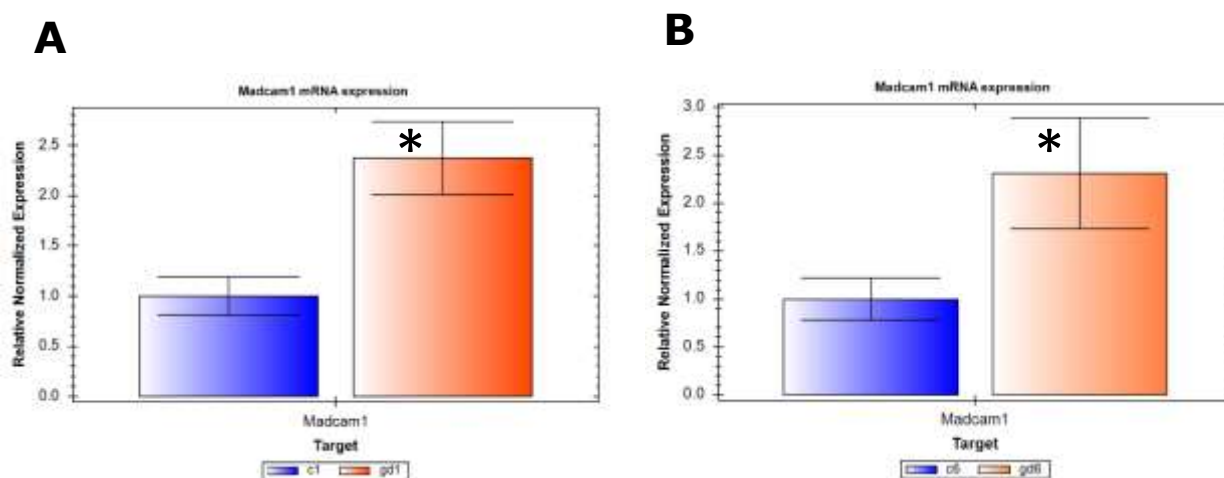




Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.2. – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Cxcr4* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

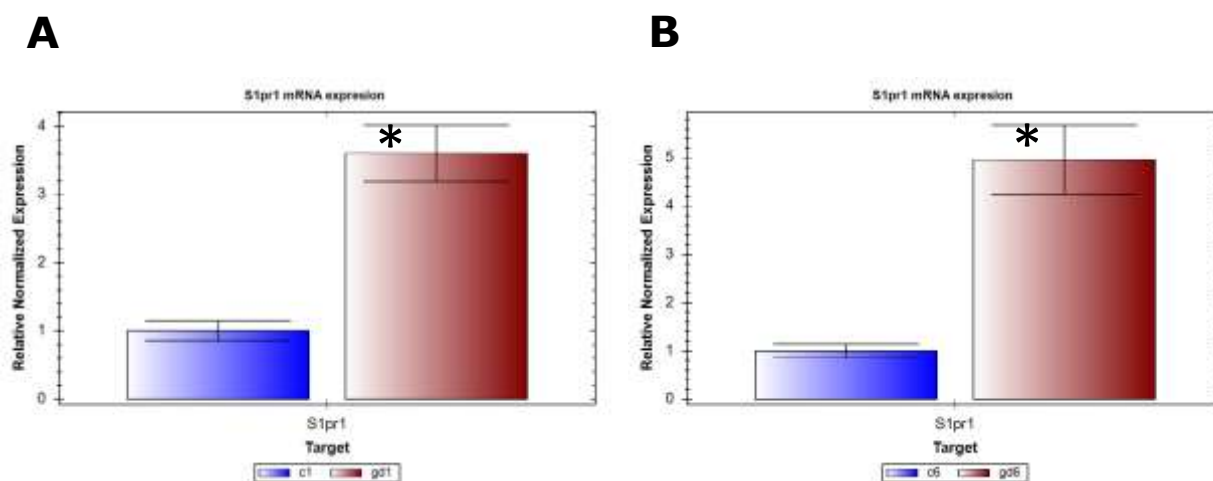
Відносна нормалізована кількість мРНК адресину *MAdCAM-1* у віці 1 місяця зросла у 2,4 рази ( $p < 0,05$ ), а в 6 місяців – в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.3 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.3. - Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Madcam1* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

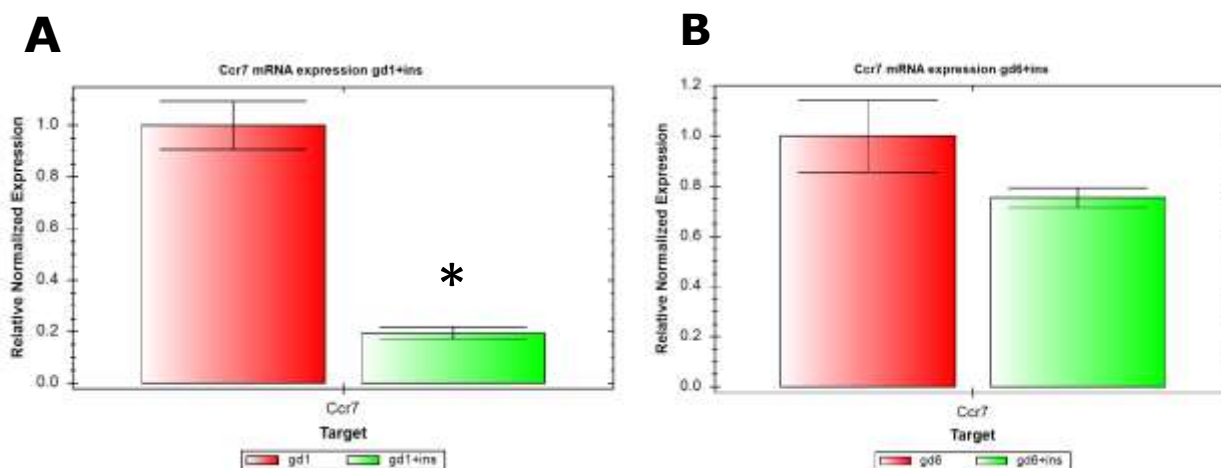
При дослідженні експресії гену *Slpr1* були отримані такі результати: у першій віковій групі вміст мРНК *S1PR1* збільшився у 3,6 рази ( $p < 0,05$ ), у старших тварин цей показник зріс у 5 раз ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.4 А і В).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.4. – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Slpr1* (А, В) в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

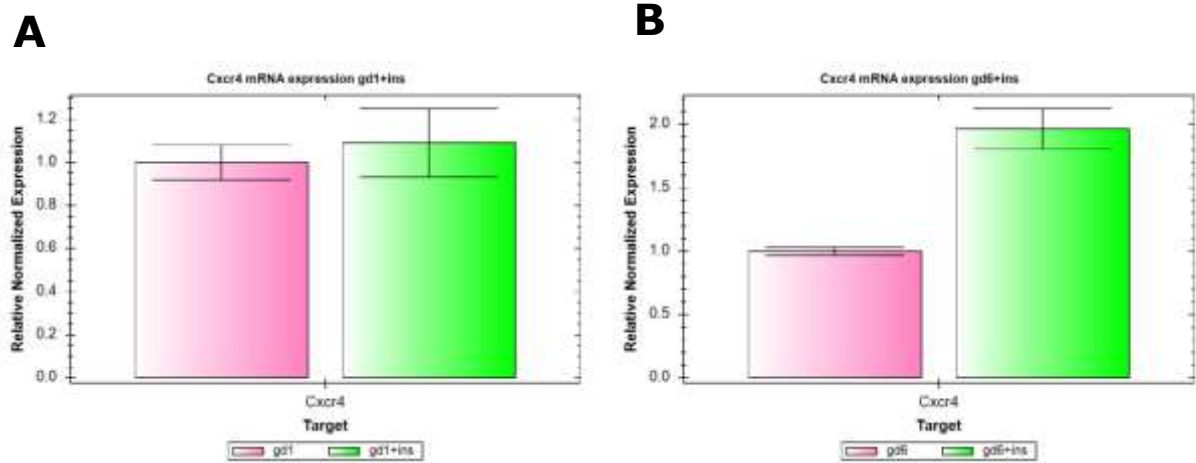
Групи нащадків щурів з ЕГД, яким перорально протягом перших 14 днів життя вводили інсулін, у порівнянні з нащадками щурів з ЕГД показали наступні результати: кількість мРНК гену *Ccr7* у 1-місячних тварин зменшилась на 81 % ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних щурів достовірних змін не виявлено (рис. 4.5 А і В).



Примітка Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.5 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ccr7* в клітинах БЛВ. у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після введень інсуліну.

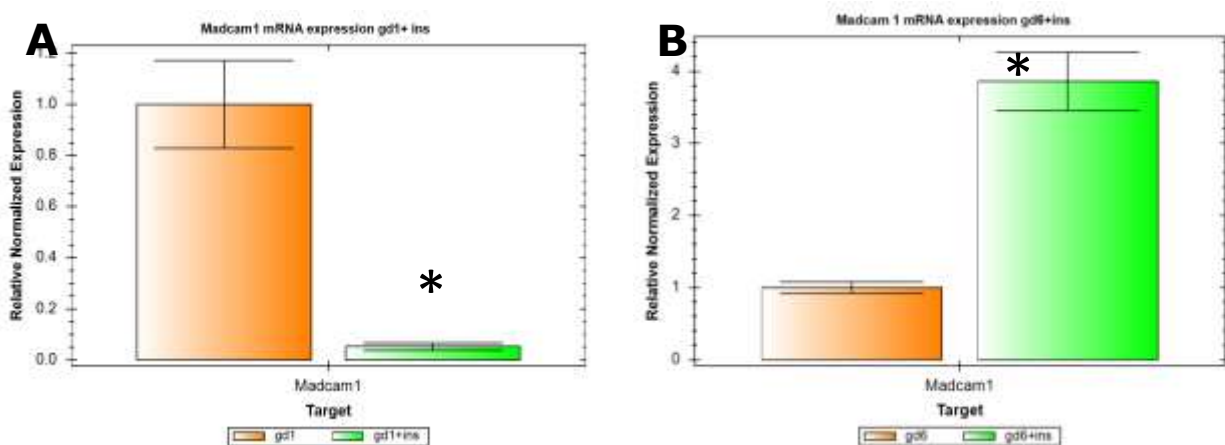
Експресія гену *Cxcr4* не зазнала достовірних змін у обох вікових групах (рис. 4.6 А і В).



Примітка Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.6 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Cxcr4* в клітинах БЛВ. у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після введень інсуліну.

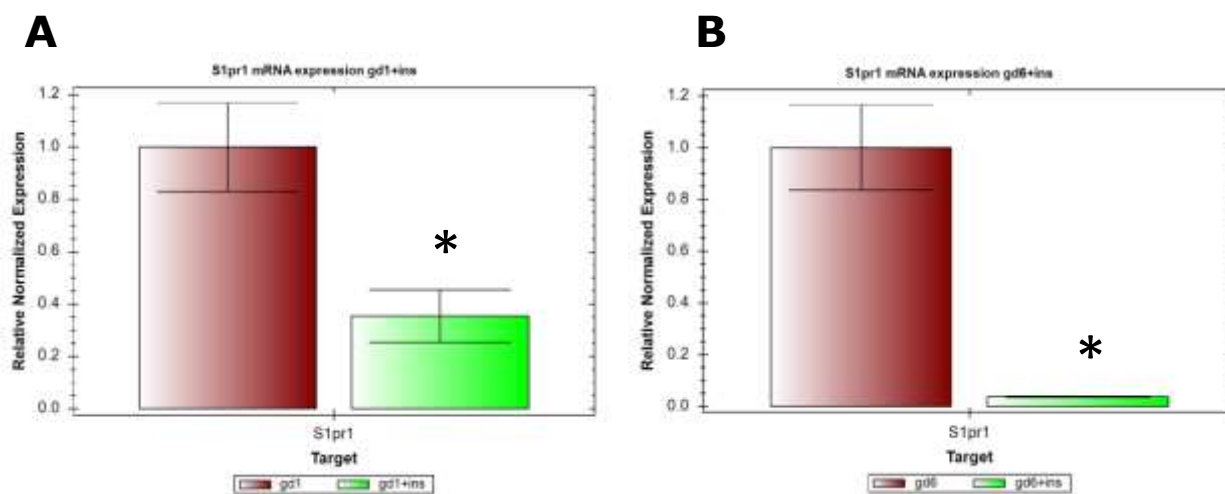
Кількість мРНК адресину МAdСАМ-1 у віці 1 місяця зменшилась на 95 % ( $p < 0,05$ ), тоді як у 6-місячних щурів збільшилась в 3,9 рази ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.7 А і В).



Примітка Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.7 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Madcam1* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після введень інсуліну.

Вміст мРНК гену *Slpr1* у щурів першої вікової групи знизився на 65 % ( $p < 0,05$ ), а старшої – на 96 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.8 А і В).



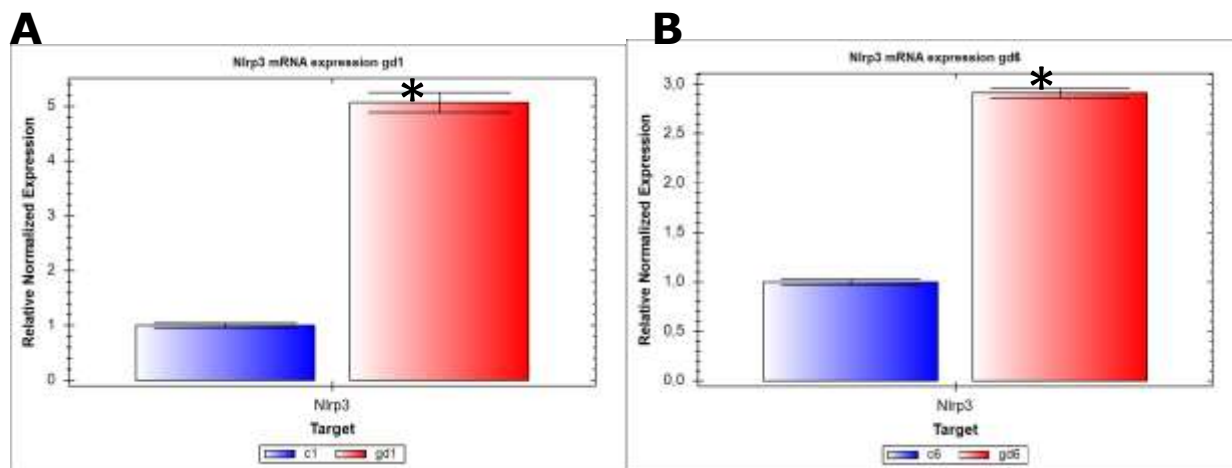
Примітка Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.8 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Slpr1* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В) після введень інсуліну.

## 4.2 Характер експресії мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин в брижових лімфатичних вузлах

### 4.2.1 Характер експресії мРНК NLRP3-інфламасоми в брижових лімфатичних вузлах

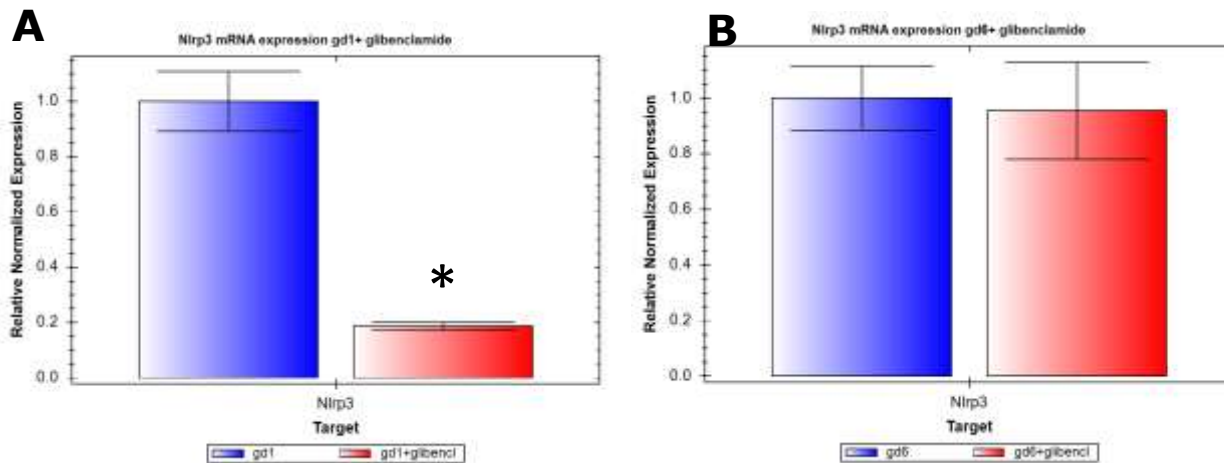
Розвиток ЕГД достовірно супроводжується транскрипційною індукцією гену *Nlrp3* в БЛВ у нащадків, рівень мРНК якого зростав в 5 разів ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і в 3 рази ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних тварин (рис. 4.9).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до контрольної групи тварин відповідного віку  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.9 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Nlrp3* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В)

Введення глібенкламіду самкам під час вагітності пригнічує транскрипцію гену *Nlrp3* лише у віці 1 міс. (в 5,3 рази,  $p < 0,05$ ) і не змінюється у старшій віковій групі (рис. 4.10).



Примітка. Достовірність відмінностей по відношенню до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 4.10 – Відносна нормалізована кількість мРНК гену *Nlrp3* в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД після введень глібенкламіду вагітним самкам у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В).

#### **4.2.2 Особливості експресії Nlrp3 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.**

Для дослідження Nlrp3<sup>+</sup>-клітин у гістологічних зрізах БЛВ застосовували реакцію непрямой імунофлюоресценції з FITC і імуногістохімічну реакцію (рис. 4.11).

За результатами морфометричного аналізу визначили наступні підкласи імунопозитивних клітин: лімфобласти площею Area  $\geq 30,0$  мкм<sup>2</sup>; середні лімфоцити  $16,0 > \text{Area} \geq 11,0$  мкм<sup>2</sup> та малі лімфоцити  $11,0 > \text{Area} \geq 5,0$  мкм<sup>2</sup>.

І обчислили щільність розподілу імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах БЛВ: абсолютну (кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup> площі тканини) і відносну (відсоткову).

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до Nlrp3 показав наступне: сумарна щільність Nlrp3<sup>+</sup>-лімфоцитів 1-місячних щурят у **корковому плато** групи контролю становила  $39 \pm 5$  на 1 мм<sup>2</sup>. У порівнянні з цією групою у нащадків щурів з ЕГД цей показник дорівнює  $58 \pm 4$  на 1 мм<sup>2</sup>, що на 49 % більше ( $p < 0,05$ ). Це збільшення відбулося за максимального підвищення кількості малих лімфоцитів (на 54 %). У наступній віковій групі порівняльний аналіз показників не виявив достовірних змін (рис. 4.12, табл. 4.1).

Що стосується концентрації показника в корковому плато, то у віці 1 місяця спостерігалось зменшення інтенсивності флуоресценції у малих лімфоцитах на 4 % ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних щурят мало місце зниження концентрації у середніх лімфоцитах на 3 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.2).



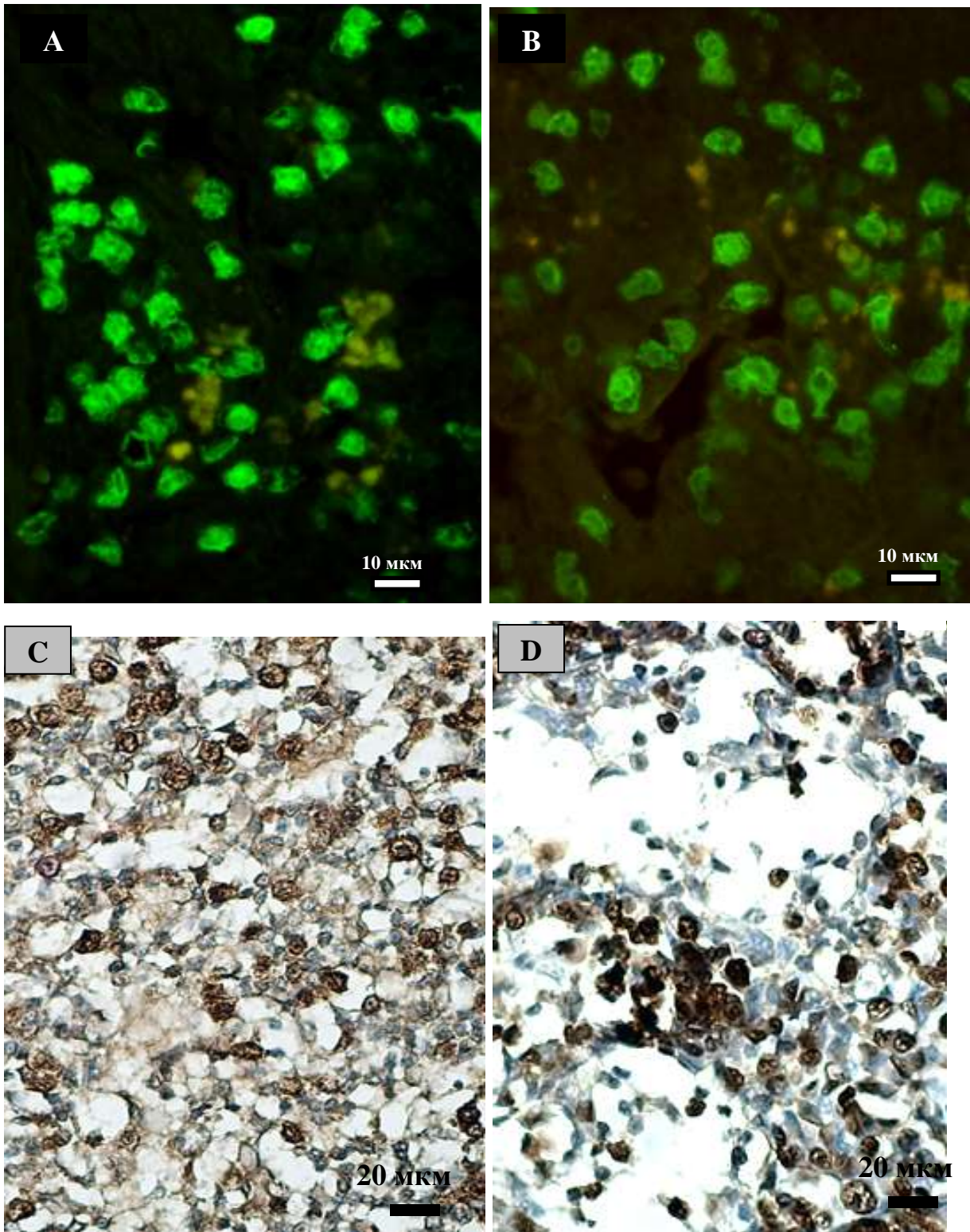
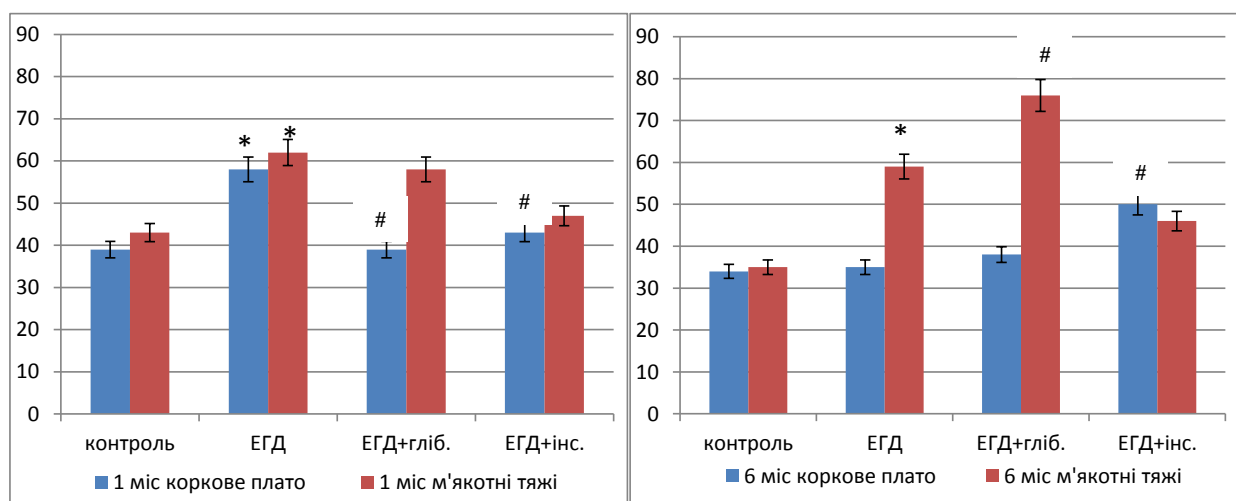


Рисунок 4.11 – Nlrp3<sup>+</sup>-клітини у корковому плато (А, С) і мозкових тяжках (В, D) БЛВ. Реакція непрямой імунофлюоресценції з FITC (А, В) і імуногістохімічна реакція з вторинними антитілами rabbit ImmunoCruz Staining system (С, D).

У **мозкових тяжах** брижових лімфатичних вузлів в контрольній групі 1-місячних щурів сумарна кількість Nlр3-позитивних клітин дорівнює  $43 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$ , а в групі ЕГД1  $62 \pm 6$  на  $1 \text{ мм}^2$ . Це свідчить про достовірне збільшення сумарної щільності на 44 %. Це відбулося переважно за рахунок середніх лімфоцитів, що збільшилися в 2,2 рази, та малих лімфоцитів, кількість яких зросла на 53 % ( $p < 0,05$ ). При дослідженні матеріалу, взятого від 6-місячних тварин, було виявлено збільшення сумарної щільності на 69 %. При цьому найбільші зміни також відбулися у групі середніх та малих лімфоцитів. Їх кількість зросла в 3,3 та 2 рази відповідно ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.12, табл. 4.3).

Концентрація показника у 1-місячних нащадків щурів з ЕГД була дещо зниженою у лімфобластах – на 10 % ( $p < 0,05$ ). А в 6-місячному віці достовірне зниження концентрація Nlр3 спостерігалось в лімфобластах – на 18 % та середніх лімфоцитах – на 4 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 4.4).



Примітка 1. Достовірність відмінностей  $p < 0,05$  відносно контролю, \*

Примітка 2. Достовірність відмінностей  $p < 0,05$  до нащадків тварин з ЕГД відповідного віку без введень препарату, #

Рисунок 4.12. – Сумарна щільність (на  $1 \text{ мм}^2$ ) Nlр3 імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введень глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.



**4.2.3 Особливості експресії Nlrp3 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам.**

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до Nlrp3 дав наступні результати.

Таблиця 4.1 – Кількість Nlrp3<sup>+</sup>-клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	Nlrp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Nlrp3 <sup>+</sup> середні лімф.	Nlrp3 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	39±5	$\frac{5\pm 1}{14,1\pm 2,4\%}$	$\frac{10\pm 2}{24,8\pm 4,1\%}$	$\frac{24\pm 3}{61,1\pm 8,5\%}$
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	58±4 <sup>1</sup>	$\frac{7\pm 1}{11,5\pm 1,6\%}$	$\frac{14\pm 2}{24,0\pm 2,7\%}$	$\frac{37\pm 3^1}{64,5\pm 5,1\%}$
контроль – 6 міс	34±3	$\frac{3\pm 1}{7,5\pm 1,8\%}$	$\frac{12\pm 2}{34,9\pm 4,6\%}$	$\frac{19\pm 2}{57,7\pm 6,7\%}$
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	35±3	$\frac{3\pm 1}{8,5\pm 1,6\%}$	$\frac{8\pm 1}{23,1\pm 3,3\%}$	$\frac{24\pm 3}{68,3\pm 7,2\%}$
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	39±3 <sup>2</sup>	$\frac{5\pm 1}{12,5\pm 1,8\%}$	$\frac{9\pm 1^2}{23,3\pm 2,6\%}$	$\frac{25\pm 2^2}{64,3\pm 6,1\%}$
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	38±3	$\frac{3\pm 1}{7,9\pm 1,5\%}$	$\frac{9\pm 1}{22,7\pm 3,1\%}$	$\frac{26\pm 3}{69,4\pm 7,7\%}$
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	43±3 <sup>2</sup>	$\frac{3\pm 0^2}{5,1\pm 1,3\%}$	$\frac{17\pm 3}{34,3\pm 8,4\%}$	$\frac{30\pm 2}{60,6\pm 6,0\%}$
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	50±4 <sup>2</sup>	$\frac{10\pm 1^2}{19,9\pm 3,5\%}$	$\frac{11\pm 1}{21,5\pm 2,8\%}$	$\frac{29\pm 3}{58,6\pm 7,6\%}$

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (1), до ЕГД (2)

У корковому плато брижових лімфатичних вузлів у віці 1 місяця спостерігалось зниження загальної кількості Nlrp3<sup>+</sup>-позитивних клітин у порівнянні з ЕГД1 на 33 % (p<0,05). Переважно за рахунок середніх та малих форм лімфоцитів – на 36 % та на 32 % відповідно (p<0,05). Причому у 6-місячному віці достовірних змін виявлено не було (див. рис. 4.12, див. табл. 4.1).

Дослідження концентрації показника в обох вікових групах не виявило значущих зрушень (див. табл. 4.2).

Таблиця 4.2 – Концентрація Nlrp3 (O<sub>10</sub>) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m).

Серії	Nlrp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Nlrp3 <sup>+</sup> середні лімфоцити	Nlrp3 <sup>+</sup> малі лімфоцити
контроль – 1 міс	0,599±0,024	0,321±0,004	0,162±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,632±0,028	0,315±0,003	0,155±0,002 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,642±0,072	0,315±0,004	0,165±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,633±0,037	0,304±0,004 <sup>1</sup>	0,157±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,626±0,025	0,307±0,004	0,161±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,685±0,050	0,310±0,004	0,158±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,614±0,038	0,308±0,003	0,156±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,589±0,021	0,314±0,004	0,141±0,003 <sup>2</sup>

Примітка: достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

В мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів зазначених груп зафіксовано наступні результати. В лімфобластах 1-місячних щурів сумарна щільність залишилась незмінною. При цьому спостерігалось деяке зменшення кількості середніх лімфоцитів – на 45 % ( $p < 0,05$ ). А у віці 6 місяців знайшли збільшення загальної кількості позитивних клітин – на 29 % ( $p < 0,05$ ). Це відбулося за рахунок лімфобластів, кількість яких зросла в 2,4 рази, а середні лімфоцити навпаки – показали деяке зменшення – на 25 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.12, див. табл. 4.3).

Таблиця 4.3 – Кількість Nlrp3<sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжках БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	Nlrp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Nlrp3 <sup>+</sup> середні лімф.	Nlrp3 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	43±2	<u>18±1</u> 41,3±2,4 %	<u>9±1</u> 20,0±1,6 %	<u>17±1</u> 38,6±3,2 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	62±6 <sup>1</sup>	<u>16±2</u> 25,3±3,3 %	<u>20±3<sup>1</sup></u> 32,1±4,3 %	<u>26±3<sup>1</sup></u> 42,6±4,7 %
контроль – 6 міс	35±3	<u>12±1</u> 33,5±3,4 %	<u>6±1</u> 18,5±1,7 %	<u>17±1</u> 47,9±4,2 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	59±5 <sup>1</sup>	<u>11±1</u> 19,1±2,5 %	<u>20±2<sup>1</sup></u> 33,1±3,3 %	<u>28±3<sup>1</sup></u> 47,8±4,4 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	58±6	<u>19±2</u> 33,6±4,2 %	<u>11±1<sup>2</sup></u> 18,7±2,6 %	<u>28±4</u> 47,7±6,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	76±4 <sup>2</sup>	<u>26±1<sup>2</sup></u> 33,7±1,7 %	<u>15±1<sup>2</sup></u> 19,6±1,2 %	<u>35±3</u> 46,7±3,4 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	47±5	<u>14±2</u> 30,6±2,4 %	<u>8±1<sup>2</sup></u> 16,3±1,5 %	<u>25±3</u> 53,1±4,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	46±4 <sup>2</sup>	<u>12±1</u> 25,9±1,7 %	<u>9±1<sup>2</sup></u> 18,6±1,3 %	<u>26±2</u> 55,5±2,9 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю <sup>(1)</sup>, до ЕГД <sup>(2)</sup>

Вивчення концентрації показника показало достовірне збільшення концентрації в лімфобластах 1-місячних тварин – на 19 %, та зниження такої в середніх та малих лімфоцитах – на 7 % та 11 % відповідно ( $p < 0,05$ ). В групі щурів 6 місяців спостерігали збільшення концентрації в лімфобластах на 17 %, та середніх лімфоцитах – на 5 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Концентрація Nlrp3 (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	Nlrp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Nlrp3 <sup>+</sup> середні лімф.	Nlrp3 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,621±0,012	0,319±0,003	0,144±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,561±0,012 <sup>1</sup>	0,322±0,002	0,145±0,002
контроль – 6 міс	0,683±0,018	0,315±0,004	0,142±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,557±0,016 <sup>1</sup>	0,301±0,003 <sup>1</sup>	0,145±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,665±0,020 <sup>2</sup>	0,298±0,004 <sup>2</sup>	0,129±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,653±0,012 <sup>2</sup>	0,316±0,002 <sup>2</sup>	0,139±0,002
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,652±0,021 <sup>2</sup>	0,319±0,006	0,141±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,667±0,023 <sup>2</sup>	0,313±0,004 <sup>2</sup>	0,136±0,002 <sup>2</sup>

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

#### 4.2.4 Особливості експресії *Nlrp3* в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, які отримували пероральний інсулін.

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до *Nlrp3* було проаналізовано з отриманням наступних результатів. Сумарна щільність *Nlrp3* клітин в **корковому плато** в віці 1 місяця знизилась у порівнянні з ЕГД на 26 % ( $p < 0,05$ ), переважно за рахунок лімфобластів – їх кількість зменшилась на 57 %. У 6-місячних тварин спостерігалось збільшення сумарної кількості позитивних клітин на 43 %. Серед усіх субпопуляцій зміни найбільше торкнулися лімфобластів – в 3,3 рази ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.12, див. табл. 4.1).

Концентрація показника в різних підкласах 1-місячних тварин залишилась незмінною, а в 6-місячних зменшилась в малих лімфоцитах на 10 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 4.2).

Сумарна щільність *Nlrp3*-позитивних клітин в **мозкових тяжах** 1-місячних щурів залишилась достовірно незмінною. А число середніх лімфоцитів зменшилось на 60 % ( $p < 0,05$ ). В 6 місяців загальне число *Nlrp3*-клітин зменшилось на 22 %, за рахунок середніх лімфоцитів, що зменшились на 55 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.12, див. табл. 4.3).

В першій віковій групі концентрація показника достовірно змінилася лише в лімфобластах – зросла на 16 %. А в віці 6 місяців зросла в лімфобластах та середніх лімфоцитах – на 20 % та 4 % відповідно, а в малих лімфатичних клітинах зменшилась на 6 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 4.4).

Узагальнюючи результати розділу, можна зробити наступні висновки:

1. Дослідження рівня транскриптів генів-регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів показало, що нащадки щурів з ЕГД демонструють значне зростання вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *Slpr1*, проте рівень експресії *Cxcr4* в обох вікових групах достовірно не змінився. Формування оральної толерантності

до інсуліну супроводжується зниженням відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *Slpr1* в клітинах БЛВ.

2. Розвиток ЕГД з інтранатальною гіперглікемією супроводжується транскрипційною індукцією гена *Nlrp3* в БЛВ у нащадків. Рівень його мРНК зростає в 5 разів ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і в 3 рази ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних щурів. Введення глібенкламіду під час вагітності пригнічує транскрипцію гена *Nlrp3* лише у віці 1 місяця (в 5,3 рази,  $p < 0,05$ ) і не змінюється у старших щурів.

2. У нащадків щурів з ЕГД збільшується щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів БЛВ, більш значущо на ранніх термінах спостереження. Прийом глібенкламіду зменшує кількість NLRP3<sup>+</sup>-клітин лише у віці 1 міс. (на 33 %, коркове плато), тоді як у 6-місячних щурів їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає.

Матеріали, викладені в даному розділі, опубліковані в наукових працях автора [136–138].

## РОЗДІЛ 5

### РОЗПОДІЛ РЕЦЕПТОРІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ TLR2, TLR4, NOD2 І RIG-I СЕРЕД ЛІМФОЦИТІВ БРИЖОВИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ У НАЩАДКІВ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕСТАЦІЙНИМ ДІАБЕТОМ, ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ ГЛІБЕНКЛАМІДУ, В УМОВАХ ІНДУКЦІЇ ОРАЛЬНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ІНСУЛІНУ

#### 5.1 Характер розподілу TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах.

##### 5.1.1 Особливості експресії TLR2 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2 показав наступне. У **корковому плато** 1-місячних тварин було зафіксовано збільшення сумарної щільності позитивних лімфоцитів на 42 % переважно за рахунок середніх (на 57 %) і малих форм (на 73 %). А у 6-місячних щурів сумарна щільність зросла на 76 % але вже за рахунок лімфобластів (в 3,3 рази) і середніх лімфоцитів (на 67 %) ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.1–5.4, табл. 5.1).

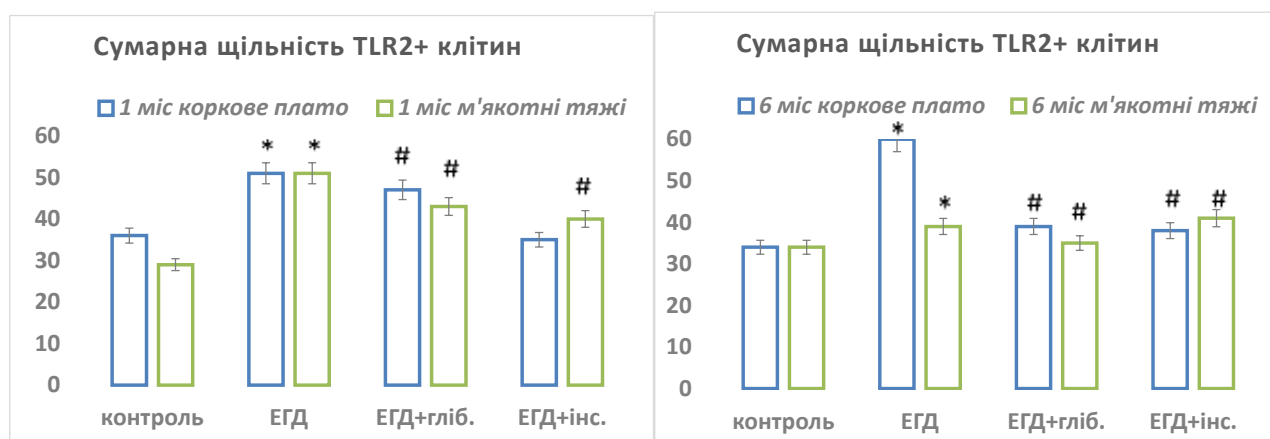
Концентрація рецепторів у першій віковій групі знизилась на 11 % в лімфобластах та на 8 % в малих лімфоцитах. А в старших тварин спостерігалось збільшення концентрації параметра в лімфобластах на 21 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.2).

В **мозкових тяжах** 1-місячних тварин було відмічено підвищення загального числа клітин на 76 %. При цьому лімфобласти зросли в 12,5 раз, середні лімфоцити на 57 %. А малі знизилися на 25 % ( $p < 0,05$ ). У 6-місячних тварин достовірних змін не зафіксовано (див. рис. 5.1–5.4, табл. 5.3).

Що стосується концентрації рецепторів TLR2, то у 1-місячних тварин концентрація в лімфобластах достовірно підвищена – на 48 %, а в малих лімфоцитах знижена на 13 %. У віці 6 місяців щільність TLR2 на поверхні лімфобластів зросла на 14 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.4).

### 5.1.2 Особливості експресії TLR2 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2 дав наступні результати. У корковому плато 1-місячних тварин відбулося достовірне зниження щільності позитивних лімфобластів на 36 %. У віці 6 місяців спостерігалось зниження загальної кількості клітин на 35 % Здебільшого за рахунок лімфобластів (на 80 %) і середніх лімфоцитів (на 50 %) ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.1–5.4, див. табл. 5.1).

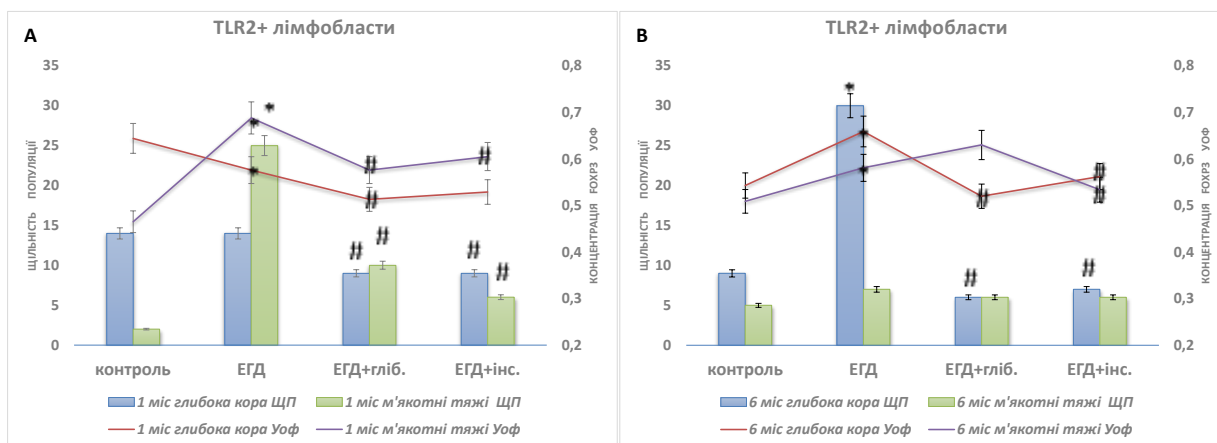


Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.1 – Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) TLR2 імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

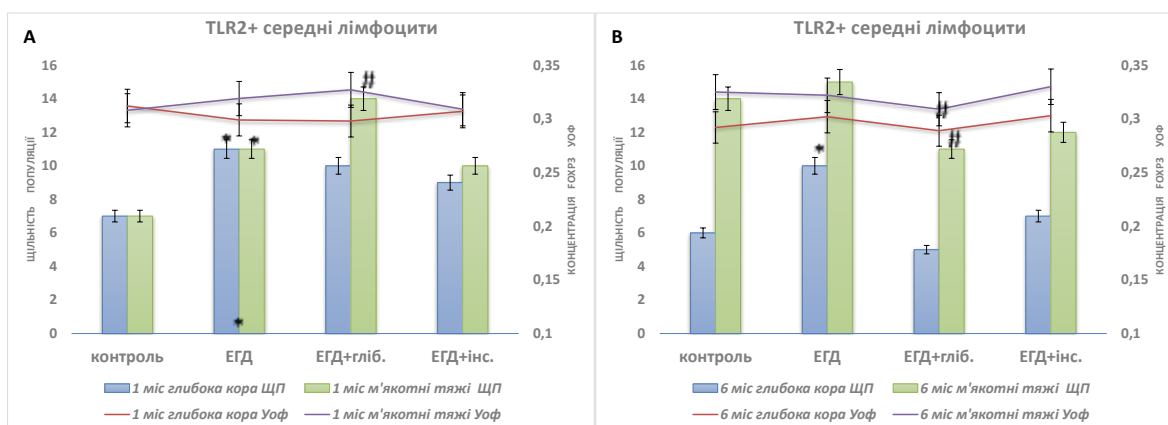
Зміни концентрації рецептора на поверхні позитивних клітин характеризувалися її зменшенням в лімфобластах на 11 % у 1-місячних тварин, та на 21 % у 6-місячних ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.2).





Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.2 – (А, В) Щільність TLR2 імунопозитивних лімфобластів (на  $1 \text{ мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

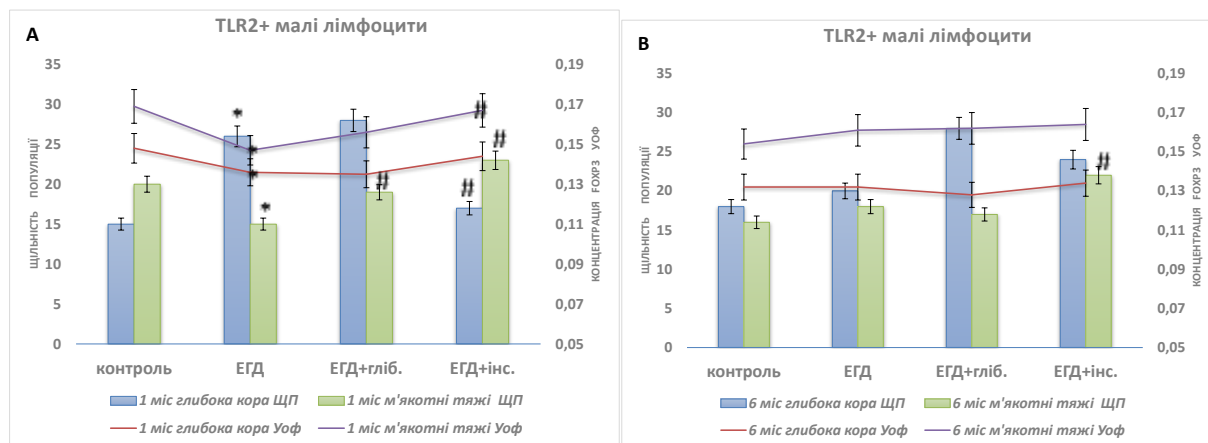


Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.3 – (А, В) Щільність TLR2 імунопозитивних середніх лімфоцитів (на  $1 \text{ мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

В мозкових тяжках щурів віком 1 місяць загальна кількість позитивних клітин достовірно не змінилася. Відбувся перерозподіл клітин: знизилась кількість лімфобластів на 60 %, збільшились середні на 27 % та малі лімфоцити на 27 %. У 6-місячних щурів кількість середніх лімфоцитів достовірно зменшилась на 27 %

(див. рис. 5.1–5.4, див. табл. 5.3). При цьому концентрація рецепторів у віці 1 місяця знизилась у лімфобластах на 16 %, а у 6-місячних щурів вона знизилась на 4 % у середніх лімфоцитах ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.4).



Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.4 – (А, В) Щільність TLR2 імунопозитивних малих лімфоцитів (на  $1\text{мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

### 5.1.3 Особливості експресії TLR2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до TLR2 було проаналізовано з отриманням наступних результатів. У корковому плато щурів віком 1 місяць зафіксовано достовірне зменшення сумарної щільності показника на 31 %. По класам зміни розподілилися таким чином. Лімфобласти зменшилися на 36 %, а малі лімфоцити на 35 %. У 6-місячних щурів сумарна щільність зменшилась на 37 %. Здебільшого за рахунок лімфобластів – на 77 % та середніх лімфоцитів – на 30 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.1–5.4, див. табл. 5.1).

Таблиця 5.1 – Кількість TLR2<sup>+</sup>- клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	TLR2 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR2 <sup>+</sup> середні лімф.	TLR2 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	36±3	<u>14±2</u> 38,8±5,7 %	<u>7±1</u> 18,7±2,4 %	<u>15±2</u> 42,5±4,7 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	51±4 <sup>1</sup>	<u>14±2</u> 28,2±4,2 %	<u>11±1</u> <sup>1</sup> 21,5±2,3 %	<u>26±2</u> <sup>1</sup> 50,4±4,7 %
контроль – 6 міс	34±3	<u>9±1</u> 27,8±4,4 %	<u>6±1</u> 19,0±3,0 %	<u>18±2</u> 53,2±5,7 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	60±5 <sup>1</sup>	<u>30±3</u> <sup>1</sup> 49,9±4,8 %	<u>10±1</u> <sup>1</sup> 17,1±1,7 %	<u>20±2</u> 33,0±3,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	47±4	<u>9±1</u> <sup>2</sup> 18,4±3,0 %	<u>10±1</u> 22,2±2,8 %	<u>28±3</u> 59,3±5,8 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	39±5 <sup>2</sup>	<u>6±1</u> <sup>2</sup> 16,3±2,9 %	<u>5±1</u> <sup>2</sup> 13,0±2,7 %	<u>28±4</u> 70,7±9,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	35±3 <sup>2</sup>	<u>9±1</u> <sup>2</sup> 25,7±2,6 %	<u>9±1</u> 26,2±3,2 %	<u>17±2</u> <sup>2</sup> 48,0±5,7 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	38±3 <sup>2</sup>	<u>7±1</u> <sup>2</sup> 18,6±3,3 %	<u>7±1</u> <sup>2</sup> 18,9±2,4 %	<u>24±2</u> 62,5±6,2 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

Концентрація показника у першій віковій групі достовірно не змінилася, а в старшій знизилась на 15 % у лімфобластах (див. табл. 5.2).

Таблиця 5.2 – Концентрація TLR2 (O<sub>1Ф</sub>) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m).

Серії	TLR2 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR2 <sup>+</sup> середні лімф.	TLR2 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,644±0,019	0,312±0,006	0,148±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,576±0,020 <sup>1</sup>	0,299±0,004	0,136±0,003 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,543±0,017	0,292±0,005	0,132±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,659±0,016 <sup>1</sup>	0,302±0,005	0,132±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,513±0,022 <sup>2</sup>	0,298±0,005	0,135±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,520±0,017 <sup>2</sup>	0,289±0,008	0,128±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	0,529±0,020	0,307±0,005	0,144±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	0,562±0,026 <sup>2</sup>	0,303±0,006	0,134±0,003

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

У **мозкових тяжях** кількість TLR2-позитивних клітин у тварин 1 місяця зменшилась на 22 % з перерозподілом окремих підкласів лімфоцитів: зниження лімфобластів на 76 % та збільшення малих лімфоїдних клітин на 53 %. У 6-місячних тварин спостерігалось збільшення малих лімфоцитів на 22 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.1–5.4, див. табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Кількість TLR2<sup>+</sup>- клітин в мозкових тяжках БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	TLR2 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR2 <sup>+</sup> середні лімф.	TLR2 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	29±2	<u>2±0</u> 6,2±1,5 %	<u>7±1</u> 23,1±2,5 %	<u>20±2</u> 70,7±5,8 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	51±3 <sup>1</sup>	<u>25±2<sup>1</sup></u> 49,2±3,7 %	<u>11±1<sup>1</sup></u> 21,2±2,7 %	<u>15±2<sup>1</sup></u> 29,6±3,0 %
контроль – 6 міс	34±2	<u>5±1</u> 14,6±1,8 %	<u>14±1</u> 39,7±2,9 %	<u>16±1</u> 45,7±4,2 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	39±2	<u>7±1</u> 17,1±1,7 %	<u>15±1</u> 38,1±2,6 %	<u>18±1</u> 44,8±3,6 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	43±2	<u>10±1<sup>2</sup></u> 22,0±2,0 %	<u>14±1<sup>2</sup></u> 33,2±2,6 %	<u>19±1<sup>2</sup></u> 44,7±3,2 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	35±2	<u>6±1</u> 17,9±2,0 %	<u>11±1<sup>2</sup></u> 32,6±3,5 %	<u>17±2</u> 49,5±4,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	40±3 <sup>2</sup>	<u>6±1<sup>2</sup></u> 15,4±3,2 %	<u>10±1</u> 25,7±2,7 %	<u>23±2<sup>2</sup></u> 58,9±4,9 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	41±2	<u>6±1</u> 15,7±2,1 %	<u>12±1</u> 29,6±3,0 %	<u>22±2<sup>2</sup></u> 54,6±5,2 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

При цьому концентрація показника у першій віковій групі в лімфобластах знизилась на 12 %, а в малих лімфоцитах зросла на 14 %. У старших щурів мало місце зростання концентрації показника на 8 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.4).

Таблиця 5.4 – Концентрація TLR2 (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m).

Серії	TLR2 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR2 <sup>+</sup> середні лімф.	TLR2 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,465±0,022	0,308±0,005	0,169±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,688±0,019 <sup>1</sup>	0,319±0,005	0,147±0,004 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,509±0,013	0,325±0,003	0,154±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,581±0,015 <sup>1</sup>	0,322±0,002	0,161±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,576±0,013 <sup>2</sup>	0,327±0,003	0,156±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,630±0,032	0,309±0,004 <sup>2</sup>	0,162±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	0,605±0,020 <sup>2</sup>	0,309±0,003	0,167±0,002 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	0,534±0,017 <sup>2</sup>	0,330±0,004	0,164±0,003

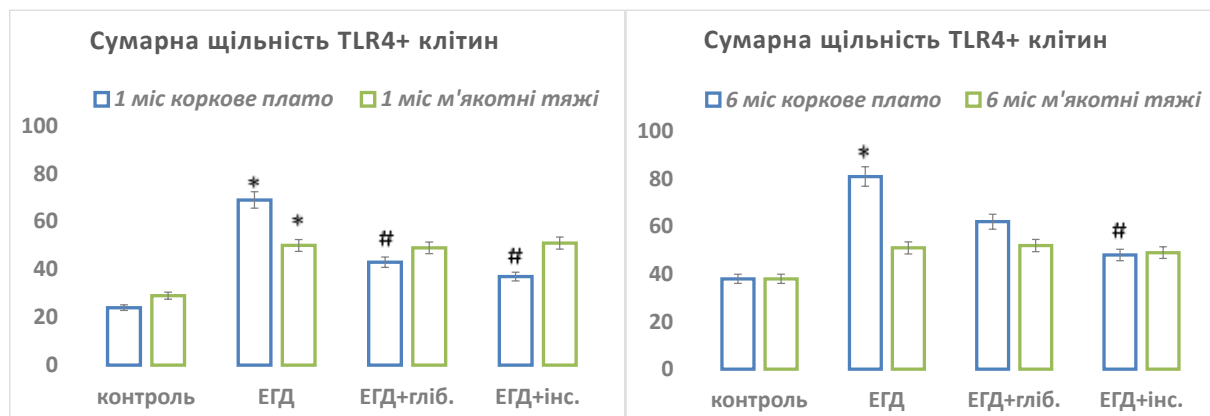
Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

## 5.2 Характер розподілу TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах

### 5.2.1 Особливості експресії TLR4 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.

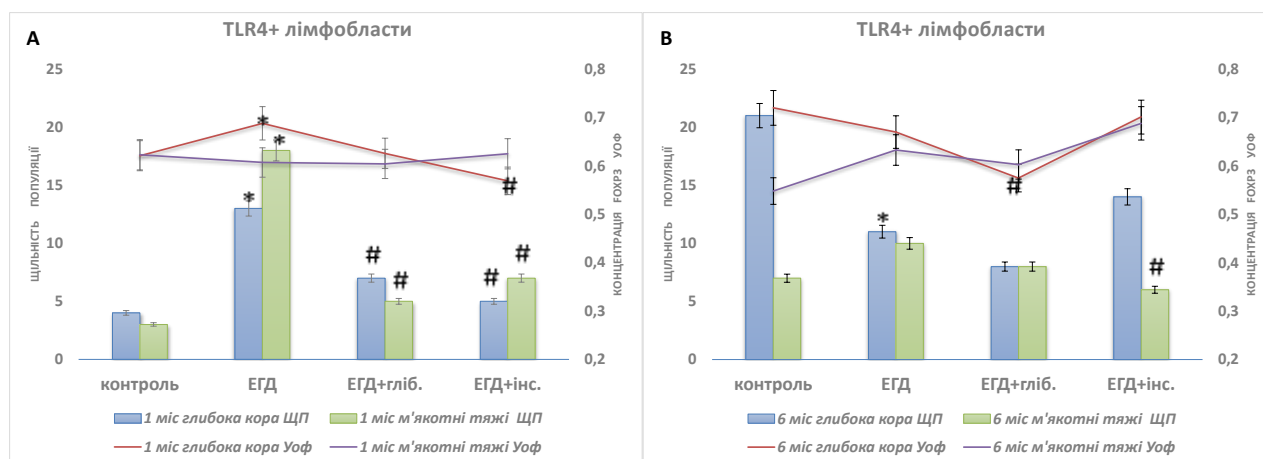
Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4 показав наступне. Сумарна щільність TLR4-позитивних лімфоцитів коркового плато у контрольної групи тварин віком 1 місяць становила 24±3 на 1мм<sup>2</sup>, а у нащадків щурів з ЕГД 69±8 на 1мм<sup>2</sup>, тобто

збільшена в 2,9 раз за рахунок рівномірного збільшення всіх підкласів: лімфобласти в 3,3 рази, середніх лімфоцитів в 3,7 разів, малих в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.5–5.8, табл. 5.5).



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.5 – Сумарна щільність (на  $1\text{ мм}^2$ ) TLR4 імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

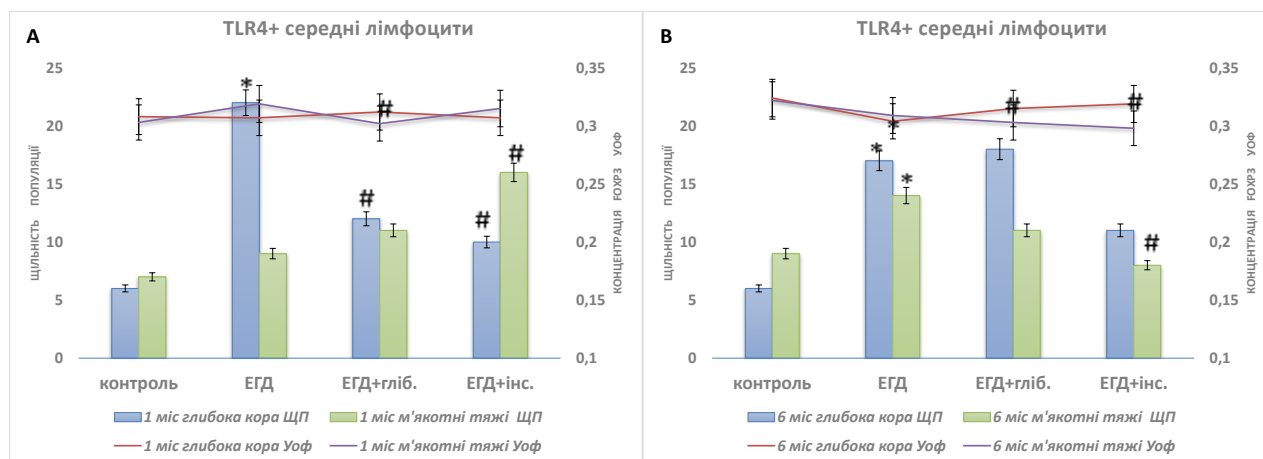


Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.6 – Щільність TLR4 імунопозитивних лімфобластів (на  $1\text{ мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

В наступній віковій групі спостерігалось збільшення загального числа позитивних лімфоцитів (в 2,1 рази) за рахунок середніх (в 2,8 разів) і малих клітин (в 4,8 рази), лімфобласти дещо зменшилися (на 48 %) ( $p < 0,05$ ).

Достовірних змін концентрації TLR4 у лімфоїдних клітинах тварин віком 1 місяця не відбулося, а у 6-місячних концентрація показника незначно зменшилася, на 6 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.6).



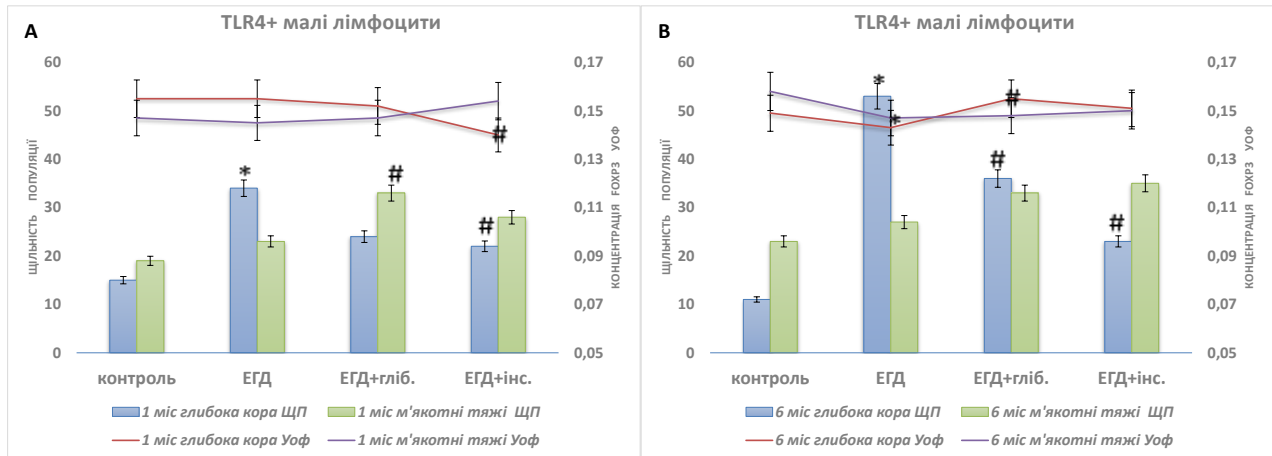
Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.7 – (А, В) Щільність TLR4 імунопозитивних середніх лімфоцитів (на  $1\text{мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Що стосується змін, що відбувалися в **мозкових тяжках** лімфатичних вузлів, то сумарна щільність TLR4 в лімфоїдних клітинах 1-місячних тварин зросла на 72 %, за рахунок лімфобластів – у 6 раз. У більш старших тварин сумарна щільність позитивних до TLR4 лімфоцитів не змінилася, але кількість позитивних середніх лімфоцитів зросла на 56 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.5–5.8, табл. 5.3).

Концентрація TLR4 у 1-місячних тварин виявилася незмінною, а у 6-місячних спостерігалось зниження її у малих лімфоцитах на 7 % (табл. 5.8).





Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.8 – (А, В) Щільність TLR4 імунопозитивних малих лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

### 5.2.2 Особливості експресії TLR4 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4 дав наступні результати. У **корковому плато** 1-місячних тварин цієї групи спостерігалось зниження сумарної щільності на 38 % за рахунок лімфобластів (на 46 %) і середніх лімфоцитів (на 45 %). У щурів старшої групи було зафіксовано достовірне зниження кількості малих лімфоцитів на 32 % (див. рис. 5.5–5.8, див. табл. 5.5).

Таблиця 5.5 – Кількість TLR4<sup>+</sup>-клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	TLR4 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR4 <sup>+</sup> середні лімф.	TLR4 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	24±3	<u>4±1</u> 16,9±3,6 %	<u>6±1</u> 23,1±3,5 %	<u>15±2</u> 60,0±8,1 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	69±8 <sup>1</sup>	<u>13±2<sup>1</sup></u> 19,0±2,8 %	<u>22±3<sup>1</sup></u> 32,3±3,9 %	<u>34±4<sup>1</sup></u> 48,8±6,5 %
контроль – 6 міс	38±3	<u>21±2</u> 55,4±4,5 %	<u>6±1</u> 15,4±3,3 %	<u>11±1</u> 29,2±4,0 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	81±9 <sup>1</sup>	<u>11±2<sup>1</sup></u> 13,2±1,9 %	<u>17±2<sup>1</sup></u> 21,0±2,8 %	<u>53±6<sup>1</sup></u> 65,8±7,6 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	43±4 <sup>2</sup>	<u>7±1<sup>2</sup></u> 16,9±2,7 %	<u>12±1<sup>2</sup></u> 28,3±3,3 %	<u>24±3</u> 54,8±6,3 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	62±5	<u>8±1</u> 13,6±2,0 %	<u>18±2</u> 29,1±3,0 %	<u>36±3<sup>2</sup></u> 57,3±4,9 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	37±2 <sup>2</sup>	<u>5±1<sup>2</sup></u> 13,5±0,9 %	<u>10±1<sup>2</sup></u> 26,3±1,5 %	<u>22±2<sup>2</sup></u> 60,2±2,7 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	48±6 <sup>2</sup>	<u>14±2</u> 29,0±3,2 %	<u>11±2</u> 22,4±3,9 %	<u>23±4<sup>2</sup></u> 48,7±6,0 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

Що стосується концентрації TLR4, то в першій віковій групі достовірних змін не відбулося, а в другій спостерігалось її зниження в лімфобластах на 14 % та підвищення в середніх і малих лімфоцитах (на 4 % і на 8 %) відповідно ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.6).

Таблиця 5.6 – Концентрація TLR4 ( $O_{1\phi}$ ) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	TLR4+ лімфобласти	TLR4+ середні лімфоцити	TLR4+ малі лімфоцити
контроль – 1 міс	0,621±0,029	0,308±0,005	0,155±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,688±0,040	0,307±0,004	0,155±0,003
контроль – 6 міс	0,720±0,019	0,324±0,007	0,149±0,005
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,670±0,036	0,304±0,004 <sup>1</sup>	0,143±0,002
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,626±0,030	0,312±0,005	0,152±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,575±0,024 <sup>2</sup>	0,315±0,004 <sup>2</sup>	0,155±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	0,569±0,021 <sup>2</sup>	0,307±0,003	0,140±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	0,701±0,028	0,319±0,006 <sup>2</sup>	0,151±0,004

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

У **мозкових тяжях** лімфатичних вузлів тварин віком 1 місяця із досліджуваної групи не було зафіксовано значущих змін сумарної щільності. Було зниження кількості лімфобластів на 72 % і підвищення малих лімфоцитів на 43 % ( $p < 0,05$ ). У старшій групі достовірних змін не відбулося (див. рис. 5.5–5.8, див. табл. 5.7).

Концентрація TLR4 у 1-місячних щурів знизилася на 5 % у середніх лімфоцитах, а у 6-місячних залишилася незмінною (див. табл. 5.8).

Таблиця 5.7 – Кількість TLR4<sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжках БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	TLR4 <sup>+</sup> лімфобласти	TLR4 <sup>+</sup> середні лімф	TLR4 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	29±4	<u>3±1</u> 11,0±2,6 %	<u>7±1</u> 24,2±4,7 %	<u>19±3</u> 64,8±11,0 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	50±4 <sup>1</sup>	<u>18±2<sup>1</sup></u> 36,4±4,3 %	<u>9±1</u> 18,3±2,3 %	<u>23±2</u> 45,3±4,7 %
контроль – 6 міс	38±4	<u>7±1</u> 17,2±3,6 %	<u>9±1</u> 22,5±3,4 %	<u>23±3</u> 60,3±7,9 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	51±6	<u>10±2</u> 20,1±3,1 %	<u>14±2<sup>1</sup></u> 26,9±3,2 %	<u>27±4</u> 53,0±8,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	49±4	<u>5±1<sup>2</sup></u> 11,1±1,8 %	<u>11±1</u> 22,2±2,6 %	<u>33±3<sup>2</sup></u> 66,8±7,0 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	52±7	<u>8±1</u> 15,1±2,4 %	<u>11±2</u> 21,6±3,1 %	<u>33±4</u> 63,3±8,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	51±4	<u>7±1<sup>2</sup></u> 14,4±2,1 %	<u>16±2<sup>2</sup></u> 31,6±3,6 %	<u>28±3</u> 54,0±5,2 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	49±4	<u>6±1<sup>2</sup></u> 11,6±1,7 %	<u>8±1<sup>2</sup></u> 16,3±2,6 %	<u>35±4</u> 72,2±6,8 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

**5.2.3 Особливості експресії TLR4 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, які отримували пероральний інсулін.**

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до TLR4 було проаналізовано з отриманням наступних результатів. У **корковому плато**

1-місячних тварин цієї групи спостерігається зниження сумарної щільності позитивних клітин на 46 % за рахунок рівномірного зниження числа лімфоїдних клітин: лімфобластів на 62 %, середніх лімфоцитів на 55 %, малих на 35 % ( $p < 0,05$ ). У щурів 6 місяців було зафіксовано достовірне зниження сумарної щільності на 41 % за рахунок малих лімфоцитів (на 57 %) (див. рис. 5.5–5.8, див. табл. 5.5).

Таблиця 5.8 – Концентрація TLR4 (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	TLR4+ лімфобласти	TLR4+ середні лімфоцити	TLR4+ малі лімфоцити
контроль – 1 міс	0,623±0,080	0,303±0,009	0,147±0,005
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,607±0,014	0,319±0,005	0,145±0,003
контроль – 6 міс	0,548±0,031	0,322±0,007	0,158±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,633±0,040	0,309±0,005	0,147±0,004 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,604±0,030	0,302±0,005 <sup>2</sup>	0,147±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,603±0,024	0,303±0,005	0,148±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	0,625±0,037	0,315±0,004	0,154±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	0,688±0,073	0,298±0,009	0,150±0,004

Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

Спостерігається зниження концентрації TLR4 в лімфобластах на 17 % і малих лімфоцитах на 10 % в першій віковій групі тварин. Та підвищення концентрації в середніх лімфоцитах на 5 % в старшій ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.6).

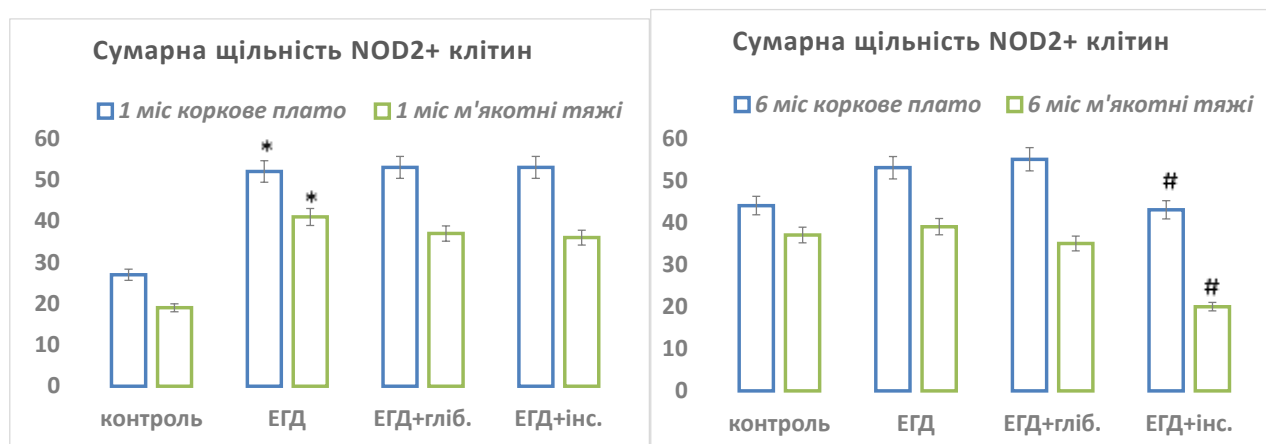
В **мозкових тяжах** 1-місячних тварин цієї групи спостерігалось зниження числа лімфобластів на 61 % і підвищення кількості середніх лімфоцитів на 78 %, а у 6-місячних відбувалося зменшення кількості лімфобластів на 40 % і середніх лімфоцитів на 43 % без зміни сумарної щільності ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.5–5.8, див. табл. 5.7). Достовірно значущих змін концентрації в обох вікових категоріях зафіксовано не було (див. табл. 5.8).

### **5.3 Зміни розподілу NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах**

#### **5.3.1 Особливості експресії NOD2 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету**

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до NOD2 показав наступне: сумарна щільність NOD2-позитивних клітин коркового плато нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця підвищилась на 93 % за рахунок рівномірного збільшення усіх груп лімфоїдних клітин. Кількість імунопозитивних лімфобластів зроста на 71 %, середніх лімфоцитів на 67 %, малі – в 2 рази. Показник сумарної щільності клітин у тварин цієї групи віком 6 місяців достовірно не збільшився. Має місце ізольоване збільшення малих лімфоцитів на 93 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.9–5.12, табл. 5.9).

Концентрація показника достовірно не змінилась у першій віковій групі. У віці 6 місяців спостерігаємо зниження концентрації показника у середніх – на 8 %, та малих лімфоцитах – на 10 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.10).



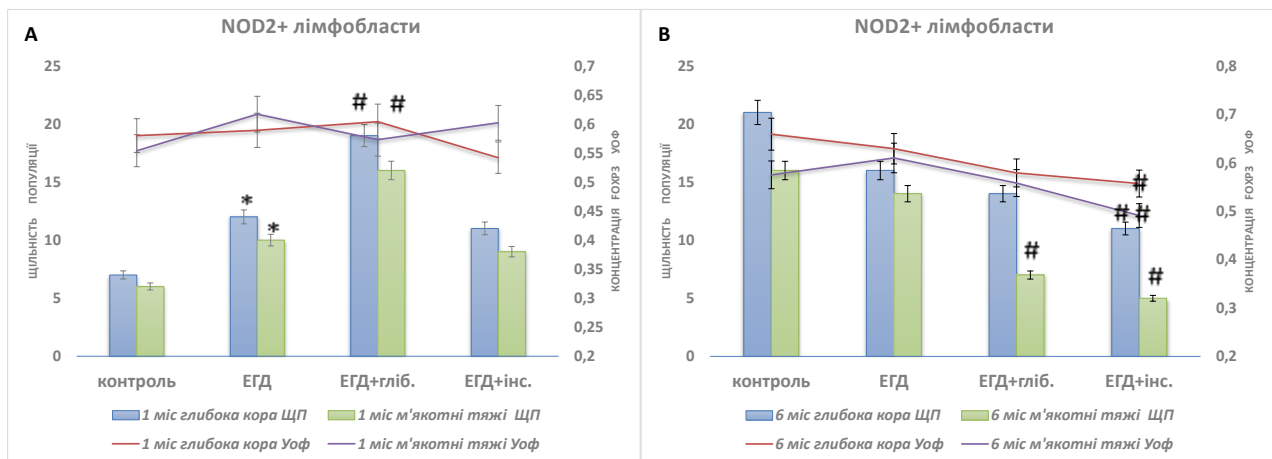
Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.9 – Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) NOD2 імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Що стосується сумарної щільності NOD2-позитивних клітин **мозкових тяжів** нащадків щурів з ЕГД у віці 1 місяця, то були отримані наступні результати: підвищена сумарна щільність позитивних клітин в 2,2 рази за рахунок рівномірного зростання усіх груп лімфоцитів. Кількість лімфобластів зросла на 67 %, середніх лімфоцитів в 2 рази, малих – в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.1–5.4, табл. 5.3). Показник загальної щільності клітин у зазначеній підгрупі тварин віку 6 місяців достовірно не збільшився. Але має місце збільшення малих лімфоцитів на 70 % та зниження середніх – на 27 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.9–5.12, табл. 5.11).

Достовірних змін концентрації NOD2 в **мозкових тяжах** у віці 1 місяця не виявлено.

У 6-місячних щурів спостерігається збільшення концентрації показника в середніх – на 6 % та малих лімфоцитах – на 13 % (табл. 5.12).



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.10 – Щільність імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

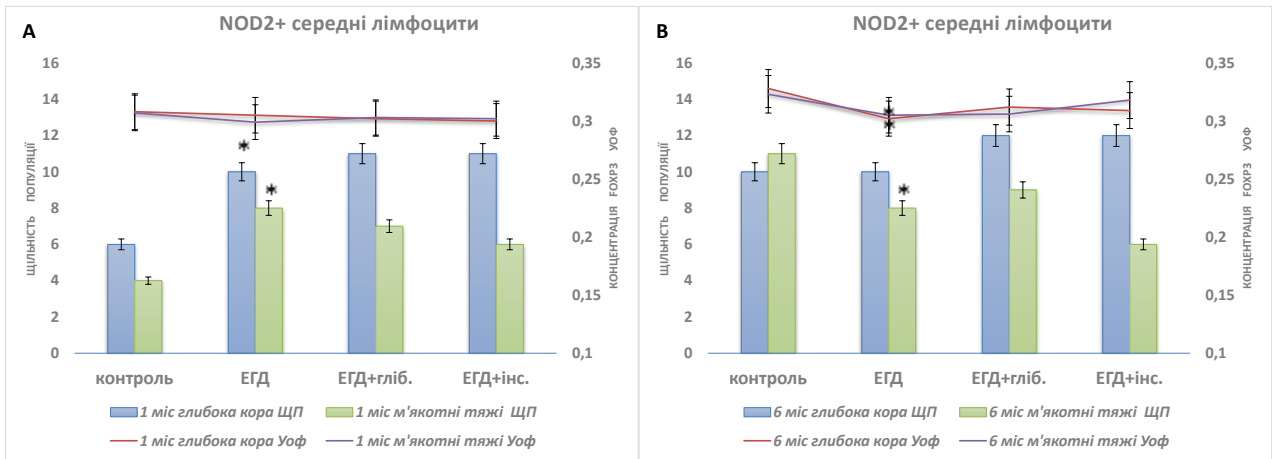
### 5.3.2 Особливості експресії NOD2 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до NOD2 дав наступні результати. В **корковому плато** 1-місячних щурів сумарна щільність не змінена. Спостерігається достовірне збільшення числа лімфоцитів на 58%. У віці 6 місяців достовірних змін кількості лімфоцитів досліджуваної групи тварин не виявлено (див. рис. 5.9–5.12, див. табл. 5.9).

Концентрація NOD2 в корковому плато у 1-місячних щурів була дещо знижена лише в малих лімфоцитах – на 6% ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.10).

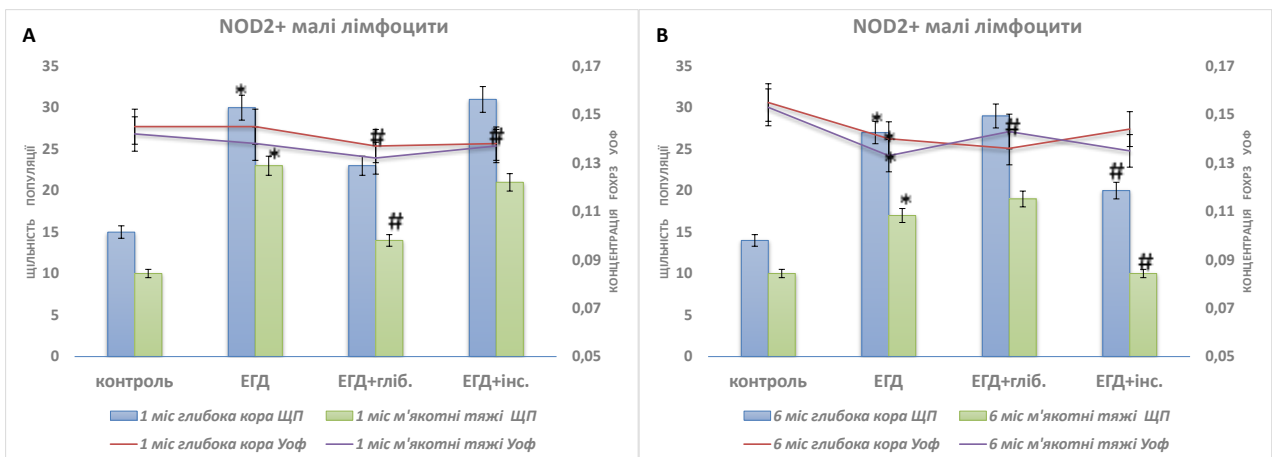
У 6-місячних тварин досліджуваної групи концентрація NOD2 достовірно не змінилася.





Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до EGJ (#).

Рисунок 5.11 – Щільність NOD2 імунопозитивних середніх лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після EGJ, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до EGJ (#).

Рисунок 5.12 – (А, В) Щільність NOD2 імунопозитивних малих лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після EGJ, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Аналіз змін показника у **мозкових тяжах** тварин віком 1 місяць показав відсутність достовірних змін сумарної щільності, але мало місце збільшення числа лімфобластів на 60 % та зниження малих лімфоцитів на 39 %. У 6-місячних

тварин сумарна щільність також була достовірно не змінена при зменшенні числа лімфобластів на 50 % (див. рис. 5.9–5.12, див. табл. 5.11).

Таблиця 5.9 – Кількість NOD2<sup>+</sup>-клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	NOD2 <sup>+</sup> лімфобласти	NOD2 <sup>+</sup> середні лімф.	NOD2 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	27±3	<u>7±1</u> 24,9±3,8 %	<u>6±1</u> 21,2±2,9 %	<u>15±2</u> 53,9±6,0 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	52±5 <sup>1</sup>	<u>12±2<sup>1</sup></u> 22,4±3,4 %	<u>10±1<sup>1</sup></u> 19,5±2,6 %	<u>30±3<sup>1</sup></u> 58,1±5,9 %
контроль – 6 міс	44±4	<u>21±2</u> 47,4±5,3 %	<u>10±1</u> 21,7±2,6 %	<u>14±1</u> 30,9±3,3 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	53±4	<u>16±2</u> 30,6±3,3 %	<u>10±1</u> 18,8±1,9 %	<u>27±2<sup>1</sup></u> 50,6±4,3 %
нащадки щурів з ЕГД + Глібенкламід – 1 міс	53±5	<u>19±2<sup>2</sup></u> 36,8±4,2 %	<u>11±1</u> 20,0±2,4 %	<u>23±2</u> 43,2±4,6 %
нащадки щурів з ЕГД + Глібенкламід – 6 міс	55±5	<u>14±2</u> 25,5±3,3 %	<u>12±1</u> 22,2±2,6 %	<u>29±3</u> 52,3±4,9 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	53±5	<u>11±1</u> 21,0±2,4 %	<u>11±1</u> 20,3±2,2 %	<u>31±3</u> 58,7±6,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	43±2 <sup>2</sup>	<u>11±2<sup>2</sup></u> 26,4±2,8 %	<u>12±1</u> 27,4±1,9 %	<u>20±2<sup>2</sup></u> 46,2±3,2 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

Достовірних змін концентрації NOD2 у 1-місячних тварин не спостерігається. У 6-місячних має місце невелике збільшення концентрації в малих лімфоцитах – на 8 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 5.12).

Таблиця 5.10 – Концентрація NOD2 (O<sub>1Ф</sub>) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m)

Серії	NOD2+ лімфобласти	NOD2+ середні лімф.	NOD2+ малі лімф.
контроль – 1 міс	0,580±0,026	0,308±0,005	0,145±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,589±0,016	0,305±0,005	0,145±0,003
контроль – 6 міс	0,659±0,016	0,328±0,004	0,155±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,629±0,021	0,302±0,005 <sup>1</sup>	0,140±0,003 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,604±0,013	0,302±0,004	0,137±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,579±0,021	0,312±0,004	0,136±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,542±0,017	0,300±0,004	0,138±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,557±0,017 <sup>2</sup>	0,309±0,005	0,144±0,004

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

Таблиця 5.11 – Кількість NOD2<sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин.

Серії	Сумарна щільність	NOD2 <sup>+</sup> лімфобласти	NOD2 <sup>+</sup> середні лімф.	NOD2 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	19±2	<u>6±1</u> 28,8±4,0 %	<u>4±1</u> 19,4±3,2 %	<u>10±1</u> 51,8±6,7 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	41±3 <sup>1</sup>	<u>10±1<sup>1</sup></u> 24,3±3,3 %	<u>8±1<sup>1</sup></u> 19,0±2,1 %	<u>23±2<sup>1</sup></u> 56,7±5,6 %
контроль – 6 міс	37±3	<u>16±2</u> 44,0±4,7 %	<u>11±1</u> 29,6±3,2 %	<u>10±1</u> 26,4±2,9 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	39±3	<u>14±2</u> 36,4±4,4 %	<u>8±1<sup>1</sup></u> 19,8±2,1 %	<u>17±2<sup>1</sup></u> 43,9±5,3 %
нащадки щурів з ЕГД + Глібенкламід – 1 міс	37±2	<u>16±2<sup>2</sup></u> 43,6±4,1 %	<u>7±1</u> 19,0±2,2 %	<u>14±1<sup>2</sup></u> 37,4±3,9 %
нащадки щурів з ЕГД + Глібенкламід – 6 міс	35±3	<u>7±1<sup>2</sup></u> 20,5±3,0 %	<u>9±1</u> 26,7±3,2 %	<u>19±2</u> 52,8±5,3 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	36±4	<u>9±1</u> 25,2±3,2 %	<u>6±1</u> 17,3±2,5 %	<u>21±3</u> 57,4±8,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	20±2 <sup>2</sup>	<u>5±1<sup>2</sup></u> 23,1±2,2 %	<u>6±1</u> 28,7±2,4 %	<u>10±1<sup>2</sup></u> 48,2±3,9 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

**5.3.3 Особливості експресії NOD2 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, які отримували пероральний інсулін.**

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадкіна в щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до NOD2 було

проаналізовано з отриманням наступних результатів. В **корковому плато** 1-місячних тварин не було зафіксовано достовірних змін, а у наступній віковій групі спостерігали достовірне зниження сумарної щільності на 19 % за рахунок лімфобластів (на 31 %) та малих лімфоцитів (на 26 %) (див. рис. 5.9–5.12, див. табл. 5.9).

Таблиця 5.12 – Концентрація NOD2 (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ )

Серії	NOD2+ лімфобласти	NOD2+ середні лімф.	NOD2+ малі лімф.
контроль – 1 міс	0,554±0,025	0,307±0,010	0,142±0,005
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,617±0,027	0,299±0,007	0,138±0,003
контроль – 6 міс	0,575±0,014	0,323±0,004	0,153±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,610±0,021	0,305±0,006 <sup>1</sup>	0,133±0,004 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Глібенкламід – 1 міс	0,573±0,015	0,303±0,006	0,132±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Глібенкламід – 6 міс	0,558±0,032	0,306±0,006	0,143±0,004 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,602±0,027	0,302±0,008	0,137±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,491±0,020 <sup>2</sup>	0,318±0,008	0,135±0,005

Примітка. достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

При цьому концентрація у корковому плато змінювалася наступним чином: у першій віковій групі спостерігалось ізольоване зменшення концентрації

показника в малих лімфоцитах на 5 %, у наступній віковій групі було зафіксовано зменшення концентрації параметра у лімфобластах на 11 % (див. табл. 5.10).

В **мозкових тяжях** загальна кількість позитивних клітин у 1-місячних щурів достовірно не змінювалась. У тварин віком 6 місяців спостерігалось зниження сумарної щільності на 49 % за рахунок лімфобластів – на 64 % та малих лімфоцитів – на 41 % (див. рис. 5.9–5.12, див. табл. 5.11).

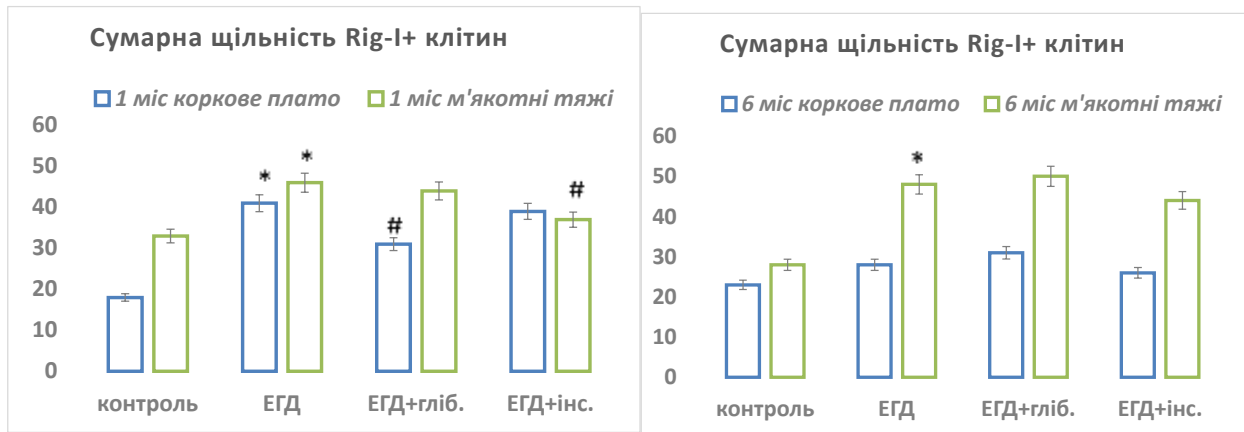
Концентрація NOD2 в молодшій віковій групі достовірно не змінювалась, а у старшій спостерігалось зниження концентрації показника у лімфобластах на 20 % (див. табл. 5.12).

#### **5.4 Зміни розподілу RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах**

**5.4.1 Особливості експресії RIG-I в корковому плато та мозкових тяжях брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.**

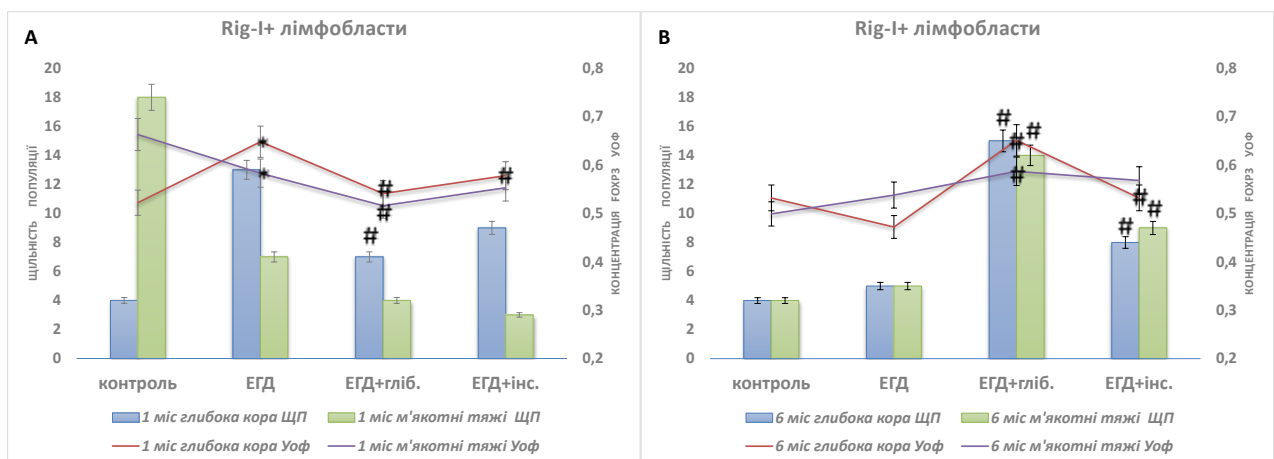
Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до RIG-I показав такі результати.

В контрольній групі 1-місячних щурів сумарна щільність RIG-I-позитивних клітин в корковому плато складала  $18 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$ , а у нащадків щурів з ЕГД цей показник склав  $41 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$ , тобто зріс в 2,3рази. Це зростання відбулося за рахунок лімфобластів – в 3,3 рази та малих лімфоцитів – в 2,4 рази. В групі 6-місячних тварин значення сумарної щільності в групі контролю та нащадків щурів з ЕГД склало  $23 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$  та  $28 \pm 4$  на  $1 \text{ мм}^2$  відповідно, що не склало достовірної різниці (рис. 5.13–5.16, табл. 5.13).



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.13 – Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) RIG-I імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.



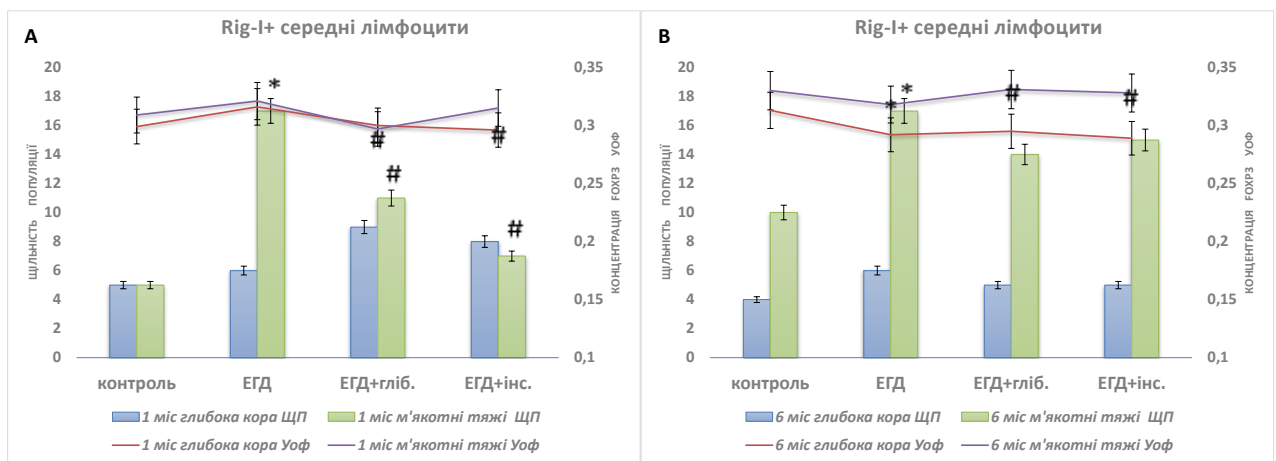
Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.14 – (А, В) Щільність RIG-I імунопозитивних лімфобластів (на  $1\text{мм}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Що стосується концентрації RIG-I, то в першій віковій групі достовірне підвищення спостерігається лише в лімфобластних клітинах – на 24 %, а у старших щурів достовірних змін не виявлено (табл. 5.14).

В мозкових тяжках 1-місячних щурів спостерігалось зростання кількості RIG-I лімфоцитів на 39 %. Збільшення показника відбулося за рахунок середніх – в 3,4 рази, і малих лімфоцитів – в 2,2 рази. При цьому кількість лімфобластів зменшилася на 61 %. У 6 місяців зберігається збільшення кількості RIG-I лімфоцитів на 71 %. Знову ж за рахунок середніх і малих форм (на 70 % і на 86 % відповідно) ( $p < 0,05$ ). Кількість лімфобластів не відрізняється від даних контрольної групи (див. рис. 5.13–5.16, табл. 5.15).

Концентрація RIG-I у першій віковій групі достовірно значуще змінилася в лімфобластах – зменшилась на 12 %; і малих лімфоцитах – збільшилась на 14 %. У старших щурів спостерігалось зниження концентрації RIG-I в середніх лімфоцитах на 4 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 5.16).



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.15 – (А, В) Щільність RIG-I імунопозитивних середніх лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламідів вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.



**5.4.2 Особливості експресії RIG-I в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам.**

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до RIG-I дав наступні результати.

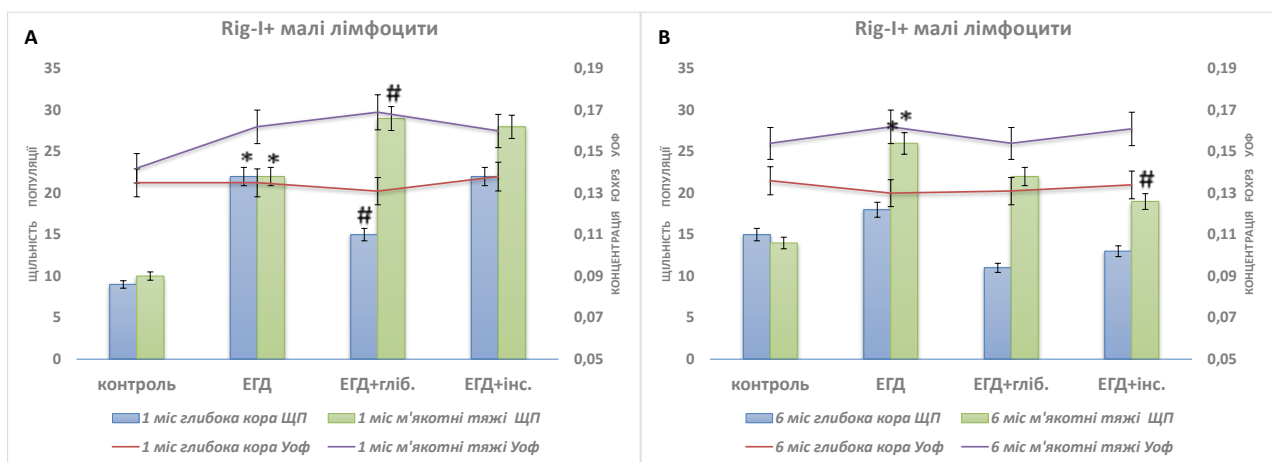
Таблиця 5.13 – Кількість RIG-I<sup>+</sup>-клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	RIG-I <sup>+</sup> лімфобласти	RIG-I <sup>+</sup> середні лімф.	RIG-I <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	18±2	<u>4±1</u> 24,4±3,7 %	<u>5±1</u> 25,6±4,1 %	<u>9±1</u> 50,0±7,3 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	41±3 <sup>1</sup>	<u>13±2<sup>1</sup></u> 31,6±4,2 %	<u>6±1</u> 15,1±2,1 %	<u>22±2<sup>1</sup></u> 53,2±4,5 %
контроль – 6 міс	23±2	<u>4±1</u> 16,8±3,5 %	<u>4±1</u> 18,2±3,2 %	<u>15±2</u> 65,0±7,1 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	28±4	<u>5±1</u> 16,8±3,2 %	<u>6±1</u> 20,5±3,1 %	<u>18±3</u> 62,6±10,7 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	31±3 <sup>2</sup>	<u>7±1<sup>2</sup></u> 22,4±3,7 %	<u>9±1</u> 28,4±3,6 %	<u>15±2<sup>2</sup></u> 49,2±5,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	31±3	<u>15±2<sup>2</sup></u> 47,4±5,0 %	<u>5±1</u> 16,0±2,3 %	<u>11±1</u> 36,6±4,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	39±4	<u>9±1</u> 23,6±4,4 %	<u>8±1</u> 21,3±3,7 %	<u>22±3</u> 55,1±8,4 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	26±2	<u>8±1<sup>2</sup></u> 29,2±3,3 %	<u>5±1</u> 19,5±2,1 %	<u>13±2</u> 51,3±4,9 %

Примітка.; достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

У 1-місячних щурів сумарна щільність RIG-I-позитивних клітин в **корковому плато** достовірно знизилася (на 24 %). За рахунок лімфобластів (на 46 %) і малих лімфоцитів (на 32 %) ( $p < 0,05$ ). В старшій віковій групі сумарна щільність не змінилася, але є збільшення кількості лімфобластів: в 3 рази ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.13–5.16, див. табл. 5.13).

При цьому концентрація RIG-I у 1-місячних тварин знизилась на 17 % в лімфобластах. В віці 6 місяців спостерігалось підвищення концентрації в лімфобластах на 38 % (див. табл. 5.14).



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 5.16 – (А, В) Щільність RIG-I імунопозитивних малих лімфоцитів (на  $1 \text{ mm}^2$ ) в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламіду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Сумарна щільність RIG-I-позитивних лімфоцитів в **мозкових тяжках** залишилась незмінною. Хоча зафіксовано в зміни окремих підкласах лімфоїдних клітин. Зниження лімфобластів (на 43 %) і середніх лімфоцитів (на 35 %), а також збільшення кількості малих форм (на 32 %). В 6 місяців також загальна кількість достовірно незмінна, а лімфобласти були збільшені в 2,8 рази (див. рис. 5.13–5.16, див. табл. 5.15).

### 5.4.3 Особливості експресії RIG-I в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували інсулін перорально, попередньо інкубовані з МКАТ до RIG-I було проаналізовано з отриманням наступних результатів.

Таблиця 5.14 – Концентрація RIG-I (ОІФ) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m)

Серії	RIG-I+ лімфобласти	RIG-I+ середні лімфоцити	RIG-I+ малі лімфоцити
контроль – 1 міс	0,522±0,021	0,299±0,008	0,135±0,005
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,648±0,023 <sup>1</sup>	0,316±0,007	0,135±0,003
контроль – 6 міс	0,532±0,031	0,313±0,009	0,136±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,472±0,022	0,292±0,007	0,130±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,541±0,025 <sup>2</sup>	0,300±0,006	0,131±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,651±0,018 <sup>2</sup>	0,295±0,006	0,131±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	0,578±0,023 <sup>2</sup>	0,296±0,006 <sup>2</sup>	0,138±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	0,532±0,020 <sup>2</sup>	0,289±0,007	0,134±0,004

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

У 1-місячних щурів в **мозкових тяжах** спостерігалось достовірно зменшення сумарної щільності RIG-I<sup>+</sup> на 20 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.13–5.16, див. табл. 5.15).

Таблиця 5.15 – Кількість RIG-I<sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	RIG-I <sup>+</sup> лімфобласти	RIG-I <sup>+</sup> середні лімф.	RIG-I <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	33±3	<u>18±1</u> 54,7±4,4 %	<u>5±1</u> 14,0±2,3 %	<u>10±1</u> 31,3±4,2 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	46±3 <sup>1</sup>	<u>7±1<sup>1</sup></u> 15,3±1,9 %	<u>17±1<sup>1</sup></u> 36,7±2,6 %	<u>22±2<sup>1</sup></u> 48,0±4,3 %
контроль – 6 міс	28±2	<u>4±1</u> 12,9±1,8 %	<u>10±1</u> 37,5±3,3 %	<u>14±1</u> 49,6±4,7 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	48±3 <sup>1</sup>	<u>5±1</u> 9,9±1,4 %	<u>17±1<sup>1</sup></u> 35,3±2,9 %	<u>26±2<sup>1</sup></u> 54,8±5,0 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	44±3	<u>4±1<sup>2</sup></u> 9,1±1,4 %	<u>11±1<sup>2</sup></u> 24,9±2,4 %	<u>29±2<sup>2</sup></u> 66,0±5,0 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	50±3	<u>14±1<sup>2</sup></u> 28,4±2,4 %	<u>14±1</u> 27,4±2,6 %	<u>22±2</u> 44,2±4,0 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	37±3 <sup>2</sup>	<u>3±0<sup>2</sup></u> 7,0±0,8 %	<u>7±1<sup>2</sup></u> 18,2±1,8 %	<u>28±2</u> 74,8±4,9 %
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	44±3	<u>9±1<sup>2</sup></u> 21,4±1,6 %	<u>15±1</u> 34,5±2,2 %	<u>19±1<sup>2</sup></u> 44,0±3,0 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

Таблиця 5.16 - Концентрація RIG-I (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m).

Серії	RIG-I <sup>+</sup> лімфобласти	RIG-I <sup>+</sup> середні лімфоцити	RIG-I <sup>+</sup> малі лімфоцити
контроль – 1 міс	0,663±0,019	0,309±0,008	0,142±0,005
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,583±0,025 <sup>1</sup>	0,321±0,003	0,162±0,003 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,499±0,018	0,330±0,004	0,154±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,538±0,016	0,318±0,003 <sup>1</sup>	0,162±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,516±0,017 <sup>2</sup>	0,297±0,003 <sup>2</sup>	0,169±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,587±0,016 <sup>2</sup>	0,331±0,004 <sup>2</sup>	0,154±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інс. 1 міс	0,553±0,028	0,315±0,005	0,160±0,002
нащадки щурів з ЕГД + Інс. – 6 міс	0,568±0,017	0,328±0,003 <sup>2</sup>	0,161±0,003

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що:

1. Пренатальна гіперглікемія призводить до збільшення кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-клітин в БЛВ у нащадків, здебільшого в перший місяць життя, та змінює щільність ПРР на імунних клітинах.

2. В процесі формування оральної толерантності до інсуліну у корковому плато БЛВ 1-місячних нащадків щурів з ЕГД зменшується чисельність TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-клітин, а в мозкових тяжях – TLR2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів. Динаміка зменшення кількості імунопозитивних до ПРР клітин у корковому плато БЛВ зберігається до 6-місячного віку, це супроводжується зменшенням щільності

мембранних і концентрації цитоплазматичних РВІ обох вікових групах, особливо виражено у лімфобластів.

3. Введення глібенкламіду вагітним самкам зменшують у корковому плато БЛВ 1-місячних щурів кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів, у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-клітин, та взагалі не впливають на їх чисельність у мозкових тяжках, переважно зменшують щільність PPP на імунопозитивних лімфоцитах БЛВ на ранніх термінах спостереження.

Ці результати вказують на те, що TLR2- і TLR4-опосередкована сигналізація є однією з важливих ланок патогенезу ЕГД. Щодо виявленого збільшення кількості NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, то це може свідчити, що не лише мембранні толл-подібні рецептори, але і цитоплазматичні сенсори вродженої імунної системи можуть грати важливу роль у патогенезі імунних порушень у них.

Результати наведених в даному розділі досліджень представлені в науковій публікації автора [139].

## РОЗДІЛ 6

### ВИВЧЕННЯ КЛІТИННОГО СКЛАДУ СУБПОПУЛЯЦІЙ Т-ХЕЛПЕРІВ Т- $\text{bet}^+$ (TH1), ROR $\gamma\text{T}^+$ (TH17) І FOXP3 $^+$ -ЛІМФОЦИТІВ (T $\text{REG}$ ) В БРИЖОВИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛАХ У НАЩАДКІВ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕСТАЦІЙНИМ ДІАБЕТОМ В ЦИХ ЖЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ГРУПАХ

#### 6.1 Аналіз клітинного складу Т- $\text{bet}^+$ -лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах

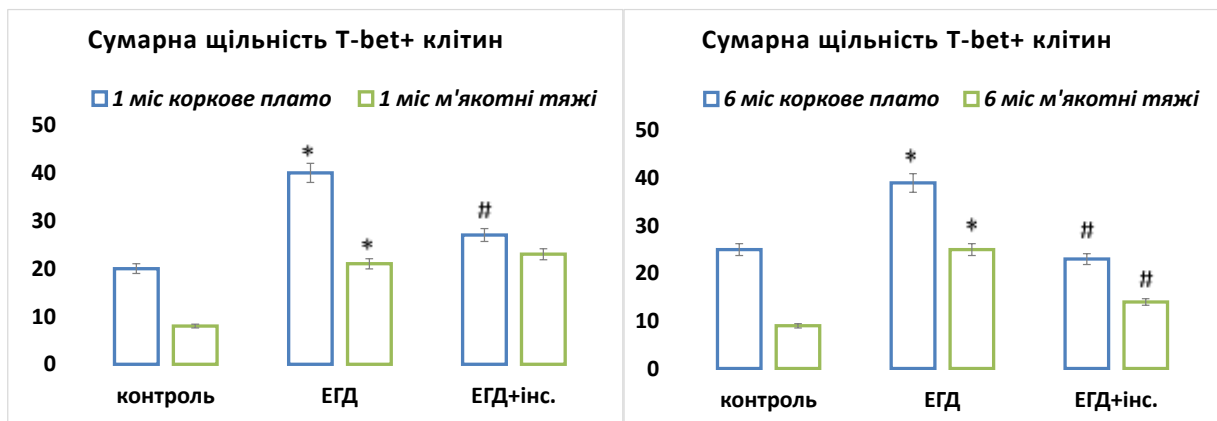
##### 6.1.1 Особливості експресії Т- $\text{bet}^+$ -лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до Т- $\text{bet}$  показав наступне: Сумарна щільність Т- $\text{bet}$  клітин у **корковому плато** 1 місячних нащадків тварин з ЕГД зросла у 2 рази у порівнянні з групою контролю ( $40 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  проти  $20 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$ ). По окремих класах лімфоїдних клітин зміни такі: число лімфобластів зросло у 3 рази, середніх лімфоцитів у 3,3 рази, а малих – на 71 % ( $p < 0,05$ ).

У щурів віком 6 місяців зберігається збільшення сумарної кількості Т- $\text{bet}$ -позитивних лімфоцитів на 56 % ( $39 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$  проти  $25 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$ ), по підгрупам зростання розподілилося наступним чином: лімфобласти – в 3 рази, середні лімфоцити на 57 %, а малі на 47 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 6.1, табл. 6.1).

Достовірні зміни концентрації спостерігаються у лімфобластів – на 11 % у першій віковій групі. В шестимісячних щурів змін концентрації виявлено не було) (табл. 6.2).

Сумарна щільність Т- $\text{bet}^+$ -лімфоцитів у **мозкових тяжах** групи контролю віком 1 місяць становила  $8 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , а у нащадків тварин з ЕГД  $21 \pm 2$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що у 2,6 раз більше ( $p < 0,05$ ). Лімфобласти при цьому зросли у 2 рази, середні лімфоцити в 3,5 раз, а малі в 2,7 раз.



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 6.1 – Сумарна щільність (на  $1 \text{ мм}^2$ ) T-bet імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

У 6 місячних тварин ці цифри становили  $9 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$  та  $25 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  відповідно. Ці показники відповідали зростанню сумарної кількості позитивних клітин в 2,8 раз ( $p < 0,05$ ). По класам: лімфобласти зросли достовірно в 2 рази, середні лімфоцити в 3,5 рази, а малі в 2,7 рази (див. рис. 6.1, табл. 6.3).

Достовірно значуще підвищення концентрації спостерігається у всіх групах лімфоцитів 1 місячних щурів, що народилися від матерів з ЕГД: лімфобластів на 88 %; середніх в 2,3 рази; малих лімфоцитів в 2,6 раз.

У наступній віковій групі достовірно значуще підвищення концентрації також спостерігається у всіх групах лімфоцитів: лімфобластів в 2,4 рази; середніх в 2,7 раз; малих лімфоцитів в 2,8 раз (табл. 6.4).

### 6.1.2 Особливості експресії T-bet в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до T-bet дав такі результати. У 1-місячних тварин сумарна щільність



клітин у **корковому плато** залишилися на тому ж рівні. Змінився склад. Достовірно зменшилася на 54 % кількість середніх лімфоцитів.

Таблиця 6.1 – Кількість T-bet<sup>+</sup> - клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	T-bet <sup>+</sup> лімфобласти	T-bet <sup>+</sup> середні лімф.	T-bet <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	20±2	<u>1±0</u> 7,0±1,8 %	<u>4±1</u> 22,5±3,8 %	<u>14±2</u> 70,5±9,4 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	40±3 <sup>1</sup>	<u>3±0<sup>1</sup></u> 8,1±1,1 %	<u>13±1<sup>1</sup></u> 31,8±3,1 %	<u>24±2<sup>1</sup></u> 60,1±5,5 %
контроль – 6 міс	25±2	<u>1±0</u> 5,7±1,7 %	<u>7±1</u> 26,8±3,0 %	<u>17±2</u> 67,4±6,0 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	39±2 <sup>1</sup>	<u>3±1<sup>1</sup></u> 7,9±1,5 %	<u>11±1<sup>1</sup></u> 28,0±2,6 %	<u>25±2<sup>1</sup></u> 64,1±4,2 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	38±2	<u>3±1</u> 8,8±1,4 %	<u>6±1<sup>2</sup></u> 16,3±2,5 %	<u>28±2</u> 74,9±5,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	37±2	<u>14±1<sup>2</sup></u> 36,5±2,3 %	<u>9±1</u> 24,1±2,0 %	<u>15±1<sup>2</sup></u> 39,4±2,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	27±3 <sup>2</sup>	<u>3±1</u> 10,9±1,6 %	<u>7±1<sup>2</sup></u> 27,3±2,8 %	<u>17±2<sup>2</sup></u> 61,8±5,1 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	23±3 <sup>2</sup>	<u>2±0</u> 7,2±1,3 %	<u>4±1<sup>2</sup></u> 16,3±1,9 %	<u>18±2<sup>2</sup></u> 76,4±6,2 %

Примітка.; достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

В наступній віковій групі сумарна кількість так само незмінна, але є зміни у окремих класах лімфоїдних клітин: різке збільшення кількості лімфобластів: в

4,7 разів і зменшення кількості малих лімфоцитів на 40 % ( $p<0,05$ ) (див. рис. 6.1, див. табл. 6.1).

Концентрація T-bet у щурів 1 місяця достовірно збільшилася в лімфобластах на 18 %, а в середніх лімфоцитах знизилася на 5 %.

В 6 місяців спостерігалось підвищення концентрації в лімфобластах на 17 %, середніх лімфоцитах на 5 % і зменшення її в малих лімфоцитах на 9 % ( $p<0,05$ ) (див. табл. 6.2).

Таблиця 6.2 – Концентрація T-bet (ОІФ) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M\pm m$ ).

Серії	T-bet+ лімфобласти	T-bet+ середні лімф.	T-bet+ малі лімф.
контроль – 1 міс	0,484±0,015	0,310±0,006	0,148±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,536±0,020 <sup>1</sup>	0,321±0,003	0,152±0,003
контроль – 6 міс	0,559±0,041	0,309±0,005	0,164±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,502±0,013	0,310±0,004	0,159±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,631±0,037 <sup>2</sup>	0,305±0,006 <sup>2</sup>	0,152±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,585±0,012 <sup>2</sup>	0,324±0,003 <sup>2</sup>	0,145±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,547±0,022	0,313±0,004	0,160±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,820±0,112 <sup>2</sup>	0,316±0,009	0,149±0,004 <sup>2</sup>

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p<0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

В мозкових тяжках достовірних змін сумарної щільності та концентрації показника і в 1-місячних нащадків, і у старшій віковій групі, зафіксовано не було (див. рис. 6.1, див. табл. 6.3–6.4).

Таблиця 6.3 – Кількість T-bet<sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжках БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1 мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	T-bet <sup>+</sup> лімфобласти	T-bet <sup>+</sup> середні лімф.	T-bet <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	8±1	<u>1±0</u> 13,5±2,7 %	<u>1±0</u> 16,2±3,2 %	<u>6±1</u> 70,3±11,3 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	21±2 <sup>1</sup>	<u>2±0</u> <sup>1</sup> 9,8±2,0 %	<u>5±1</u> <sup>1</sup> 23,7±4,2 %	<u>14±2</u> <sup>1</sup> 66,5±8,0 %
контроль – 6 міс	9±1	<u>1±0</u> 8,9±2,1 %	<u>2±0</u> 25,5±4,7 %	<u>6±1</u> 65,5±10,6 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	25±3 <sup>1</sup>	<u>2±0</u> <sup>1</sup> 9,6±1,8 %	<u>7±1</u> <sup>1</sup> 27,4±4,1 %	<u>16±2</u> <sup>1</sup> 62,9±8,4 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	24±3	<u>2±0</u> 8,2±1,6 %	<u>5±1</u> 22,6±3,2 %	<u>17±2</u> 69,3±8,3 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	25±2	<u>1±0</u> 5,8±1,6 %	<u>7±1</u> 28,2±3,5 %	<u>17±2</u> 66,0±6,4 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	23±2	<u>2±0</u> 7,6±1,6 %	<u>6±1</u> 25,6±3,5 %	<u>16±2</u> 66,8±7,2 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	14±2 <sup>2</sup>	<u>2±0</u> 12,6±1,3 %	<u>4±1</u> <sup>2</sup> 27,4±2,3 %	<u>8±1</u> <sup>2</sup> 60,0±5,1 %

Примітка.; достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

### 6.1.3 Особливості експресії T-bet в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, які отримували пероральний інсулін.

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до T-bet було проаналізовано з отриманням наступних результатів. В корковому плато 1-місячних тварин спостерігалось зниження сумарної щільності T-bet лімфоцитів на 33 %. Це відбулося за рахунок зменшення середніх (на 46 %) і малих форм лімфоцитів (на 29 %) ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 6.4 – Концентрація T-bet (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	T-bet <sup>+</sup> лімфобласти	T-bet <sup>+</sup> середні лімф.	T-bet <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,291±0,022	0,139±0,006	0,061±0,002
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,548±0,044 <sup>1</sup>	0,325±0,005 <sup>1</sup>	0,157±0,004 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,217±0,015	0,118±0,002	0,057±0,001
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,529±0,023 <sup>1</sup>	0,313±0,004 <sup>1</sup>	0,160±0,003 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,598±0,044	0,316±0,005	0,152±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,653±0,116	0,311±0,005	0,156±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,597±0,060	0,318±0,005	0,161±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,631±0,029 <sup>2</sup>	0,306±0,003	0,161±0,003

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

У групі 6 місячних щурів зміни аналогічні попередній віковій категорії: зниження сумарної щільності на 41 % за рахунок середніх (на 64 %) і малих форм (на 28 %) ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.1, див. табл. 6.1).

Концентрація T-bet у 1 місячних щурів достовірно не відрізнялася. А в наступній за віком групі відзначалося значне підвищення концентрації T-bet в лімфобластах (на 63 %), і зниження в малих лімфоцитах (на 6 %) ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 6.2).

У **мозкових тяжах** 1-місячних тварин достовірних змін сумарної щільності не спостерігалось.

А в віці 6 місяців можна стверджувати про значне зменшення сумарної щільності T-bet клітин на 44 %. По класах змінилася кількість середніх і малих лімфоцитів (на 43 % і на 50 % відповідно) ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.1, див. табл. 6.3).

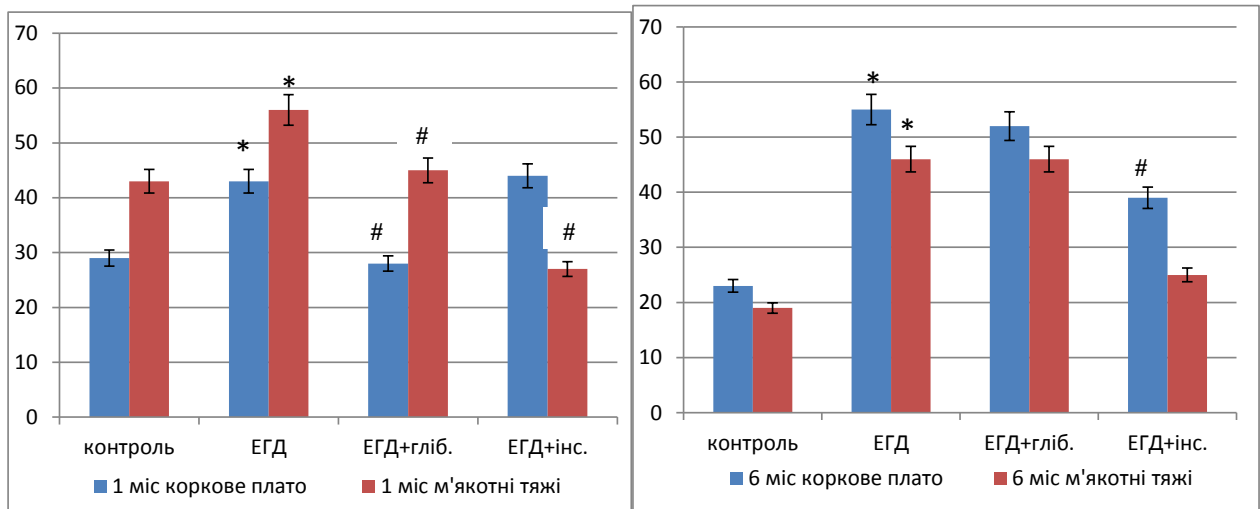
Концентрація показника у 1-місячних тварин достовірно не змінилась, а от в 6 місяців спостерігалось збільшення концентрації на 19 % в лімфобластах (див. табл. 6.4).

## **6.2 Аналіз клітинного складу ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах**

### **6.2.1 Особливості експресії ROR $\gamma$ t в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету**

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до ROR $\gamma$ t показав наступне: у 1-місячних щурів в групі контролю сумарна щільність позитивних лімфоцитів **коркового плато** становила  $29 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$ , а у нащадків щурів з ЕГД –  $43 \pm 4$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що достовірно вище на 48 %. Цей показник підвищився за рахунок лімфобластів, які зросли у 2,7 рази. В 6 місяців загальна кількість ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин збільшилось по відношенню до контрольних тварин в 2,4 рази за рахунок усіх підкласів

лімфоїдних клітин: лімфобласти зросли у 18 разів, середні лімфоцити в 2 рази, малі – на 53 % (рис. 6.2, табл. 6.5).



Примітка: достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#).

Рисунок 6.2. – Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) ROR $\gamma$ t імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламіду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Що стосується концентрації ROR $\gamma$ t у корковому плато, то у віці 1 місяця спостерігається ізольоване підвищення концентрації у середніх лімфоцитах на 5 %, а в 6-місячному віці концентрація показника в лімфобластах збільшилась на 35 % та зменшилась на 14 % у малих лімфоцитах ( $p < 0,05$ ) (табл. 6.6).

В **мозкових тяжках** сумарна щільність у 1-місячних тварин становила  $37 \pm 2$  на  $1\text{мм}^2$ , у нащадків з ЕГД вона зросла на 51 % та становила  $56 \pm 3$  на  $1\text{мм}^2$ . Це відбулося за рахунок лімфобластів, кількість яких зросла у 6 раз ( $p < 0,05$ ).

У 6-місячних щурів спостерігалось збільшення сумарної щільності в 2,4 рази за рахунок усіх підгруп лімфоїдних клітин: лімфобласти в 2,8 рази, середні лімфоцити в 3 рази, малі лімфоцити на 70 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.2, табл. 6.3).

У 1-місячних тварин спостерігається підвищення концентрації параметра в лімфобластах на 34 %, середніх лімфоцитах на 4 %, і деяке зниження в малих лімфоцитах – на 12 % У групи тварин віком 6 місяців концентрація ROR $\gamma$ t збільшилась на 6 % у середніх та на 18 % у малих лімфоцитах ( $p < 0,05$ ) (табл. 6.8).

### **6.2.2 Особливості експресії ROR $\gamma$ t в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам.**

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до ROR $\gamma$ t дав наступні результати. У **корковому плато** цих тварин віком 1 місяця спостерігалось зниження сумарної щільності позитивних лімфоцитів на 35 % за рахунок середніх (на 38 %) і малих форм (на 37 %) ( $p < 0,05$ ). У 6-місячних щурів достовірних змін кількості лімфоцитів не знайдено (див. рис. 6.2, див. табл. 6.5).

При цьому у 1-місячних щурів спостерігається зниження концентрації ROR $\gamma$ t на 14 % ( $p < 0,05$ ). У старшій віковій групі змін не спостерігалось (див. табл. 6.6).

У **мозкових тяжах** цих тварин віком 1 місяця також спостерігається зниження сумарної щільності позитивних лімфоцитів на 20 % за рахунок середніх (на 25 %) і малих форм на 27 %. У 6 місячних щурів було знайдено зниження кількості середніх лімфоцитів на 25 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.2, див. табл. 6.7).

Концентрація ROR $\gamma$ t в обох вікових категоріях не зазнала достовірних змін (див. табл. 6.8).

### **6.2.3 Особливості експресії ROR $\gamma$ t в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, які отримували пероральний інсулін.**

Особливості експресії ROR $\gamma$ t в **корковому плато** та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з ЕГД, які отримували пероральний інсулін.

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до ROR $\gamma$ t було проаналізовано з отриманням наступних результатів. Сумарна щільність ROR $\gamma$ t – позитивних лімфоцитів у **корковому плато** 1-місячних тварин достовірно не змінилася. У віці 6 місяців спостерігалось зниження сумарної щільності на 29 % за рахунок середніх (на 42 %) і малих лімфоцитів (на 42 %) ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.2, див. табл. 6.5).

Таблиця 6.5 – Кількість Ror $\gamma$ t<sup>+</sup> - клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M $\pm$ m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	Ror $\gamma$ t <sup>+</sup> лімфобласти	Ror $\gamma$ t <sup>+</sup> середні лімф.	Ror $\gamma$ t <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	29 $\pm$ 3	<u>6<math>\pm</math>1</u> 19,5 $\pm$ 3,3 %	<u>8<math>\pm</math>1</u> 26,3 $\pm$ 2,9 %	<u>16<math>\pm</math>2</u> 54,2 $\pm$ 5,9 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	43 $\pm$ 4 <sup>1</sup>	<u>16<math>\pm</math>2<sup>1</sup></u> 36,7 $\pm$ 4,7 %	<u>8<math>\pm</math>1</u> 18,3 $\pm$ 2,2 %	<u>19<math>\pm</math>2</u> 45,1 $\pm$ 4,9 %
контроль – 6 міс	23 $\pm$ 2	<u>1<math>\pm</math>0</u> 4,3 $\pm$ 1,3 %	<u>6<math>\pm</math>1</u> 24,8 $\pm$ 4,9 %	<u>17<math>\pm</math>2</u> 71,0 $\pm$ 8,1 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	55 $\pm$ 4 <sup>1</sup>	<u>18<math>\pm</math>2<sup>1</sup></u> 32,0 $\pm$ 3,3 %	<u>12<math>\pm</math>1<sup>1</sup></u> 21,1 $\pm$ 2,4 %	<u>26<math>\pm</math>2<sup>1</sup></u> 46,9 $\pm$ 4,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	28 $\pm$ 2 <sup>2</sup>	<u>11<math>\pm</math>1</u> 40,6 $\pm$ 4,5 %	<u>5<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 17,8 $\pm$ 3,1 %	<u>12<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 41,6 $\pm$ 4,8 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	52 $\pm$ 4	<u>19<math>\pm</math>2</u> 36,5 $\pm$ 4,2 %	<u>12<math>\pm</math>1</u> 23,7 $\pm$ 2,5 %	<u>21<math>\pm</math>2</u> 39,7 $\pm$ 4,2 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	44 $\pm$ 5	<u>17<math>\pm</math>2</u> 38,5 $\pm$ 3,7 %	<u>8<math>\pm</math>1</u> 18,5 $\pm$ 1,8 %	<u>19<math>\pm</math>2</u> 43,0 $\pm$ 4,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	39 $\pm$ 4 <sup>2</sup>	<u>16<math>\pm</math>2</u> 41,9 $\pm$ 3,8 %	<u>7<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 18,1 $\pm$ 1,9 %	<u>15<math>\pm</math>2<sup>2</sup></u> 40,0 $\pm$ 3,5 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).



Концентрація показника у обох вікових категоріях достовірно не змінилася (див. табл. 6.6).

Таблиця 6.6 – Концентрація Roryt ( $O_{1\Phi}$ ) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	Roryt <sup>+</sup> лімфобласти	Roryt <sup>+</sup> середні лімф.	Roryt <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,647±0,034	0,302±0,005	0,137±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,654±0,020	0,318±0,004 <sup>1</sup>	0,141±0,003
контроль – 6 міс	0,459±0,021	0,314±0,006	0,164±0,004
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,619±0,018 <sup>1</sup>	0,321±0,004	0,141±0,003 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,560±0,019 <sup>2</sup>	0,309±0,008	0,149±0,006
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,585±0,014	0,318±0,004	0,148±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,658±0,016	0,319±0,004	0,139±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,630±0,015	0,318±0,004	0,149±0,003

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

Що стосується **мозкових тяжів** лімфатичних вузлів, то у 1-місячних щурів було знайдено зниження сумарної щільності на 52 % за рахунок усіх підкласів лімфоїдних клітин: лімфобластів на 33 %, середніх лімфоцитів на 67 %, малих лімфоцитів на 58 %. У 6-місячних тварин зміни були такими: сумарна щільність зменшилась на 46 % за рахунок усіх підкласів лімфоїдних клітин. Кількість лімфобластів знизилась на 53 %, середніх лімфоцитів на 58 %, малих на 29 % (див. рис. 6.2, див. табл. 6.7).

Таблиця 6.7. – Кількість Ror $\gamma$ <sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжках БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M $\pm$ m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	Ror $\gamma$ <sup>+</sup> лімфобласти	Ror $\gamma$ <sup>+</sup> середні лімф.	Ror $\gamma$ <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	37 $\pm$ 2	<u>3<math>\pm</math>1</u> 8,5 $\pm$ 1,5 %	<u>11<math>\pm</math>1</u> 29,0 $\pm$ 3,3 %	<u>23<math>\pm</math>2</u> 62,5 $\pm$ 4,6 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	56 $\pm$ 3 <sup>1</sup>	<u>18<math>\pm</math>2<sup>1</sup></u> 32,7 $\pm$ 2,7 %	<u>12<math>\pm</math>1</u> 21,4 $\pm$ 2,1 %	<u>26<math>\pm</math>2</u> 45,9 $\pm$ 4,1 %
контроль – 6 міс	19 $\pm$ 2	<u>6<math>\pm</math>1</u> 28,6 $\pm$ 3,6 %	<u>4<math>\pm</math>1</u> 18,4 $\pm$ 2,7 %	<u>10<math>\pm</math>1</u> 53,0 $\pm$ 7,3 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	46 $\pm$ 2 <sup>1</sup>	<u>17<math>\pm</math>1<sup>1</sup></u> 36,7 $\pm$ 2,7 %	<u>12<math>\pm</math>1<sup>1</sup></u> 26,7 $\pm$ 2,4 %	<u>17<math>\pm</math>1<sup>1</sup></u> 36,7 $\pm$ 3,2 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	45 $\pm$ 3 <sup>2</sup>	<u>17<math>\pm</math>1</u> 37,7 $\pm$ 2,9 %	<u>9<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 19,8 $\pm$ 1,9 %	<u>19<math>\pm</math>2<sup>2</sup></u> 42,5 $\pm$ 4,0 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	46 $\pm$ 2	<u>20<math>\pm</math>2</u> 44,1 $\pm$ 3,6 %	<u>9<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 19,6 $\pm$ 2,1 %	<u>17<math>\pm</math>2</u> 36,3 $\pm$ 3,6 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	27 $\pm$ 2 <sup>2</sup>	<u>12<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 44,9 $\pm$ 3,0 %	<u>4<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 16,3 $\pm$ 1,5 %	<u>11<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 38,8 $\pm$ 3,0 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	25 $\pm$ 3 <sup>2</sup>	<u>8<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 33,5 $\pm$ 2,4 %	<u>5<math>\pm</math>1<sup>2</sup></u> 19,9 $\pm$ 2,0 %	<u>12<math>\pm</math>2<sup>2</sup></u> 46,6 $\pm$ 3,5 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>)

Концентрація ROR $\gamma$  в 1-місячних тварин виявилася без достовірних змін. А у 6-місячних зменшилась на 10 % у малих лімфоцитах (див. табл. 6.8).

Таблиця 6.8 – Концентрація Roryt (ОІФ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m).

Серії	Roryt <sup>+</sup> лімфобласти	Roryt <sup>+</sup> середні лімф.	Roryt <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,517±0,021	0,307±0,004	0,161±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,695±0,022 <sup>1</sup>	0,320±0,004 <sup>1</sup>	0,142±0,003 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,593±0,028	0,306±0,008	0,131±0,005
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,598±0,018	0,325±0,004 <sup>1</sup>	0,155±0,004 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,661±0,023	0,318±0,005	0,141±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,623±0,018	0,320±0,005	0,145±0,004
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,689±0,025	0,310±0,007	0,140±0,005
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,625±0,024	0,312±0,007	0,140±0,005 <sup>2</sup>

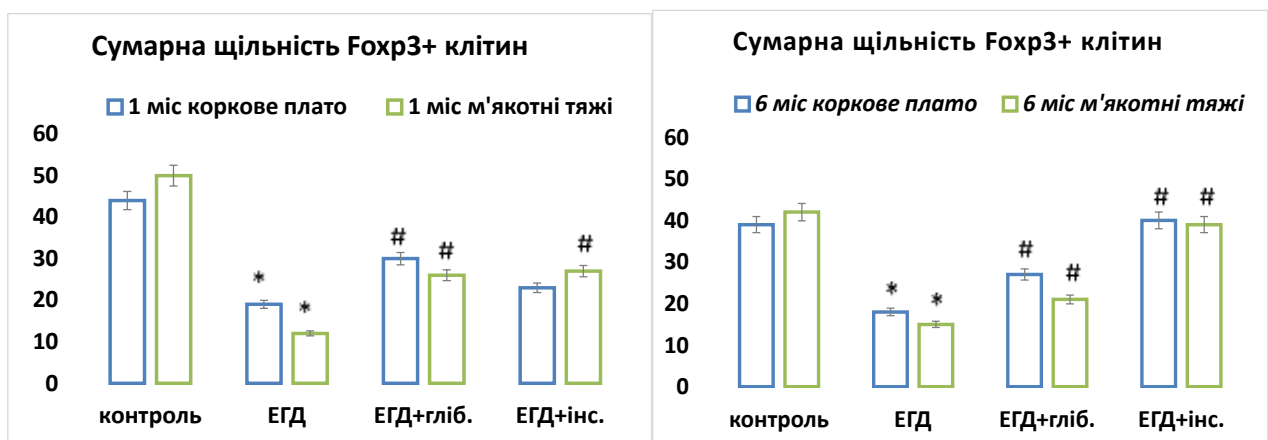
Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

### 6.3 Аналіз клітинного складу Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах

#### 6.3.1 Особливості експресії Foxp3 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, в умовах розвитку експериментального гестаційного діабету.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з МКАТ до Foxp3 продемонстрував наступне: сумарна щільність

Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у **корковому плато** групи контролю становила 44±4 на 1 мм<sup>2</sup>, а у нащадків щурів з ЕГД – 19±3 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 57 % нижче. Це зниження у віці одного місяця відбулося за рахунок усіх підкласів лімфоїдних клітин: найбільш значуще знизилась кількість лімфобластів – на 78 %, середніх на 55 % та малих лімфоцитів на 46 %. У віці 6 місяців тенденція по зниженню сумарної щільності зберігалась: спостерігалось зниження до 18±2 на 1 мм<sup>2</sup> проти 39±3 на 1 мм<sup>2</sup>, це менше на 54 %, достовірне зменшення відбулося за рахунок середніх та малих лімфоцитів (рис. 6.3, табл. 6.9).



Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (\*), до ЕГД (#)

Рисунок 6.3 – Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) Foxp3 імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламиду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Концентрація транскрипційного фактору достовірно знизилась в усіх підкласах лімфоцитів: лімфобласти – на 62 %, середні лімфоцити – на 64 % та малі лімфоцити – на 55 %. Але у 6-місячних щурів не зафіксовано достовірних відмінностей концентрації показника від контрольної групи (табл. 6.10).

Таблиця 6.9 – Кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин в корковому плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (M±m). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	Foxp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Foxp3 <sup>+</sup> середні лімф.	Foxp3 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	44±4	<u>9±1</u> 20,0±2,4 %	<u>11±1</u> 25,1±2,4 %	<u>24±3</u> 55,0±5,9 %
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	19±3 <sup>1</sup>	<u>2±0</u> <sup>1</sup> 8,1±1,9 %	<u>5±1</u> <sup>1</sup> 26,6±4,1 %	<u>13±2</u> <sup>1</sup> 65,2±9,1 %
контроль – 6 міс	39±3	<u>3±1</u> 8,7±1,8 %	<u>13±1</u> 32,0±3,5 %	<u>23±2</u> 59,3±4,2 %
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	18±2 <sup>1</sup>	<u>2±0</u> 12,1±1,8 %	<u>5±1</u> <sup>1</sup> 27,6±3,9 %	<u>11±1</u> <sup>1</sup> 60,3±8,3 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	30±4 <sup>2</sup>	<u>8±1</u> <sup>2</sup> 27,7±3,9 %	<u>7±1</u> 23,6±3,4 %	<u>15±2</u> 48,6±6,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	27±3 <sup>2</sup>	<u>2±0</u> 7,1±1,7 %	<u>6±1</u> 21,7±3,9 %	<u>19±2</u> <sup>2</sup> 71,2±7,5 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	23±2	<u>6±1</u> <sup>2</sup> 24,4±3,4 %	<u>4±1</u> 18,6±2,6 %	<u>13±2</u> 57,0±5,8 %
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	40±5 <sup>2</sup>	<u>6±1</u> <sup>2</sup> 15,5±3,2 %	<u>10±1</u> <sup>2</sup> 23,9±5,2 %	<u>25±3</u> <sup>2</sup> 60,6±12,7 %

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

При порівнянні нащадків щурів від самок з ЕГД були отримані наступні дані. Сумарна щільність Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у **мозкових тяжях** групи контролю становила 50±3 на 1 мм<sup>2</sup>, у щурів від самок з ЕГД – 12±2 на 1 мм<sup>2</sup>. Тобто число Foxp3<sup>+</sup>-позитивних лімфоїдних клітин менше на 76 % ( $p < 0,05$ ), це зниження спостерігалось в усіх підкласах лімфоцитів. У віці 6 місяців, також за рахунок усіх підгруп, цей показник зменшився на 64 % ( $p < 0,05$ ), з 42±3 на 1 мм<sup>2</sup> до 15±1 на 1 мм<sup>2</sup> (див. рис. 6.3, табл. 6.11). Концентрація показника в віці 1 місяця і у віці

6 місяців достовірно змінилася лише у категорії малих лімфоцитів – вона зросла на 11 % ( $p < 0,05$ ) в обох вікових групах (табл. 6.12).

Таблиця 6.10 – Концентрація Foxp3 ( $O_{I\Phi}$ ) в лімфоцитах коркового плато БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	Foxp3+ лімфобласти	Foxp3+ середні лімф.	Foxp3+ малі лімф.
контроль – 1 міс	0,558±0,025	0,311±0,004	0,134±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,212±0,012 <sup>1</sup>	0,112±0,002 <sup>1</sup>	0,060±0,001 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,538±0,027	0,308±0,003	0,146±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,597±0,023	0,302±0,003	0,152±0,002
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,632±0,025 <sup>2</sup>	0,311±0,004 <sup>2</sup>	0,144±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,570±0,052	0,304±0,005	0,156±0,003
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,567±0,032 <sup>2</sup>	0,313±0,007 <sup>2</sup>	0,141±0,004 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,617±0,030	0,300±0,004	0,141±0,0032

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

### **6.3.2 Особливості експресії Foxp3 в корковому плато та мозкових тяжках брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам**

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували під час вагітності глібенкламід, попередньо інкубованих з МКАТ до Foxp3 дав наступні результати. Сумарна щільність Foxp3-клітин в

**корковому плато** в віці 1 місяця становила  $30 \pm 4$  на  $1 \text{ мм}^2$ . У порівнянні з нащадками щурів з ЕГД цей показник вище на 58 % ( $p < 0,05$ ), найбільше за рахунок лімфобластів, кількість яких зросла в 4 рази ( $p < 0,05$ ). А ось концентрація показника достовірно зростає у всіх підкласах лімфоцитів: в лімфобластах та середніх лімфоцитах в 3 рази, в малих лімфоцитах в 2,4 рази ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.3, див. табл. 6.9).

У віці 6 місяців також спостерігається збільшення сумарної щільності на 50 %, але тут переважно за рахунок малих лімфоцитів, кількість яких зросла на 73 % ( $p < 0,05$ ). Однак достовірних змін концентрації, в порівнянні з групою ЕГД6 не виявлено (див. табл. 6.10).

Зміни Foxp3<sup>+</sup> в **мозкових тяжах**. В 1 місячних щурів спостерігається підвищення сумарної щільності в 2,2 рази, достовірне збільшення кількості позитивних лімфобластів в 9 раз та малих лімфоцитів – на 86 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.3, див. табл. 6.11).

Незважаючи на це концентрація показника в малих лімфоцитах виявилася зниженою на 16 % (див. табл. 6.12).

### **6.3.3 Особливості експресії Foxp3 в корковому плато та мозкових тяжах брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar з експериментальним гестаційним діабетом, які отримували пероральний інсулін**

Серійні зрізи брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, попередньо інкубовані з МКАТ до Foxp3 було проаналізовано з отриманням наступних результатів. Сумарна щільність Foxp3 клітин в **корковому плато** достовірно не змінилась. Збільшена кількість лімфобластів в 3 рази ( $p < 0,05$ ). Що стосується концентрації показника, то вона достовірно збільшилась в усіх підгрупах лімфоцитів: лімфобласти в 2,7 рази, середні лімфоцити в 2,8 рази, малі лімфоцити в 2,4 рази ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.3, див. табл. 6.9).

У 6-місячних щурів спостерігалось підвищення сумарної щільності показника в 2,2 раза, за рахунок усіх підкласів лімфоїдних клітин: лімфобласти – в 3 рази, середні лімфоцити – в 2 рази, малі лімфоцити в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ). При цьому концентрація Foxp3 практично не змінилася, а в малих лімфоцитах зменшилась на 7 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 6.10).

Таблиця 6.11 – Кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин в мозкових тяжках БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ). В чисельнику – щільність популяції клітин (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику – відсоткова частка окремих класів клітин

Серії	Сумарна щільність	Foxp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Foxp3 <sup>+</sup> середні лімф.	Foxp3 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	50 ± 3	$\frac{13 \pm 2}{26,2 \pm 4,0 \%}$	$\frac{13 \pm 1}{27,0 \pm 2,8 \%}$	$\frac{23 \pm 2}{46,9 \pm 3,6 \%}$
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	12 ± 2 <sup>1</sup>	$\frac{1 \pm 0^1}{11,8 \pm 2,1 \%}$	$\frac{4 \pm 1^1}{32,7 \pm 4,6 \%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{55,5 \pm 7,6 \%}$
контроль – 6 міс	42 ± 3	$\frac{9 \pm 1}{20,2 \pm 2,2 \%}$	$\frac{14 \pm 1}{32,3 \pm 3,3 \%}$	$\frac{20 \pm 2}{47,5 \pm 4,3 \%}$
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	15 ± 1 <sup>1</sup>	$\frac{2 \pm 0^1}{11,5 \pm 1,4 \%}$	$\frac{5 \pm 1^1}{27,1 \pm 2,8 \%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{61,4 \pm 5,7 \%}$
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	26 ± 3 <sup>2</sup>	$\frac{9 \pm 1^2}{32,5 \pm 4,3 \%}$	$\frac{5 \pm 1}{17,8 \pm 2,4 \%}$	$\frac{13 \pm 2^2}{49,7 \pm 7,2 \%}$
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	21 ± 3 <sup>2</sup>	$\frac{6 \pm 1^2}{25,9 \pm 4,6 \%}$	$\frac{5 \pm 1}{22,9 \pm 3,2 \%}$	$\frac{11 \pm 2}{51,3 \pm 7,7 \%}$
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	27 ± 2 <sup>2</sup>	$\frac{5 \pm 1^2}{18,9 \pm 3,6 \%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{27,3 \pm 3,9 \%}$	$\frac{15 \pm 2^2}{53,8 \pm 7,7 \%}$
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	39 ± 3 <sup>2</sup>	$\frac{13 \pm 1^2}{34,4 \pm 6,2 \%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{20,0 \pm 4,4 \%}$	$\frac{18 \pm 2^2}{45,5 \pm 8,7 \%}$

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).



Сумарна щільність Foxp3 в **мозкових тяжах** в 1-місячних щурят збільшилась в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ), за рахунок достовірного збільшення усіх підкласів лімфоїдних клітин: лімфобласти – в 5 раз, середні – на 75 %, малі лімфоцити – в 2,1 рази. В 6-місячному віці сумарна щільність зросла в 2,6 раз, найбільше збільшилась кількість лімфобластів – в 6,5 разів, середні – лімфоцити на 60 %, малі – на 64 % ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 6.3, див. табл. 6.11). При цьому концентрація в обох вікових групах достовірно змінилася лише у малих лімфоцитах. В 1 місяць вона зменшилась на 9 %, в 6 місяців знизилась на 15 % ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 6.12).

Таблиця 6.12 – Концентрація Foxp3 ( $O_{1\phi}$ ) в лімфоцитах мозкових тяжів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД ( $M \pm m$ ).

Серії	Foxp3 <sup>+</sup> лімфобласти	Foxp3 <sup>+</sup> середні лімф.	Foxp3 <sup>+</sup> малі лімф.
контроль – 1 міс	0,603±0,024	0,308±0,004	0,140±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 1 міс	0,619±0,032	0,313±0,003	0,155±0,003 <sup>1</sup>
контроль – 6 міс	0,635±0,035	0,307±0,004	0,148±0,003
нащадки щурів з ЕГД – 6 міс	0,616±0,021	0,306±0,002	0,165±0,002 <sup>1</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 1 міс	0,690±0,023	0,305±0,005	0,134±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Гліб. – 6 міс	0,582±0,021	0,309±0,004	0,139±0,003 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін 1 міс	0,634±0,039	0,320±0,005	0,141±0,004 <sup>2</sup>
нащадки щурів з ЕГД + Інсулін – 6 міс	0,658±0,023	0,312±0,005	0,141±0,004 <sup>2</sup>

Примітка. Достовірність відмінностей параметрів  $p < 0,05$  по відношенню до контролю (<sup>1</sup>), до ЕГД (<sup>2</sup>).

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що:

1. Інтранатальна гіперглікемія призводить до збільшення кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-клітин в БЛВ у нащадків, більш виражено на 1 місяці життя, а також веде до зниження кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та змінює щільність ПРР на імунних клітинах.

2. Під час формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків щурів у корковому плато БЛВ знижується чисельність T-bet<sup>+</sup>-клітин, а в мозкових тяжках – RORγt<sup>+</sup>-клітин. У віці 6 місяців можна стверджувати про значне зменшення сумарної щільності T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>- на фоні зростання чисельності Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

3. Введення глібенкламиду вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, призводить до зниження у БЛВ 1-місячних та 6-місячних нащадків кількості лише RORγt<sup>+</sup>-клітин. Також збільшується кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

Результати наведених в даному розділі досліджень представлені в науковій публікації автора [140–142].

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою нашого дослідження було з'ясувати як змінюється функціональний стан лімфоцитів брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів з ЕГД і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну.

Для цього використовували сучасні патофізіологічні, морфометричні, біохімічні, імунофлюоресцентні (реакція прямої імунофлюоресценції або непрямой імунофлюоресценції 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, математичний класифікаційний та статистичні аналізи отриманих результатів.

На першому етапі дослідження вивчили особливості формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів шляхом визначення рівня транскрипційної активності генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il10* в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну. Було встановлено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігалися такі порушення імуно толерантності: репресія гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*. Пероральне введення інсуліну в перші 2 тижні нівелювало ці зміни. Воно викликало транскрипційну активацію генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il10*.

Формування імунологічної толерантності до власних антигенів є важливим механізмом, що запобігає розвитку аутоімунних захворювань. Регулятором ектопічної транскрипції в тимусі цілого ряду периферичних тканинних специфічних антигенів, в тому числі таких панкреатичних антигенів як інсулін, проінсулін, проглюкагон, просоматостатин і пропанкреатичний поліпептид, є аутоімунний регулятор (*Aire*) [143]. Однак, елімінація ауто-реактивних Т-кліток в тимусі є незавершеним процесом, такі лімфоцити виявляються в периферичній крові навіть у клінічно здорових осіб [144]. Екстра-тимічна експресія PTSAс була продемонструована в різних дослідженнях. Так,

експресія панкреатичних острівних аутоантигенів, включаючи проінсулін, була продемонстрована на циркулярних дендритних клітинах і макрофагах у людей [145] та гризунів [9]. Багаточисленні екстратимічні Aire-експресуючі клітини (екстратимічні Aire-експресуючі клітини, eTACs) виявляються в лімфатичних вузлах (ЛВ) і є одним з критичних факторів формування периферичної толерантності (ПТ).

Клітини строми ЛВ, що включають фібробластні ретикулярні клітини, фолікулярні дендритні клітини і лімфатичні ендотеліальні клітини – експресують PTSAAs [10], однак їх експресія регулюється не лише eTACs, а й транскрипційним регулятором Deaf1 (deformed autoregulatory factor 1) [146]. В свою чергу, обидва регулятора Aire та Deaf1 виступають важливими факторами диференціювання іншого учасника негативного контролю розвитку АІЗ – індукцйбельних Т-регуляторних клітин (iTreg), що експресують транскрипційний фактор Foxp3 [12]. Робота iTreg полягає у продукції ряду супресорних цитокінів – IL-10, IL-13, IL-35, TGF $\beta$  [13], цитолізу ефektorних клітин за участю перфоринів і гранзимів та залежить від експресії негативних костимуляторних молекул, а саме CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) [14]. В той же час стромальні клітини брижових лімфатичних вузлів (БЛВ), що експресують Deaf1, також виробляють ретиноеву кислоту, яка сприяє розвитку Foxp3<sup>+</sup>-регуляторних Т-лімфоцитів [15]

Перші докази екстратимічної експресії Aire на рівні мРНК були отримані в оригінальних дослідженнях з клонуванням гена Aire [16]. І, хоча більш високий рівень в цих дослідженнях тканин людини AIRE був виявлений в тимусі, РНК-транскрипти були також виявлені в лімфатичних вузлах, печінці та інших тканинах. Подальші дослідження із застосуванням техніки гібридизації, нозерн-блотингу, ПЛР підтвердили широку експресію Aire в різних тканинах поза тимусом. У мишей визначалася навіть більш висока експресія Aire в ЛВ і селезінці в порівнянні з тимусом [17]. У тканинах людини мРНК Aire детектується в ЛВ (в БЛВ набагато інтенсивніше, ніж в периферичних), мигдалинах, КАЛТ [18], селезінці, печінці, моноцитах, ДК, Т- і В-лімфоцитах

периферичної крові [19], епітеліоцитах [20] і клітинах строми ЛВ [21]. Ці результати підтверджені і на рівні білку імуногістохімічним методом і імуноблотингом [18]. Деякі дослідження були нездатні підтвердити свої знахідки мРНК на рівні білка. Так, Hubert F. та ін. який раніше повідомив про експресію мРНК Aire в тимусі, лімфатичному вузлі, селезінці та інших периферійних тканинах у щурів, не зміг виявити білок Aire, використовуючи вестерн-блотинг або імуногістохімію в будь-якій тканині крім тимуса [22].

Gardner та ін. за допомогою трансгенної моделі показав здатність екстратімічних Aire<sup>+</sup>-клітин експресувати панкреатичні PTSA, зокрема білок Igrp (islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein) [20], а також методом ДНК-мікрочіпів показав наявність великої кількості Aire-регульованих генів в ЛВ. Збільшення рівня Aire в селезінкових CD11c<sup>+</sup>-дендритних клітинах призводить до наростання в них транскриптів інсуліну, але не декарбоксилази глютамінової кислоти 67 (GAD67) [23]. Відсутність транскриптів окремих панкреатичних АГ може пояснюватися тим, що субпопуляції клітин лімфатичного вузла відрізняються по їх експресії Aire. Можливо, нокаут гена Aire не діє на експресію ПТА в межах тих субпопуляцій, які його не виражають. Наприклад, GAD67 експресується в трьох субпопуляція клітин лімфатичного вузла, тільки дві з яких експресують Aire [24]. Аналіз Aire<sup>-/-</sup> мишей показав відсутність транскриптів GAD67 тільки в тій сукупності клітин, де Aire зазвичай експресується. У той же час ті клітини від Aire<sup>-/-</sup> мишей, в яких в нормі Aire був відсутній, все ще могли представляти антиген певним антиген-специфічним Т-лімфоцитів [24].

Yang та ін. показав здатність Aire генерувати в перинатальний період (включаючи до 10 діб після народження) особливу популяцію Foxp3 + Treg-клітин, яка стійко зберігається і у дорослих мишей [25]. Ці перинатальні- Treg демонструють вищу супресорну активність, інший профіль генів і фенотипно відрізняються від Treg, що генеруються у дорослих. У мишей лінії NOD видалення Treg під час цього "перинатального вікна" призводить до розвитку мультиорганних аутоімунних захворювань, подібних, що розвиваються при

нокауті Aire [25]. На відміну від цього, ніяких таких ефектів не спостерігається при делеції Treg у дорослих мишей. Важливе значення цих відмінностей – методи лікування, засновані на трансфері Tregs, отриманих від дорослих донорів, часто не в змозі впливати на аутоімунні процеси, регульовані "молодими" Tregs.

Роль Aire в диференціюванні Foxp3<sup>+</sup> Tregs показана в ряді робіт [147–148]. І, хоча, Daniely та ін. встановили, що нестача Aire не чинила значного ефекту на TCR Foxp3<sup>+</sup>-Tregs [149], Malchow та ін. нещодавно продемонстрували Aire-залежну продукцію Tregs в тимусі у мишей [150]. Показана здатність Aire регулювати експресію мРНК Foxp3 в спленоцитах і посилювати продукцію CD4<sup>+</sup>-Foxp3<sup>+</sup> Т-клітин в селезінці [151]. Gardner та ін. продемонстрували здатність eTACs (extrathymic Aire-expressing cells) функціонально інактивувати ефекторні CD4<sup>+</sup> Т-лімфоцити, збільшувати чисельність Treg і впливати на їх виживання [152]. Treg від Aire-дефіцитних мишей, незважаючи на свою транскрипційну і фенотипічну "нормальність", демонструють нездатність запобігти розвитку експериментального коліту [153]. Цікаво, що коменсальні бактерії кишкового мікробіома впливають на рівень експресії Aire в тимусі [154], тоді як рівень експресії Aire в БЛВ, вочевидь, повинен бути ще більшою мірою залежним від кишкової мікробіоти, враховуючи що БЛВ є своєрідним "контрольно-пропускним пунктом" для кишкових АГ. Була показана здатність Aire регулювати експресію цілого ряду TLR (TLR3, TLR8, TLR2, TLR4, TLR6 і TLR9) моноцитами і макрофагами в ЛВ і селезінці [155]

У свою чергу, інтранатальна гіперглікемія, яка розвивається при гестаційному діабеті (ГД), може впливати на морфогенез органів імунної системи та призвести до порушень формування ПТ до панкреатичних АГ. Ключовим місцем для індукції ПТ є брижові лімфатичні вузли (БЛВ), в яких відбувається інтенсивна активація наївних Т-лімфоцитів і їх диференціювання в субпопуляції ефекторних клітин [29]. Зміни рівня експресії Aire здатні вплинути на характер диференціювання Foxp3<sup>+</sup> + Treg-клітин [147–148].

Подальшим етапом стало визначення кількості транскриптів генів-регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів *Madcam1*, *S1pr1*, *Cxcr4* і *CCR7*,

характеру експресії мРНК NLRP3-інфламасоми і розподілу NLRP3<sup>+</sup>-клітин в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну, після введення глібенкламід. Було з'ясовано, що нащадки, народжені від матерів з ЕГД, демонструють значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *Slpr1*, але рівень експресії *Cxcr4* в обох вікових групах достовірно не змінився. Формування оральної толерантності до інсуліну супроводжується зниженням відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *Slpr1* в клітинах БЛВ. Розвиток ЕГД у самок супроводжується інтенсивною транскрипційною індукцією гена *Nlrp3* в БЛВ у нащадків. Рівень його мРНК зростав у 5 разів ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і в 3 рази ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних щурів. Глібенкламід під час вагітності, що давався самкам щурів, пригнічував транскрипцію гена *Nlrp3* у віці 1 міс. (в 5,3 рази,  $p < 0,05$ ) але цей показник залишався незмінним у старших щурів. Щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-клітин у БЛВ нащадків щурів з ЕГД зростала, більш виражено на ранніх термінах спостереження. Введення глібенкламід знижувало кількість NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів виключно у віці 1 міс. (на 33 %, коркове плато), позаяк у 6-місячних нащадків їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростала.

Достеменно відомо, що саме брижові лімфатичні вузли (БЛВ) є ключовим місцем формування периферичної імунологічної толерантності до великої кількості різноманітних антигенів, в тому числі і панкреатичних [29], а також основним транзиторним пунктом для пула рециркулюючих лімфоцитів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ). Головними регуляторами “хоумінга” лімфоцитів в БЛВ є адресин MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1) – молекула адгезії венул з високим ендотелієм лімфоїдних утворень КАЛТ, хемокінові рецептори CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) і CCR7 (C-C chemokine receptor type 7), лігандами для яких відповідно є CXCL12 та CCL19 і CCL21. Хемокін-хемокін рецепторна взаємодія між парами CCL19/21-CCR7 та CXCL12-CXCR4, а також MAdCAM-1 та його лігандом інтегрином  $\alpha 4\beta 7$  регулюють потрапляння в ЛВ більшості імунних клітин. Так, вхід Т-клітин в ЛВ порушується при відсутності CCR7-сигналізації, в тому числі

у *plt/plt* мишей, які не мають CCL21, а також CCL19 [33]. В свою чергу, вихід лімфоцитів з БЛВ регулюється сфінгозин-1-фосфат (S1P) рецепторами (S1PR1–S1PR5) [34], серед яких лімфоцитами найбільш активно експресується 1 тип – S1PR1 [35]. Після активації імунних клітин в БЛВ експресія S1PR1 на їх мембрані зростає і це дозволяє лімфоцитам виходити з лімфатичних вузлів за градієнтом S1P [156].

Роль CCR7 сигналізації значна у підтримці Т-клітинного гомеостазу у лімфатичних вузлах різних груп, а також у активації різних субпопуляцій Т-хелперів [157]. Так, CCR7 має важливе значення в функціонуванні Т-регуляторних лімфоцитів і грає при цьому подвійну роль: індуковані Treg потребують експресію CCR7 для їх ефективного праймування в ЛВ [158]; а "ефекторні" Treg, вочевидь, використовують CCR7 для виходу з тканин і саме CCR7 обмежує їх накопичення у периферійних тканинах [159]. Незважаючи на те що загальна чисельність Treg в тимусі у CCR7-нокаутних мишей і мишей дикого типу однакова, їхні супресорні функції на периферії порушені внаслідок неспроможності потрапляти в лімфатичні вузли і позиціонувати себе в межах Т-клітинних зон ЛВ [160]. Нещодавнє дослідження Mackley та ін. показало, що міграція групи вроджених ROR $\gamma$ -лімфоцитів з кишківника в БЛВ теж є CCR7-залежною [161], причому такі клітини цілеспрямовано мігрують саме в БЛВ, а не в інші групи ЛВ. CCR7 $^{-/-}$  миші більш сприйнятливі до інфекцій, що викликаються *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania donovani* и *Toxoplasma gondi* [162], демонструють збільшення лімфоцитарної інфільтрації периферичних тканин і панкреатичних острівців, порушення у центральній і периферичній толерантності до власних антигенів та дефекти функціонування Treg клітин, що призводить до розвитку поліорганних автоімунних реакцій [163]. Це супроводжується збільшенням титру циркулюючих автоантитіл до великої кількості тканинспецифічних антигенів, а також утворенням ектопічних третинних лімфоїдних структур на слизових оболонках [164]. Shan та ін. встановили важливу роль CCR7 в залученні Т-клітин в панкреатичні острівці у NOD-мишей [165], за допомогою RT-PCR показали інтенсивну експресію мРНК



CCR7 та його лігандів CCL19 и CCL21 в запалених, але не в інтактних острівках. При вимкненні CCR7-сигналізації блокувалась міграція біля 75 % Т-клітин з крові до панкреатичних острівків, але це не чинило жодного впливу на міграцію В-лімфоцитів в острівки. Одержані результати вказують на те, що CCR7 і його ліганди відіграють важливу роль у залученні Т-клітин в острівці і, таким чином, у патогенезі ЦД1. У ряді робіт показана роль CCR7-сигналізації в формуванні оральної толерантності до різних АГ – оральну толерантність не вдається індукувати у CCR7-дефіцитних мишей внаслідок порушення міграції ДК з власної пластинки слизової оболонки кишківника в БЛВ [69].

Виявлено зростання рівня мРНК ще одного з регуляторів хоумінгу лімфоцитів в БЛВ – MAdCAM-1, що підтверджене результатами робіт в яких показано, що РНК транскрипти MAdCAM-1 добре експресуються в ендотелії як лімфоїдної, так і нелімфоїдних тканин, зокрема у тонкому і товстому кишківнику, мезентеріальних і панкреатичних лімфовузлах, селезінці [166]. Характерно, що ця експресія підвищується у відповідь на дію прозапальних цитокінів, у тваринних моделях запальних захворювань кишківника і у пацієнтів з хворобою Крона і виразковим колітом. MAdCAM-1 ексклюзивно експресований у венулах з високим ендотелієм БЛВ, але не периферичних ЛВ [167]. Даних про експресію MAdCAM-1 саме в БЛВ у нащадків, народжених від матерів з ЕГД, немає. Достеменно відомо з досліджень, що для міграції В-клітин у панкреатичні лімфатичні вузли у нетучних діабетичних (NOD) мишей, вкрай важлива адгезія лімфоцитів, яка регулюється системою  $\alpha 4\beta 7$  інтегрин/MAdCAM-1. Так, в В-лімфоцитах ПЛВ NOD-мишей віком 3–4 тижні спостерігається високий рівень експресії інтегрину  $\alpha 4$  та LFA-1 і проміжний рівень інтегрину  $\beta 7$ . В дослідженні *in vivo* було продемонстровано, що В-клітини мігрували з кровотоку більш ефективно в ПЛВ, ніж в периферичні ЛВ. Окрім того, наявність антитіл до MAdCAM-1 та інтегрину  $\alpha 4\beta 7$  пригнічувала міграцію більше 90 % В-лімфоцитів в ПЛВ [168]. Одноразова внутрішньочеревна ін'єкція анти-MAdCAM-1 антитіл 3-тижневим NOD-мишам значно сповільнювала надходження В-лімфоцитів в ПЛВ протягом принаймні 2 тижнів. Ці результати

демонструють, що  $\alpha 4\beta 7$  інтегрин/MAdCAM-1 шлях адгезії відіграє важливу роль в міграції В-лімфоцитів в ПЛВ у мишей лінії NOD і може бути потенційною мішенню для терапії ЦД1. Значення MAdCAM-1 у розвитку цього типу діабету показано і в іншому дослідженні. Так, реактивні до панкреатичних острівців  $CD4^+$ -клітини здатні ініціювати розвиток діабету першого типу при перенесенні їх новонародженим NOD мишам, але не викликають його у дорослих тварин. Дані відмінності обумовлені неоднаковим рівнем експресії MAdCAM-1 в панкреатичних острівцях у новонароджених і дорослих мишей [169]. Крім того, блокада цього адресину перешкоджає індукцію діабету у новонароджених мишей (рис. 7.1).

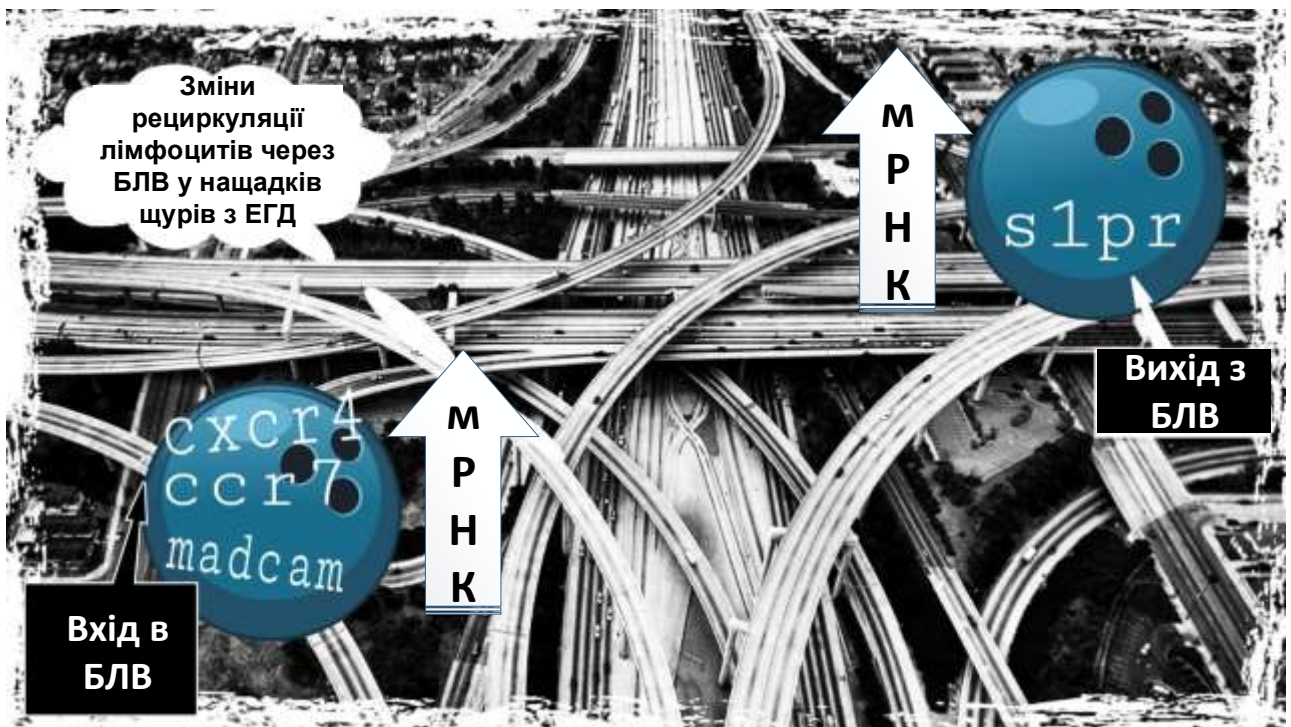


Рисунок 7.1 – Регулятори «хоумінгу» лімфоцитів.

На останньому етапі хоумінгу лімфоцитів в ЛВ важливу роль відіграє ще один хемокіновий рецептор - CXCR4, також відомий як фюзин або CD184, що зв'язується зі специфічним лігандом, молекулою SDF-1 (stromal-derived factor). В нормі SDF-1 виробляється стромальними клітинами багатьох тканин, а CXCR4 експресується на поверхні  $CD4^+$  Т-клітин, дендритних клітин і В-лімфоцитів. В

БЛВ у нащадків щурів з ЕГД не виявили зміни рівня мРНК CXCR4, хоча в інших роботах було показано, що сигнальний шлях CXCR4/CXCL12 захищає мишей лінії NOD від автоімунного діабету. Рівні мРНК CXCR4 були збільшені в ПЛВ 4-тижневих NOD-мишей порівняно з мишами Balb/C [170]. Значне зниження рівня експресії CXCR4 було помічено у тварин віком 12 тижнів і в рівнях мРНК, і в рівнях білку, в той час як збільшувався їх вміст в панкреатичних острівцях. Введення AMD3100, антагоніста CXCR4, зменшувало кількість CXCR4<sup>+</sup> і SDF1-позитивних клітин у запалених острівцях і надавало захисні ефекти проти автоімунного діабету. У той же час, рівень транскрипції CXCL12, ліганду Cxcr4, значно підвищується в кістковому мозку NOD мишей в порівнянні з мишами ліній Balb/c і C57BL/6. Введення NOD-мишам AMD3100 мобілізує регуляторні Т-клітини і гематопоетичні стовбурові клітини кісткового мозку на периферію, пригнічує інсуліт і уповільнює початок діабету [171]. Трансгенні миші, що надекспресують SDF-1, є стійкими до стрептозоцин-індукованого апоптозу  $\beta$ -клітин і розвитку діабету, тоді як MIN6, ще один антагоніст CXCR4, викликає їх апоптоз, збільшує продукцію АФК, знижує рівень експресії анти-апоптотичного білка Bcl-2 і фосфорилування проапоптотичного білка Bad [172].

Інгібування S1PR на Т- або В-лімфоцитах (FTY720, fingolimod) робить ці клітини нечутливими до зміни градієнту концентрації S1P між лімфатичними вузлами і біологічними рідинами і, тим самим, забезпечує опосередковану рецепторами CCR7 затримку циркулюючих лімфоцитів у лімфатичних вузлах [173]. FTY720 продемонстрував свою ефективність в кількох моделях імунологічних захворювань, в тому числі ревматоїдного артриту, міастенії, розсіяного склерозу, ЦД1 [174]. Виявлене підвищення рівня експресії мРНК S1PR1 в лімфоцитах БЛВ може відігравати важливу роль у розвитку ЦД. Так, припинення виходу лімфоцитів з ПЛВ за допомогою агоніста S1P рецепторів FTY720 у мишей лінії NOD запобігає подальшій прогресії діабету навіть під час значного інсуліту [175], при цьому після його застосування в острівкових CD8-лімфоцитах не зростає рівень експресії цитотоксичних молекул гранзиму В, інтерферону  $\gamma$ , і CD107a [176]. Мезентеріальна лімфаденектомія значно знижує

розмір популяції Th17-лімфоцитів у кишківнику. Введення FTY720 індукує накопичення  $\alpha 4\beta 7^+$  IL-17A<sup>+</sup> проліферуючих клітин в БЛВ [177].

Лі та ін. показали, що при ГД у нащадків збільшується продукція IL-1 $\beta$  клітинами селезінки [46], що свідчить про активацію NLRP3-інфламасоми – представника сімейства NOD-подібних рецепторів вродженої імунної відповіді (nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors, NLRs) [178]. Активація NLRP3-інфламасоми при ГД була показана і в інших дослідженнях [38], а активна участь NLRP3 в широкому діапазоні захворювань робить її вельми бажаним об'єктом для фармацевтичного впливу. В останні роки були описані численні перспективні інгібітори активації інфламасоми [39, 112], але особлива увага була приділена глібенкламїду, який поряд з метформіном і інсуліном може ефективно коригувати гіперглікемію у вагітних. Глібенкламїд був першим пероральним препаратом протестованим та використаним для контролю ГД [90]. Численні мета-аналізи показали, що адекватний глікемічний контроль може бути досягнутий з глібенкламїдом у багатьох жінок з ГД, при цьому знижується кількість гіперглікемія-асоційованих наслідків [179–180]. Але найбільш інтригуючим була здатність глібенкламїда інгібувати утворення NLRP3-інфламасоми, що вперше було виявлено у 2009 році [181]. Ці результати пізніше були підтвержені і в інших роботах [182–183].

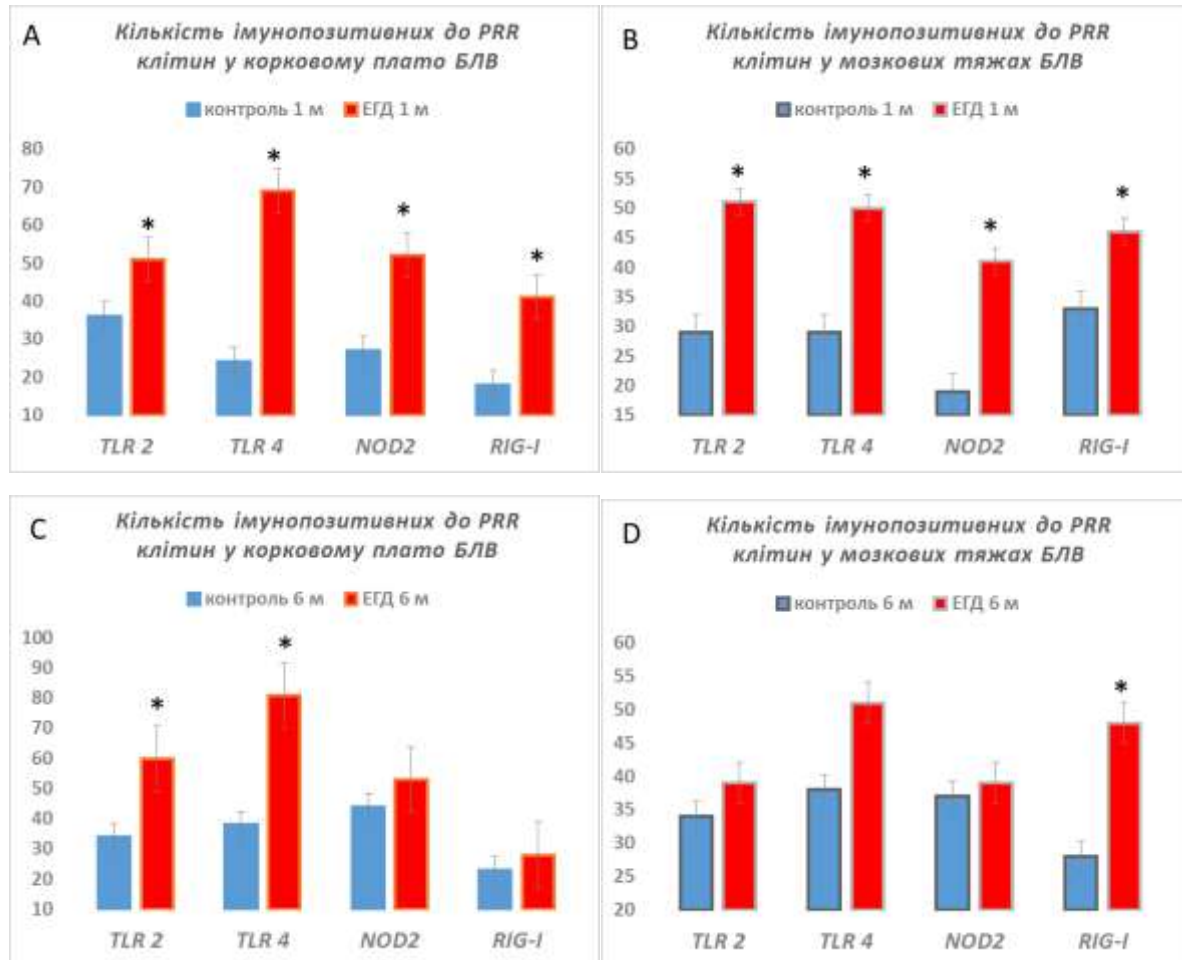
Запропоновано декілька моделей активації NLRP3-інфламасоми, які детально описані Schroder та ін. [110]. У першій моделі, позаклітинний АТФ, який діє в якості агоніста NLRP3, індукує вихід K<sup>+</sup> через пурін-P2X7-залежну пору, що призводить до активації і складання NLRP3-інфламасоми. Відповідно до цієї моделі, вихід K<sup>+</sup> є одним з основних активаторів інфламасоми У другій моделі, за участю PAMPs (патоген-асоційованих молекулярних паттернів) і DAMPs (молекулярних паттернів, асоційованих з пошкодженнями), в тому числі і активаторів, згаданих вище, викликається генерація активних форм кисню (АФК), які в свою чергу викликають збірку NLRP3-інфламасоми [184]. У третій моделі, складання і активація інфламасоми NLRP3, як вважають, викликають зовнішні подразники (такі як діоксид кремнію, азбест, амілоїд- $\beta$  і галун) які

утворюють кристалічні структури, охоплені фагоцитами. Ці агрегати викликають лізосомальні розриви і вивільнення вмісту лізосом за допомогою механізму, опосередкованого катепсином В [185]. Інші фактори також можуть активувати NLRP3-інфламасому. До них відносяться пошкодження мітохондрій або їх дисфункція спричинена перевантаженням мітохондрій  $Ca^{2+}$ , лізосомальні порушення, аутофагічна дисфункція та активність тіоредоксин-взаємодіючого білку (TXNIP) [186].

Інфламасома традиційно розглядалася в якості одного з найбільш істотних компонентів вродженого імунітету, необхідного для виявлення та усунення патогенів. Про роль NLRP3-інфламасоми в функціонуванні адаптивних імунних клітин не було нічого відомо. Останнім часом з'явилися докази прямої експресії NLRP3 лімфоцитами мишей і людини [107] і її здатність корегувати диференціювання Th1, Th2 Th17-клітин. Так, нещодавно Arbore та ін. показали, що NLRP3 активно експресується в  $CD4^+$  Т-клітинах людини, та ініціює активність каспаза-1-залежної секреції інтерлейкіна- $1\beta$ , сприяючи виробленню гамма-інтерферону та диференціювання Т-хелперів 1 типу (Th1) аутокринним шляхом [108]. Ненормальна активність NLRP3-інфламасоми в Т-клітинах впливає на розвиток запальних і аутоімунних захворювань у людей та в мишачих експериментальних моделях запалення та інфекції. Вочевидь, діяльність NLRP3-інфламасоми не обмежується "вродженими імунними клітинами", а є невід'ємною частиною нормальних адаптивних Th-відповідей. Порушення активності NLRP3 в  $CD4^+$  Т-клітинах при експериментальних моделях колітів призводить до неконтролюємої інфільтрації кишківнику Th17 клітинами та загостренню захворювання. Таким чином, аутокринна активність NLRP3-інфламасоми в лімфоцитах контролює Th1-Th17 баланс в умовах експериментальних запальних захворювання кишківника. Крім того, Bruchard та ін. нещодавно показали здатність NLRP3 діяти в якості ключового фактора транскрипції, що керує Th2-диференціювання. В Th2-клітинах NLRP3 зв'язується з промотором IL4 і трансактивує його в сукупності з фактором транскрипції IRF4 [109]. На відміну від Th1, у яких NLRP3 за допомогою методів

іммунофлуоресцентної мікроскопії виявляється головним чином в цитоплазмі, в Th2-клітинах вона локалізована переважно в ядрі. Можливо, що така ядерна локалізація може сприяти транскрипційній функції інфламасоми. Ця робота показала, що NLRP3 слід розглядати не лише як ключовий компонент інфламасоми, але і як фактор транскрипції в клітинах CD4<sup>+</sup> Th2. І, нарешті, механізми IL-1 $\beta$ -індукованої Th17 диференціації пов'язані зі здатністю TGF- $\beta$  індукувати експресію ROR $\gamma$ t в наївних T-клітинах [187]. Дослідження *in vitro* показали, що IL-1 $\beta$  індукує експресію IRF-4, що позитивно регулює IL-21-опосередковану експресію факторів транскрипції STAT-3 і ROR $\gamma$ t [188]. Крім того, роль IL-1 в індукції фенотипу Th17 було приписано альтернативному сплайсингу Foxp3 [189].

У той же час, NLRP3-інфламасоми є одним з сенсорів метаболічного стресу, що розвивається при діабеті [110]. NLRP3-дефіцитні NOD-миші захищені від розвитку ЦД шляхом зниження міграції діабетогенних лімфоцитів в панкреатичні островці, у них зменшена кількість CD4<sup>+</sup> T-клітин, CD19<sup>+</sup> B-клітин та CD11b<sup>+</sup> АПК в селезінці і PLN, але не в тимусі [111]. Дослідження виявили два однонуклеотидних поліморфізмів в NLRP3, які пов'язані з ЦД1 [190], а Carlos та ін. показали зростання експресії NLRP3 в панкреатичних лімфатичних вузлах (ПЛВ) у діабетичних мишей без ожиріння [191]. Аналогічне збільшення експресії гена NLRP3 спостерігалось і в умовах STZ-індукованого діабету у мишей лінії C57BL/6. Крім того, діабетичні миші C57BL/6 також демонстрували зменшення IL-17-продукуючих CD4 і CD8 T-клітин (Th17 і Tc17) і IFN $\gamma$ -продукуючих CD4 і CD8 T-клітин (Th1 і Tc1) в ПЛВ. Цікаво відзначити, що діабетичні миші показали збільшення експресії генів, пов'язаних з мітохондріальною ДНК, таких як цитохром b і цитохромом c. Мітохондріальна ДНК (mDNA) від діабетичних мишей індукувала продукцію IL-1 $\beta$  і активацію каспази-1 макрофагами, але була редукована в NLRP3<sup>-/-</sup>-макрофагах. І, нарешті, введення mDNA *in vivo* збільшувало кількість продіабетичних Th17/Tc17/Th1/Tc1 клітин в ПЛВ, але також було скасовано у NLRP3<sup>-/-</sup>-мишей [191].



Примітка. Достовірність  $p < 0,05$  (\*)

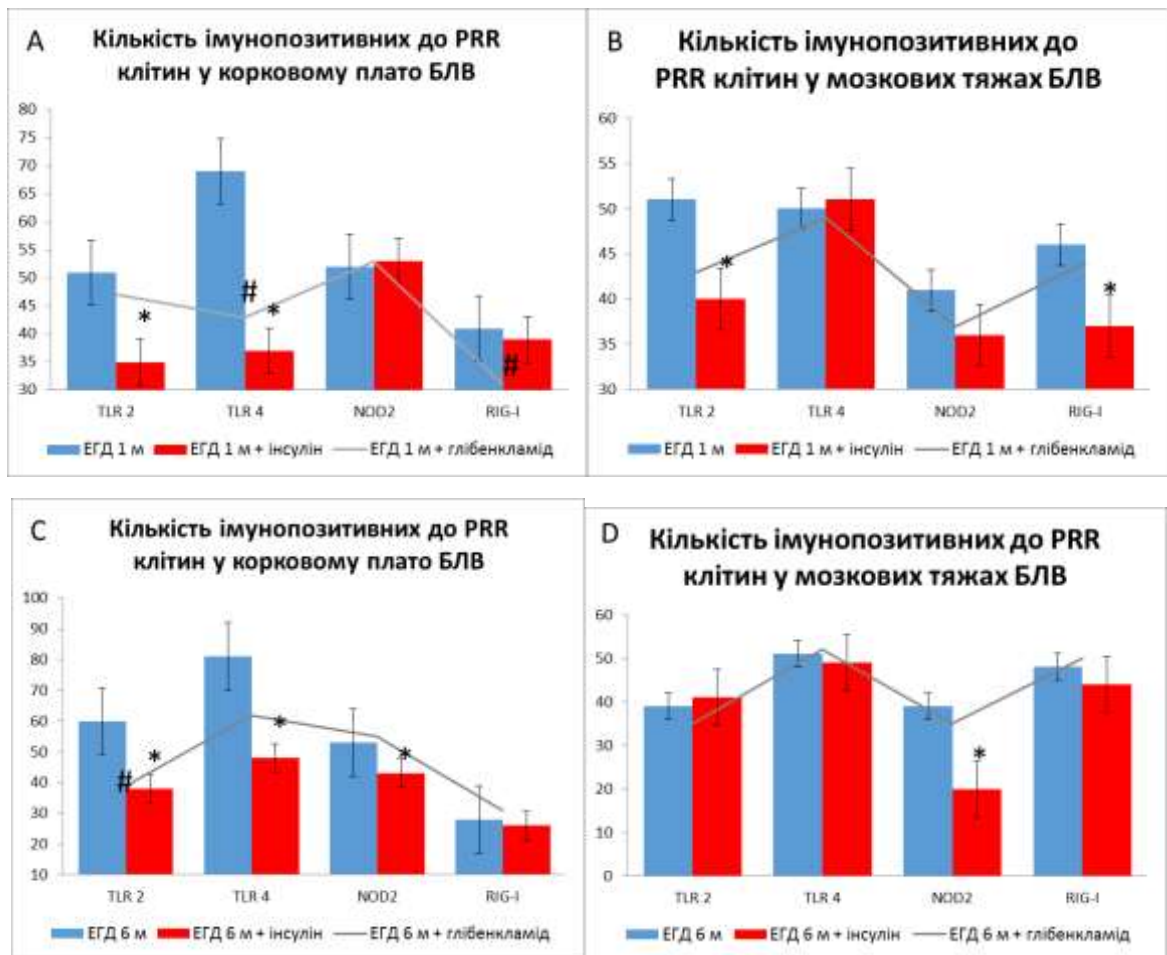
Рисунок. 7.2 – Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (А, С) та мозкових тяжках (В, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після EGД.

NLRP3-інфламасоми є важливою фармакологічною мішенню для блокування цілої низки ускладнень діабета [192], а здатність глібенкламіда інгібувати утворення NLRP3 може впливати на ризик розвитку запальних і автоімунних захворювань у нащадків від матерів з ГД. Нещодавнє дослідження Lampranou та ін. продемонструвало, що глібенкламід захищає NOD мишей від прогресування гіперглікемії, а також від втрати інсулінпродукуючих  $\beta$ -клітин. Хоча введення глібенкламіда і не зупиняє розвиток інсуліту, але індукує зсув фенотипу імунних клітин, захищає мишачі клітини інсуліноми MIN6 від апоптозу і втрати коннексину Cx36 [125].

Наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 5, полягав у вивченні розподілу рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, NOD2 і RIG-I серед лімфоцитів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, після введення глібенкламід, в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну. Було показано, що саме пренатальна гіперглікемія веде до збільшення кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, більш вираженого протягом 1 місяця життя, змінює щільність PPP на імунних клітинах (рис. 7.2). В процесі формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних щурів у корковому плато БЛВ зменшується чисельність TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-клітин, а у мозкових тяжках – TLR2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>- лімфоцитів. Поступове зменшення кількості PPP-позитивних клітин у корковому плато БЛВ спостерігається до 6-місячного віку, ця динаміка супроводжується переважним зменшенням щільності мембранних і концентрації цитоплазматичних РВІ в обох вікових групах, переважно в лімфобластах. Пероральні введення глібенкламід вагітним самкам щурів зменшують у корковому плато БЛВ 1-місячних нащадків кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів, а у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів та взагалі не впливають на їх чисельність та розподіл у мозкових тяжках (рис. 7.3).

Ці результати вказують на те, що TLR2- і TLR4-опосередкована сигналізація є однією з важливих ланок патогенезу ЕГД. Щодо виявленого збільшення кількості NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, то це може свідчити, що не лише мембранні толл-подібні рецептори, але і цитоплазматичні сенсори вродженої імунної системи можуть грати важливу роль у патогенезі імунних порушень у них.





Примітка. Достовірність  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 7.3 – Щільність імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (A, C) та мозкових тяжах (B, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламіду вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

Отримані результати узгоджуються з іншими даними щодо здатності ГД чинити значний вплив на лише на імунні процеси у матері, але і у нащадків [193]. У досліджах доведена роль TLR4 у пацієнтів з гестаційним цукровим діабетом (ГД). Рівні експресії TLR4 у моноцитах материнської периферичної крові та рівні TNF- $\alpha$  у сироватці були підвищені у жінок з ГД у порівнянні з здоровими вагітними жінками. Ці результати вказують на те, що TLR4-опосередковане вивільнення запальних цитокінів може бути одним із факторів, що приводить до підвищення рівня глюкози у пацієнтів з ГД [52]. Крім того, можна стверджувати, що TLR4 є однією з ланок патогенезу ГД. Це підтверджується і результатами по

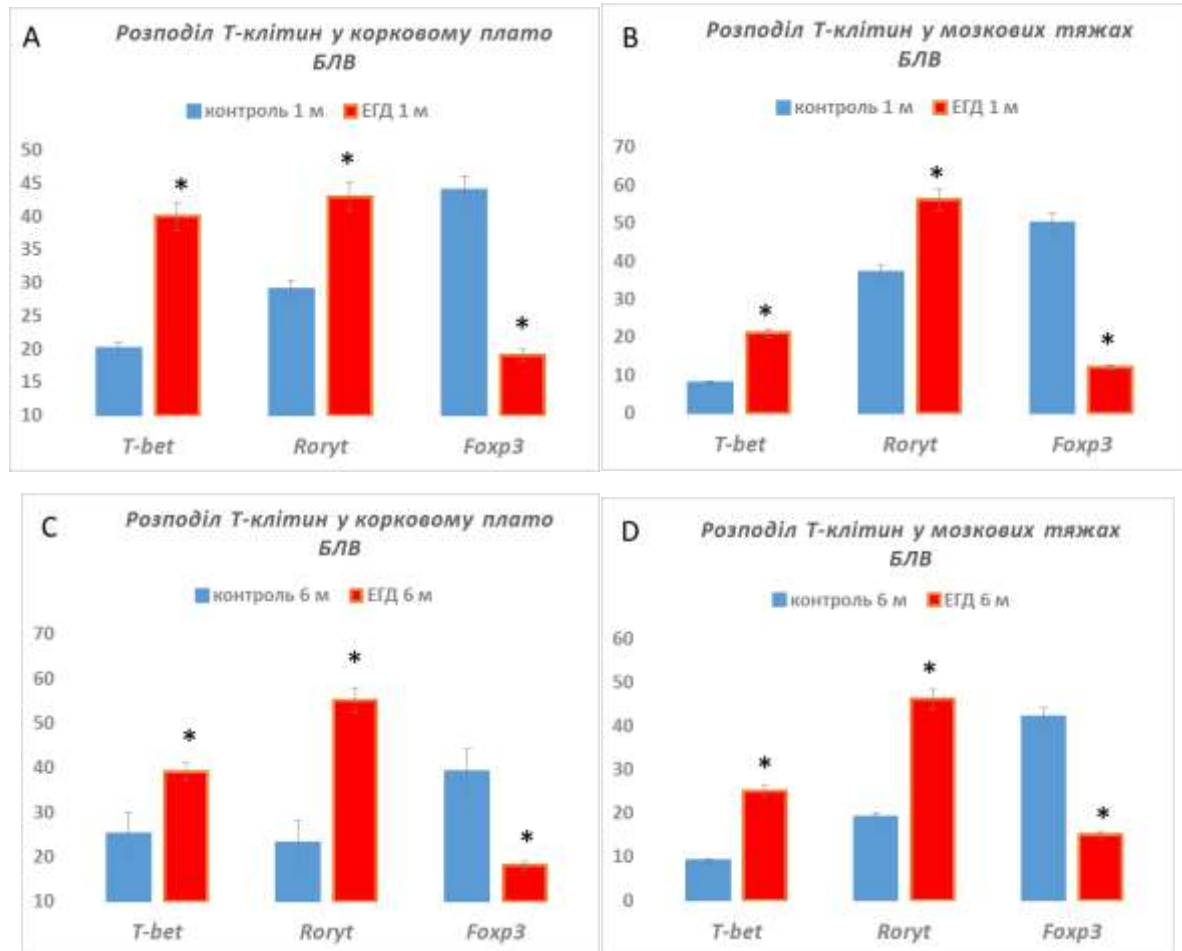
підвищенню рівня мРНК TLR2 і TLR4 у моноцитах периферичної крові у жінок з ГД, як одного з показників ранніх метаболічних порушень в умовах розвитку ГД [53].

Дані про зміни експресії РВІ у нащадків від матерів з ГД взагалі майже відсутні. Зокрема, Лі та ін. продемонстрували, що у нащадків щурів з ЕГД підвищується рівень продукції прозапального цитокіну IL-1 $\beta$  клітинами селезінки [46] і ці ефекти є TLR4- та TLR2-залежними. Про роль TLR-рецепторів в розвитку імунних порушень у нащадків йдеться і в роботі Yanaі та ін. [54]. Дані їх дослідження вказують на те, що діабет індукує надмірну прозапальну активацію у новонароджених через TLR5- або TLR1/2-опосередковану вроджену імунну відповідь.

Щодо виявленого збільшення кількості NOD2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, то це може свідчити, що не лише мембранні толл-подібні рецептори, але і цитоплазматичні сенсори вродженої імунної системи можуть грати важливу роль у патогенезі імунних порушень у них. Така надмірна активація РВІ, на нашу думку, може бути викликана щонайменше двома факторами: по-перше, в умовах розвитку ГД у людини і ЕГД у експериментальних тварин спостерігаються значні порушення складу кишкового мікробіому як у матері, так і у нащадків [194], що суттєво змінює рівень лігандів для ПРР [195]; по-друге, ЕГД супроводжується змінами метаболічного профілю у нащадків, що включають зміни метаболізму амінокислот, біосинтезу стероїдних гормонів, метаболізму гліцерофосфоліпідів та жирних кислот, які теж можуть розпізнаватися РВІ [196].

З іншого боку, БЛВ – це основне місце для індукції оральної толерантності (ОТ) серед інших лімфоїдних тканин. Як відомо, ОТ не може бути індукована у мишей, позбавлених БЛВ, але це не впливає на тварин, в яких було видалено пейерові бляшки [197]. Наша спроба сформувати оральну толерантність до інсуліну свідчить, що у 1-місячних нащадків зменшується чисельність клітин, експресуючих РВІ як у КП, так і у МТ БЛВ. При цьому динаміка по зменшенню кількості клітин, імунопозитивних до ПРР у КП БЛВ зберігається і до 6-

місячного віку. Ці результати узгоджуються і з даними Vonifacio та ін. які провели дослідження з метою оцінки імунної відповіді в умовах перорального введення інсуліну дітям з генетичним ризиком розвитку ЦД1 [198].

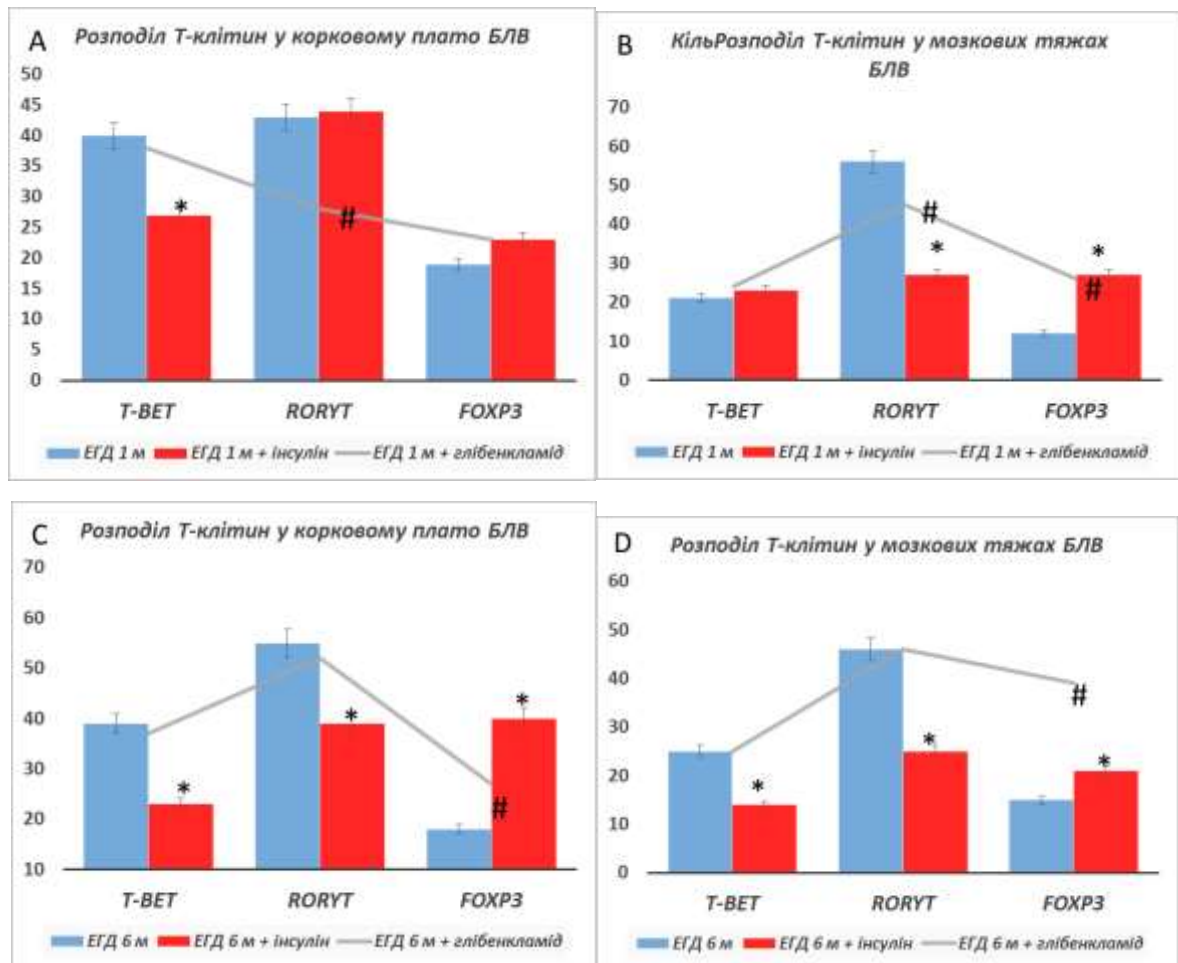


Примітка. Достовірність  $p < 0,05$  (\*)

Рисунок 7.4 – Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (A, C) та мозкових тяжах (B, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД.

Наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 6, полягав у вивченні динаміки клітинного складу субпопуляцій Т-хелперів, а саме  $T\text{-bet}^+$  ( $\text{Th}1$ ),  $ROR\gamma t^+$  ( $\text{Th}17$ ) та регуляторних  $Foxp3^+$ -лімфоцитів ( $\text{Treg}$ ) в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД. У дослідженнях показано, що пренатальна гіперглікемія призводить до збільшення кількості  $T\text{-bet}^+$ - і  $ROR\gamma t^+$ -клітин в БЛВ у нащадків

щурів з ЕГД, а також призводить до зниження кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та змінює щільність ПРР на імунних клітинах (рис. 7.4).



Примітка. Достовірність  $p < 0,05$  (\*, #)

Рисунок 7.5 – Щільність імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (А, С) та мозкових тяжах (В, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів лінії Wistar: у нормі, після ЕГД, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам.

При формуванні оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків зменшується чисельність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у корковому плато БЛВ, а в мозкових тяжах – RORγt<sup>+</sup>-клітин. А у віці 6 місяців можна стверджувати про значне зменшення сумарної щільності T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>- на фоні зростання кількості Foxp3<sup>+</sup>-клітин. Введення глібенкламід у вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, призводить до зниження у БЛВ 1-місячних

та 6-місячних нащадків кількості лише  $\text{ROR}\gamma\text{t}^+$ -клітин. Також збільшується кількість  $\text{Foxp3}^+$ -клітин (рис. 7.5).

Інтранатальна гіперглікемія при ГД, впливає на морфогенез органів імунної системи, що, в свою чергу, може призводити до порушень формування імунологічної толерантності до панкреатическим антигенів і розвитку цукрового діабету 1 типу у нащадків. Серед можливих методів специфічної профілактики ЦД1 одним з перспективних шляхів є розвиток оральної толерантності (ОТ) до інсуліну, як основного  $\beta$ -клітинного антигену [37]. Ключовим місцем для індукції ОТ є брижові лімфатичні вузли (БЛВ), в яких відбувається інтенсивна активація наївних Т-хелперів і їх диференціювання в субпопуляції ефекторних клітин [47]. Одним з найважливіших факторів генерації регуляторних лімфоцитів (Трег) є транскрипційні фактор  $\text{Foxp3}$ . Брак лімфоцитів цього класу призводить до дефіциту супресорної сигналізації і виникненню різних аутоімунних захворювань, в тому числі і ЦД1.

Становлення периферичної імунної толерантності (ПТТ) може відбуватися системно після надходження антигенів з їжею, але немає ніяких підстав сумніватися в тому, що це відбувається в основному в межах локальної імунної системи слизової оболонки. БЛВ – це основне місце для індукції оральної толерантності (ОТ) серед інших лімфоїдних тканин. Презентація харчових антигенів відбувається безпосередньо в БЛВ, а не пейєрових бляшках (ПБ) та дрібних лімфоїдних структурах кишкової стінки [31]. ОТ неможливо індукувати у мишей з видаленим БЛВ, але вона успішно була сформована у тварин, в яких було вилучено ПБ. Крім того, було показано, що дендритні клітини (ДК) стабільно мігрували з кишкового епітелію і ПБ в БЛВ, так що є чіткий механізм, згідно з яким антиген з поверхні епітелію шлунково-кишкового тракту доставляється в БЛВ, де відбувається Т-клітинне становлення імунної толерантності [199]. Найбільш показовим доказом є дослідження Worbs та ін. які демонструють, що у мишей БЛВ є обов'язковими і єдиними місцями індукції оральної толерантності [69]. Зокрема, проліферація Т-лімфоцитів з трансгенним Т-клітинним рецептором після орального введення антигену спостерігається вже

через 2 дні в БЛВ, але не раніше 4-го дня в периферичних лімфатичних вузлах мишей. Використання препарату FTY720 (блокатор еміграції лімфоцитів з ЛВ) або хірургічне видалення БЛВ порушувало цей процес. Автори використовували дві експериментальні системи, щоб показати, що антигеннавантажені ДК, мігруючи з кишкової стінки до БЛВ можуть викликати толерантність БЛВ-резидентних Т-клітин. Перша: тварина з пересадженим кишківником, в якому кровоносні судини анастомозовані з господарем, а лімфатична система відділена. Пероральне введення білка активувало Т-клітини тільки в господаря, а не в трансплантованих БЛВ, які необхідно було стимулювати. Друга: миші, дефіцитні по хемокіновим рецепторам CCR7, що порушувало міграцію ДК в БЛВ. У цієї групи були відсутні, як Т-клітинна стимуляція, так і функціональна оральна толерантність. Ці експерименти демонструють, що ОТ генерується виключно в БЛВ з антигенами, які транспортуються ДК з поверхні кишківника через аферентні лімфатичні судини.

З іншого боку, клінічним проявам ЦД1 передують поява аутоантитіл до різних острівцевих аутоантигенів, демонструючи втрату імунологічної толерантності до  $\beta$ -клітин. Розвиток ЦД1 у осіб з множинними острівцевими аутоантитілами практично неминучий, це додатково збільшує інтерес до спроб втрутитися в процес хвороби до розвитку гіперглікемії. Більшість досліджень, в процесі яких були проведені спроби індукувати ОТ до інсуліну охоплювали пацієнтів з нещодавно виявленим ЦД1 (як правило, протягом 6 тижнів від постановки діагнозу), мали вельми обмежений успіх [200]. Цей результат можна частково пояснити стадією захворювання і прогресуючою втратою  $\beta$ -клітин, на додаток до поганого контролю глікемії і метаболічного стресу  $\beta$ -клітин під впливом запалення. На жаль, кілька спроб запобігти ЦД1 за допомогою імунотерапії у серопозитивних осіб, схильних до ризику захворювання не увінчалися успіхом. На наш погляд, існують кілька пояснень цих невдач, в тому числі тип лікарського засобу або острівцевих аутоантигенів, дозування і способу введення. Але найбільш привабливим і простим рішенням імовірно може бути первинна профілактика – до виникнення сероконверсії, саме тому було обрано

такий шлях. Правильність такого підходу підтверджується і попередніми результатами дослідження Bonifacio та ін. які провели подвійне сліпе, плацебо-контрольоване, дозозалежне, клінічне експериментальне дослідження з метою оцінки імунної відповіді і побічних ефектів, пов'язаних з перорально введеним інсуліном у здорових, аутоантитіл-негативних дітей, з генетичним ризиком розвитку ЦД1 [198]. Цей метод виявився безпечним, без будь-яких вагомих побічних ефектів, пов'язаних з лікуванням. Не було зафіксовано жодного епізоду гіпоглікемії (незважаючи на щоденну дозу інсуліну до 67,5 мг), алергічних реакцій або небажаної індукції аутоімунітету до островців. Замість того, спостерігалися CD4<sup>+</sup>-Т-клітинні проліферативні реакції на інсулін Т-регуляторного типу, що підтверджувалося транскриптомним аналізом клонових CD4 Т-лімфоцитів, що реагують на інсулін або проінсулін і знаходженням Foxp3 [201]. Використання слизової оболонки є привабливим шляхом лікування для введення антигенів як толерогенів, особливо у молодих і здорових дітей. У тваринних моделях, оральне або інтраназальне введення антигену також може викликати специфічне імунне регулювання толерогенного напрямку [78]. Наші результати також підтверджуються даними про те, що зниження рівня експресії мРНК Deaf1 в умовах стрептозотоцин-індукованого діабету інгібує диференціювання Foxp3<sup>+</sup>-регуляторних Т-клітин в панкреатичних лімфатичних вузлах щурів [202].

На нашу думку, можливо виділити декілька ключових механізмів порушень формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (Рис.7.6.): транскрипційна репресія гена Aire, зниження рівня мРНК Deaf1 порушують ектопічну транскрипцію в БЛВ панкреатичних антигенів; зниження рівня мРНК Foxp3 і кількості Т-регуляторних клітин призводить до дефіциту супресорної сигналізації, що підтверджується також пригніченням експресії генів супресорного цитокіну IL10 та негативної костимуляторної молекули Ctla4.





Рисунок 7.6 – Механізми порушень формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів.



## ВИСНОВКИ

Гестаційний цукровий діабет – це порушення у вагітних толерантності до глюкози різного ступеня тяжкості, що є одним з чинників змін функціонування імунної системи їх нащадків. У дисертаційній роботі приведено експериментальне вирішення актуального наукового завдання патологічної фізіології, що полягає у встановленні механізмів змін функціонального стану лімфоцитів брижового лімфатичного вузла у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом, нащадків самиць з ЕГД після введення глібенкламід у та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

1. Гіперглікемія в ембріогенезі формує порушення імунотолерантності. У нащадків щурів з ЕГД розвиваються: репресія гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1* та транскрипційного фактору *Foxp3*; відбувається зниження кількості Т-регуляторних клітин через пригнічення експресії генів супресорного цитокіну *Il-10* і негативної коstimуляторної молекули *Ctla4*. Пероральне введення інсуліну в перші 2 тижні нівелює ці зміни за рахунок транскрипційної активації генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* та *Il10*.

2. У нащадків щурів з ЕГД в БЛВ спостерігається значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *S1pr1*, що супроводжується транскрипційною індукцією гена *Nlrp3*, рівень мРНК якого зростає в 5 разів у 1-місячних і в 3 рази у 6-місячних тварин; зростає щільність популяції *NLRP3*<sup>+</sup>-лімфоцитів більш виразно на ранніх термінах спостереження. Введення глібенкламід у під час вагітності пригнічує транскрипцію гена *Nlrp3* у нащадків лише у віці 1 місяця і не змінює у старшій віковій групі. Кількість *NLRP3*<sup>+</sup>-лімфоцитів у віці 1 міс. знижена, тоді як у 6-місячних нащадків їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає. Формування оральної толерантності до інсуліну супроводжується зниженням мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *S1pr1* в клітинах БЛВ.

3. Пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості *TLR2*<sup>+</sup>-, *TLR4*<sup>+</sup>-, *NOD2*<sup>+</sup>- і *RIG-I*<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків більш виразно на 1 місяці життя, та змінює щільність PPP на імунних клітинах. Введення глібенкламід у

вагітним самкам знижує у корковому плато БЛВ 1-місячних нащадків кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів, у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-клітин, у мозкових тяжках БЛВ не впливає на їх чисельність, але зменшує щільність ПРР на імунопозитивних лімфоцитах на ранніх термінах спостереження. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшується чисельність TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – TLR2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-клітин. Динаміка зменшення кількості клітин, імунопозитивних до ПРР у корковому плато БЛВ зберігається до 6-місячного віку, супроводжується переважним зменшенням щільності мембранних і концентрації цитоплазматичних РВІ в обох вікових групах, насамперед у лімфобластів.

4. Пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, більш виразно на 1 місяці життя, сприяє зменшенню кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та зміні щільність ПРР на імунних клітинах. Введення глібенкламиду вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, призводить до зниження у БЛВ 1-місячних та 6-місячних нащадків кількості RORγt<sup>+</sup>-клітин та збільшення Foxp3<sup>+</sup>-клітин. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшується чисельність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – RORγt<sup>+</sup>-клітин. У віці 6 місяців значно зменшується сумарна щільності T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Eades C.E., Cameron D.M., Evans J.M. Prevalence of gestational diabetes mellitus in Europe: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017. Vol. 129, P. 173-181.
2. Bashir M., Naem M., Taha F. et al. Outcomes of type 1 diabetes mellitus in pregnancy; effect of excessive gestational weight gain and hyperglycaemia on fetal growth. *Diabetes Metab Syndr.* 2019. Vol. 13(1), P. 84–88.
3. Schäfer-Graf U.M., Gembruch U., Kainer F. et al. Gestational Diabetes Mellitus (GDM) – Diagnosis, Treatment and Follow-U P. Guideline of the DDG and DGGG (S3 Level, AWMF Registry Number 057/008, February 2018). *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2018. Vol. 78(12), P. 1219–1231.
4. Nyangahu D.D., Lennard K.S., Brown B.P et al. Disruption of maternal gut microbiota during gestation alters offspring microbiota and immunity. *Microbiome.* 2018. Vol. 6(1), P. 124.
5. Ziegler SM, Feldmann CN, Hagen SH, et al. Innate immune responses to toll-like receptor stimulation are altered during the course of pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2018. Vol. 128, P. 30–37.
6. Pendeloski KP, Mattar R, Torloni MR et al. Immunoregulatory molecules in patients with gestational diabetes mellitus. *Endocrine.* 2015. Vol. 50(1), P. 99–109.
7. Metzger T., Anderson M. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol Rev.* 2011. Vol. 241, № 1. P. 89–103.
8. Carpino G, Puca R, Cardinale V, et al. Peribiliary Glands as a Niche of Extrapancreatic Precursors Yielding Insulin-Producing Cells in Experimental and Human Diabetes. *Stem Cells.* 2016. Vol. 34(5), P. 1332–42.
9. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K. Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. Vol. 101, P. 2458–2463.

10. Cohen JN, Tewalt EF, Rouhani SJ, et al. Tolerogenic properties of lymphatic endothelial cells are controlled by the lymph node microenvironment. *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9, № 2. P. 454–459.
11. Yip L, Fuhlbrigge R, Taylor C, 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.
12. Shevach E., Thornton A. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*. 2014. Vol. 259, № 1. P. 88–102.
13. Wang S, Gao X, Shen G, et al. Interleukin-10 deficiency impairs regulatory T cell-derived neuropilin-1 functions and promotes Th1 and Th17 immunity. *Sci. Rep* 6. 2016. P. 678.
14. Walker L.S., Sansom D.M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends Immunol*. 2015. Vol. 36, № 2. P. 63–70.
15. Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, et al. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J. Ex P. Med*. 2008. Vol. 205, P. 2483–2490.
16. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, et al. Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet*. 1997. Vol. 17, P. 393–8.
17. Kont V, Laan M, Kisand K et al. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol Immunol*. 2008. Vol. 45 P. 25–33.
18. Poliani PL, Kisand K, Marrella V, et al. Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells. *Am J Pathol*. 2010. Vol. 176, P. 1104–12.
19. Suzuki E, Kobayashi Y, Kawano O, et al. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes. *Autoimmunity*. 2008. Vol. 41, P. 133–139.
20. Gardner JM, Devoss JJ, Friedman RS, et al. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science*. 2008. Vol. 321, P. 843–847.

21. Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, et al. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med*. 2010. Vol. 207, P. 689–97.
22. Hubert FX, Kinkel SA, Webster KE, et al. A specific anti-Aire antibody reveals Aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J Immunol*. 2008. Vol. 180, P. 3824–32.
23. Zheng X, Yin L, Liu Y, Zheng P. Expression of tissue-specific autoantigens in the hematopoietic cells leads to activation-induced cell death of autoreactive T cells in the secondary lymphoid organs. *Eur J Immunol*. 2004. Vol. 34, P. 3126–3134.
24. Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, et al. Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J Exp Med*. 2010. Vol. 207, P. 681–688.
25. Yang S, Fujikado N, Kolodin D 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.
26. Geem D, Ngo V, Harusato A. et al. Contribution of Mesenteric Lymph Nodes and GALT to the Intestinal Foxp3+Regulatory T-Cell Compartment. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016. Vol. 2(3), P. 274–280.
27. Ma H., Tao W., Zhu S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2019. Vol. 16(3), P. 216–224.
28. Stagg A.J. Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front Immunol*. 2018. Vol. 9, P. 2883.
29. Macpherson A.J., Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med*. 2006. Vol. 203(3), P. 497–500.
30. Rezende R.M., Weiner H.L. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol*. 2017. Vol. 30, P. 3–11.
31. Kunkel D., Kirchhoff D., Nishikawa S. et al. Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice. *Eur. J. Immunol*. 2003. Vol. 33, P. 1292–1301.

32. Sricharunrat T., Pumirat P., Leungwutiwong P. Oral tolerance: Recent advances on mechanisms and potential applications. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2018. Vol. 36(4), P. 207–216.
33. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL et al. Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annu Rev Immunol.* 2016. Vol. 20, P. 203–42.
34. Spiegel S., Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011. Vol. 11(6), P. 403–415.
35. Rivera J., Proia R.L., Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008. Vol. 8(10), P. 753–63.
36. Sricharunrat T., Pumirat P., Leungwutiwong P. Oral tolerance:Recent advances on mechanisms and potential applications. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2018. Vol. 36(4), P. 207–216.
37. Weigmann B., Franke R.K., Daniel C. Immunotherapy in Autoimmune Type 1 Diabetes. *Rev. Diabet. Stud.* 2012. Vol. 9, P. 68–81.
38. Lappas M. Activation of inflammasomes in adipose tissue of women with gestational diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2014. Vol. 382(1). P. 74–83.
39. Netea M.G., Joosten L.A. Inflammasome inhibition: putting out the fire. *Cell Metab.* 2015. Vol. 21(4), P. 513–514.
40. Buckley B.S., Harreiter J., Damm P. et al. Gestational diabetes mellitus in Europe: prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review. *Diabet Med.* 2012. Vol. 29, P. 844–854.
41. Metzger B.E., Coustan D.R., Trimble E.R. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2008. Vol. 358, P. 1991–2002.
42. Crowther C.A., Hiller J.E., Moss J.R., et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2005. Vol. 352, P. 2477–2486.

43. Landon M.B., Spong C.Y., Thom E., et al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med.* 2009. Vol. 361. P. 1339–1348.
44. Damm P. Future risk of diabetes in mother and child after gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009. Vol. 104 (1) P. S25–S26.
45. Wojcik M., Zieleniak A., Zurawska-Klis M. Increased expression of immune-related genes in leukocytes of patients with diagnosed gestational diabetes mellitus (GDM). *Exp Biol Med (Maywood).* 2016. Vol. 241(5), P. 457–465.
46. Li Q, Pereira T.J., Moyce B.L., et al. In utero exposure to gestational diabetes mellitus conditions TLR4 and TLR2 activated IL-1beta responses in spleen cells from rat progeny. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis Of Disease.* 2016. Vol. 1862(11), P. 2137–2146.
47. Lapolla A., Dalfrà M.G., Sanzari M. et al. Lymphocyte subsets and cytokines in women with gestational diabetes mellitus and their newborn. *Cytokine.* 2005. Vol. 31, P. 280–287.
48. Johnstone F.D. Gestational diabetes. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine* 1999. Vol. 9, Issue 1. P. 23–28.
49. Assche F., Holemans K., Aerts L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *British Medical Bulletin.* 2001. Vol. 60, P. 173–182.
50. Mahmoud F., Abul H., Omu A. et al. Lymphocyte sub-populations in gestational diabetes. *Am J Reprod Immunol.* 2005. Vol. 53(1), P. 21–29.
51. Peng S., Li C., Wang X., et al. Increased Toll-Like Receptors Activity and TLR Ligands in Patients with Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Immunol.* 2016. Vol. 7, P. 578.
52. Xie B.G., Jin S., Zhu W.J. Expression of toll-like receptor 4 in maternal monocytes of patients with gestational diabetes mellitus. *Exp Ther Med.* 2014. Vol. 7(1), P. 236–240.
53. Kuzmicki M., Telejko B., Wawrusiewicz-Kurylonek N., et al. The expression of genes involved in NF-κB activation in peripheral blood mononuclear

cells of patients with gestational diabetes. *Eur J Endocrinol.* 2013. Vol. 168(3). P. 419–427.

54. Yanai S, Tokuhara D, Tachibana D, et al. Diabetic pregnancy activates the innate immune response through TLR5 or TLR1/2 on neonatal monocyte. *J Reprod Immunol.* 2016. Vol. 117, P. 17–23.

55. Caricilli A.M., Picardi P.K., de Abreu L.L., et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR2 knockout mice. *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9(12), e1001212. doi: 10.1371/journal.pbio.1001212

56. Wang N., Wang H., Yao H. et al. Expression and activity of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in mouse intestine following administration of a short-term high-fat diet. *Exp Ther Med.* 2013. Vol. 6(3), P. 635–640.

57. Piccirillo C.A., Shevach E.M. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol.* 2004. Vol. 16(2), P. 81–88.

58. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007. Vol. 204, P. 1849–1861.

59. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004. Vol. 22, P. 531–62.

60. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3. *Иммунология.* 2006. Т. 37, № 3. С. 176–188.

61. Lindley S., Dayan C.M., Bishop A. et al. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005. Vol. 54(1), P. 92–9.

62. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Gavin M.A. et al. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005. Vol. 6(11), P. 1142–51.

63. Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther.* 2008. Vol. 10(2), P. 206.



64. Mesquita D. Jr, Cruvinel W.M., Câmara N.O. et al. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res.* 2009. Vol. 42, P. 476–486.
65. Кетлинский С.А. TH17 новая линия дифференцировки Т хелперов: обзор данных. *Цитокины и воспаление.* 2009. № 2. С. 3–15.
66. Emamaullee J.A., Davis J, Merani S. et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2009. Vol. 58(6), P. 1302–11.
67. Bettelli E., Korn T., Kuchroo V.K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.* 2007. Vol. 19(6), P. 652–7.
68. Pabst O., Mowat A.M. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012. May;5(3):232–9.
69. Worbs T., Bode U., Yan S. et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Ex P. Med.* 2006. Vol. 203, P. 519–527.
70. Palmer J.P., Asplin C.M., Clemons P. et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science.* 1983. Vol. 23;222(4630), P. 1337–9.
71. Weng J., Li Y., Xu W. et al. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial. *Lancet.* 2008. Vol. 24;371(9626), P. 1753–60.
72. Kuglin B., Gries F.A., Kolb H. Evidence of IgG autoantibodies against human proinsulin in patients with IDDM before insulin treatment. *Diabetes.* 1988. Vol. 37(1), P. 130–2.
73. Lieberman S.M., DiLorenzo T.P. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* 2003. Vol. 62(5), P. 359–77.
74. Yu L., Robles D.T., Abiru N. et al. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. Vol. 15;97(4), P. 1701–6.

75. Wegmann D.R., Gill R.G., Norbury-Glaser M. et al. Analysis of the spontaneous T cell response to insulin in NOD mice. *J Autoimmun* 1994. Vol. 7, P. 833–843.

76. Wegmann D.R., Norbury-Glaser M., Daniel D. Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice. *Eur J Immunol* 1994. Vol. 24, P. 1853–1857.

77. Nakayama M., Abiru N., Moriyama H. et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature*. 2005. Vol. 435, P. 220–223.

78. Zhang Z.J., Davidson L., Eisenbarth G. et al. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci*. 1991. Vol. 88, P. 10252–10256.

79. Saï P., Damagé C., Rivereau A.S. et al. Prophylactic oral administration of metabolically active insulin entrapped in isobutylcyanoacrylate nanocapsules reduces the incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Autoimmun*. 1996. Vol. 9, P. 713–722.

80. Atkinson M.A., Maclaren N.K., Luchetta R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes*. 1990. Vol. 39, P. 933–937.

81. Harrison L.C., Dempsey-Collier M., Kramer D.R. et al. Aerosol insulin induces regulatory CD8  $\gamma$   $\delta$  T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med*. 1996. Vol. 184, P. 2167–2174.

82. Aspod C., Thivolet C. Nasal administration of CTB-insulin induces active tolerance against autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol*. 2002. Vol. 130, P. 204–211.

83. Hutchings P.R., Cooke A. Comparative study of the protective effect afforded by intravenous administration of bovine or ovine insulin to young NOD mice. *Diabetes*. 1995. Vol. 44, P. 906–910.

84. Skyler J.S., Krischer J.P., Wolfsdorf J. et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial–Type 1. *Diabetes Care*. 2005. Vol. 28, P. 1068–1076.

85. Skyler J.S., Greenbaum C.J., Lachin J.M. et al. Type 1 Diabetes TrialNet—an international collaborative clinical trials network. *Ann NY Acad Sci*. 2008. Vol. 1150, P. 14–24.

86. Pozzilli P., Pitocco D., Visalli N. et al. No effect of oral insulin on residual  $\beta$ -cell function in recent-onset type I diabetes (the IMDIAB VII). IMDIAB Group. *Diabetologia*. 2000. Vol. 43, P. 1000–1004.

87. Chaillous L., Lefèvre H., Thivolet C. et al. Oral insulin administration and residual  $\beta$ -cell function in recent-onset type 1 diabetes: A multicentre randomised controlled trial. Diabète Insuline Orale group *Lancet*. 2000. Vol. 356, P. 545–549.

88. Orban T., Farkas K., Jalahej H. et al. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *J Autoimmun*. 2010. Vol. 34, P. 408–415.

89. Riddle M.C., Rosenstock J., Gerich J. Insulin Glargine 4002 Study Investigators. The treat-to-target trial: randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2003. Vol. 26(11), P. 3080–6.

90. Berggren E.K., Boggess K.A. Oral agents for the management of gestational diabetes. *Clin Obstet Gynecol*. 2013. Vol. 56(4), P. 827–36.

91. Langer O., Conway D.L., Berkus M.D. et al. A comparison of glyburide and insulin in women with gestational diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2000. Vol. 343(16), P. 1134–8.

92. Holt R.I., Lambert K.D. The use of oral hypoglycaemic agents in pregnancy. *Diabet Med*. 2014. Vol. 31(3), P. 282–91.

93. Nicholson W., Baptiste-Roberts K. Oral hypoglycaemic agents during pregnancy: The evidence for effectiveness and safety. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011. Vol. 25(1), P. 51–63.

94. Yogev Y., Ben-Haroush A., Chen R. et al. Undiagnosed asymptomatic hypoglycemia: diet, insulin, and glyburide for gestational diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2004. Vol. 104, P. 88–93.
95. Chmait R., Dinise T., Moore T. Prospective observational study to establish predictors of glyburide success in women with gestational diabetes mellitus. *J Perinatol.* 2004. Vol. 24, P. 617–622.
96. Conway D.L., Gonzales O., Skiver D. Use of glyburide for the treatment of gestational diabetes: the San Antonio experience. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2004. Vol. 15, P.51–55.
97. Jacobson G.F., Ramos G.A., Ching J.Y. et al. Comparison of glyburide and insulin for the management of gestational diabetes in a large managed care organization. *Am J Obstet Gynecol.* 2005. Vol. 193, P. 118–124.
98. Ashcroft F.M. ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115, P. 2047–2058.
99. Clement J.P. 4th, Kunjilwar K., Gonzalez G. et al. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron.* 1997. Vol. 18, P. 827–838.
100. Aguilar-Bryan L., Nichols C.G., Wechsler S.W. et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science.* 1995. Vol. 268, P. 423–426.
101. Hamon Y., Luciani M.F., Becq F. et al. Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood.* 1997. Vol. 90, P. 2911–2915.
102. Ozaki E., Campbell M., Doyle S. L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J. Inflamm.* 2015. Vol. 8, P. 15–27.
103. Inoue M., Shinohara M.L. The role of interferon-beta in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis – in the perspective of inflammasomes. *Immunology.* 2013. Vol. 139, P. 11–18.

104. Eigenbrod T., Dalpke A.H. Bacterial RNA: an underestimated stimulus for innate immune responses. *J. Immunol.* 2015. Vol. 195, P. 411–418.
105. Inoue M., Shinohara M.L. NLRP3 Inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Dis.* 2013. P. 859145.
106. Ito M., Shichita T., Okada M. et al. Bruton's tyrosine kinase is essential for NLRP3 inflammasome activation and contributes to ischaemic brain injury. *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6 P. 7360.
107. Doitsh G., Galloway N.L., Geng X. et al. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature.* 2014. Vol. 505, P. 509–514.
108. Arbore G., West E.E., Spolski R. et al. T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4<sup>+</sup> T cells. *Science.* 2016. Vol. 17, P. 352.
109. Bruchard M., Rebé C., Derangère V. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol.* 2015. Vol. 16(8), P. 859–70.
110. Schroder K., Zhou R., Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science.* 2010. Vol. 15;327(5963), P. 296–300.
111. Hu C., Ding H., Li Y. et al. NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015. Vol. 8;112(36), P.11318–23.
112. Coll R.C., Robertson A.A., Chae J.J. et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 2015. Vol. 21, P. 248–255.
113. Youm Y.H., Nguyen K.Y., Grant R.W. et al. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nat. Med.* 2015. Vol. 21, P. 263–269.
114. Perregaux D.G., McNiff P., Laliberte R. et al. Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors. *J. Pharmacol. Ex P. Ther.* 2001. Vol. 299, P.187–197.

115. Iyer S.S., He Q., Janczy J.R. et al. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*. 2013. Vol. 39, P. 311–323.
116. Zhuang Y., Yasinta M., Hu C. et al. Mitochondrial dysfunction confers albumin-induced NLRP3 inflammasome activation and renal tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015. Vol. 308 P. 857–F866.
117. Hornung V., Bauernfeind F., Halle A. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 2008. Vol. 9, P. 847–856.
118. Sheedy F.J., Grebe A., Rayner K.J. et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat. Immunol.* 2013. Vol. 14, P. 812–820.
119. Tseng W.A., Thein T., Kinnunen K. et al. NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. Vol. 54, P. 110–120.
120. Cho M.H., Cho K., Kang H.J. et al. Autophagy in microglia degrades extracellular beta-amyloid fibrils and regulates the NLRP3 inflammasome. *Autophagy*. 2014. Vol. 10, P. 1761–1775.
121. Shao B.Z., Wei W., Ke P. et al. Activating cannabinoid receptor 2 alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via activation of autophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome. *CNS Neurosci. Ther.* 2014. Vol. 20, P. 1021–1028.
122. Jabir M.S., Hopkins L., Ritchie N.D. et al. Mitochondrial damage contributes to *Pseudomonas aeruginosa* activation of the inflammasome and is downregulated by autophagy. *Autophagy*. 2015. Vol. 11, P. 166–182
123. Li Y., Yang J., Chen M.H. et al. Ilexgenin A inhibits endoplasmic reticulum stress and ameliorates endothelial dysfunction via suppression of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in an AMPK dependent manner. *Pharmacol. Res.* 2015. Vol. 99, P. 101–115.

124. Liu W., Gu J., Qi J. et al. Lentinan exerts synergistic apoptotic effects with paclitaxel in A549 cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *J. Cell. Mol. Med.* 2015. Vol. 19, P. 1949–1955.

125. Lamprianou S., Gysemans C., Bou Saab J. et al. Glibenclamide Prevents Diabetes in NOD Mice. *PLoS One.* 2016. Vol. 11(12), P. e0168839.

126. Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з еспериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології.* 2016. № 3. С.11–18.

127. Камишний О.М., Прозорова Т.М., Камишна В.А. Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламиду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Патологія.* 2017. Т. 2 (40), С. 150–155.

128. Arulmozhi D.K, Veeranjanyulu A., Bodhankar S.L. Neonatal streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes mellitus. *Ind. J. of Pharmacology.* 2004. Vol. 36, P. 217–221.

129. Колесник Ю.М., Ганчева О.В, Абрамов А.В., Камшний А.М. Дисфункция β-клеток панкреатических островков у мужского потомства самок крыс с экспериментальным гестационным диабетом. *Запорож. мед. журн.* 2007. № 2. С. 5–10.

130. Kiliç N, Malhatun E, Elmali E, Altan N. An investigation into the effect of sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat muscle tissue. *Gen Pharmacol.* 1998. Vol. 30(3), P. 399–401.

131. Aguillar-Gomes L., Lopes C,M,, Barbieri D,S. et al. Toxic effects of glibenclamide in fetuses of normoglycemic rats: an alternative therapy for gestational diabetes mellitus. *Open Vet J.* 2014. Vol. 4(1), P. 59–64.

132. Чепляева Н.И. Глибенкламид: доказанные факты, перспективы, дискуссии. *Проблемы эндокринологии.* 2013. № 3. С. 57–62.

133. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*. 2018. Vol. 59, P. 391–412.

134. Камышный А.М., Прозорова Т.М., Камышная В.А. Влияние экспериментального гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК AIRE и характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup>клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства. *Морфология*. 2015. Т. 9, №2. С. 29–35.

135. Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології*. 2016. № 3. С. 67–69.

136. Прозорова Т.М., Камишний О.М., Топол І.О. Транскрипційна індукція генів – регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів *madcaml*, *s1pr1*, *sxcr4* і *ccr7* в умовах експериментального гестаційного діабету, що впливає на розподіл Т-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2017. № 1. С. 23–33.

137. Камишний О.М., Прозорова Т.М., Камишна В.А. Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламіду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Патологія*. 2017. Т. 2 (40), С. 150–155.

138. Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Changes in gene expression MADCAM1, S1PR1, CXCR4 and CCR7 in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *19<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (Lisbon)*. 2017. Т. 49, Р. 3.

139. Прозорова Т.М., Камишна В.А., Морозова О.В. та ін. Особливості експресії рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2018. Т.17, №2 (64). С.63–69.



140. Прозорова Т.М., Камышный А.М. Исследование особенностей распределения Т-регуляторных лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах, у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом. *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9(18), № 2(1). С. 34–38.

141. Камышный А.М., Прозорова Т.М., Камышная В.А. Влияние экспериментального гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК AIRE и характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup>клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства. *Морфология*. 2015. Т. 9, №2. С. 29–35.

142. Прозорова Т.М., Камишний О.М., Топол І.О. Транскрипційна індукція генів – регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів *madcam1*, *s1pr1*, *sxcr4* і *ccr7* в умовах експериментального гестаційного діабету, що впливає на розподіл Т-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2017. № 1. С. 23–33.

143. Akirav E.M., Ruddle N.H., Herold K.C. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011. Vol. 7(1), P. 25–33.

144. Semana G., Gausling R., Jackson R.A., Hafler D.A. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun*. 1999. Vol. 12, P. 259–67.

145. Narendran P., Neale A.M., Lee B.H. et al. Proinsulin is encoded by an RNA splice variant in human blood myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006. Vol. 103, P. 16430–5.

146. Yip L., Su L., Sheng D. Deaf1 isoforms control the expression of genes encoding peripheral tissue antigens in the pancreatic lymph nodes during type 1 diabetes. *Nat. Immunol*. 2009. Vol. 10, P. 1026–1033.

147. Aschenbrenner K., D'Cruz L.M., Vollmann E.H. et al. Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*. 2007. Vol. 8(4), P. 351–810.

148. Hinterberger M., Aichinger M., Prazeres da Costa O. et al. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol.* 2010. Vol. 11(6), P. 512–910.
149. Daniely D., Kern J., Cebula A., Ignatowicz L. Diversity of TCRs on natural Foxp3<sup>+</sup> T cells in mice lacking Aire expression. *J Immunol.* 2010. Vol. 184(12), P. 6865–7310.
150. Malchow S., Leventhal D.S., Nishi S. et al. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science.* 2013. Vol. 339(6124), P. 1219–2410.
151. Sun J., Fu H., Wu J. et al. Macrophages overexpressing Aire induce CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. *Mol Med Re P.* 2013. Vol. 7(1), P. 159–165.
152. Gardner J., Metzger T., McMahon E. Extrathymic Aire-expressing cells are a distinct bone marrow-derived population that induce functional inactivation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* 2013. Vol. 39, P. 560–572.
153. Pomié C., Vicente R., Vuddamalay Y. et al. Autoimmune regulator (AIRE)-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. Vol. 26, P. 12437–42.
154. Nakajima A., Negishi N., Tsurui H. et al. Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. *PLoS One.* 2014. Vol. 26;9(8), P. 105904.
155. Zhu W., Yang W., He Z. et al. Overexpressing autoimmune regulator regulates the expression of toll-like receptors by interacting with their promoters in RAW264.7 cells. *Cell Immunol.* 2011. Vol. 270(2), P. 156–63.
156. Griffith J.W., Sokol C.L., Luster A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014. Vol. 32, P. 659–702.
157. Moschovakis G.L., Förster R. Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease. *Eur J Immunol.* 2012. Vol. 42(8), P. 1949–55.

158. Comerford I., Harata-Lee Y., Bunting M.D. et al. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013. Vol. 24(3), P. 269–83.
159. Menning A., Höpken U.E., Siegmund K. et al. Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *European Journal of Immunology* 2007. Vol. 37, P. 1575–83.
160. Förster R., Davalos-Missslitz A.C., Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008. Vol. 8(5), P. 362–71.
161. Mackley E.C., Houston S., Marriott C.L. et al. CCR7-dependent trafficking of ROR $\gamma$ <sup>+</sup> ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat Commun.* 2015. Vol. 9, P. 5862.
162. Olmos S., Stukes S., Ernst J.D. Ectopic activation of Mycobacterium tuberculosis specific CD4<sup>+</sup> T cells in lungs of CCR7<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Immunology* 2010. Vol. 184, P. 895–901.
163. Winter S., Rehm A., Wichner K. et al. Manifestation of spontaneous and early autoimmune gastritis in CCR7-deficient mice. *Am J Pathol.* 2011. Vol. 179(2), P. 754–65.
164. Davalos-Missslitz A.C., Rieckenberg J., Willenzon S. et al. Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 2007. Vol. 37, P. 613–622.
165. Shan Z., Xu B., Mikulowska-Mennis A. et al. CCR7 directs the recruitment of T cells into inflamed pancreatic islets of nonobese diabetic (NOD) mice. *Immunol Res.* 2014. Vol. 58(2–3), P. 351–7.
166. Clahsen T., Pabst O., Tenbrock K. et al. Localization of dendritic cells in the gut epithelium requires MAdCAM-1. *Clin Immunol.* 2015. Vol. 156(1), P. 74–84.
167. Pabst O., Wahl B., Bernhardt G., Hammerschmidt S.I. Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *J Mol Med.* 2009. Vol. 87(10), P. 945–51.

168. Xu B., Cook R.E., Michie S.A. Alpha4beta7 integrin/MAdCAM-1 adhesion pathway is crucial for B cell migration into pancreatic lymph nodes in nonobese diabetic mice. *J Autoimmun.* 2010. Vol. 35(2), P. 124–9.
169. Phillips J.M., Haskins K., Cooke A. MAdCAM-1 is needed for diabetes development mediated by the T cell clone, BDC-2.5. *Immunology.* 2005. Vol. 116(4), P. 525–31.
170. Aboumrad E., Madec A.M., Thivolet C. The CXCR4/CXCL12 (SDF-1) signalling pathway protects non-obese diabetic mouse from autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2007. Vol. 148, P. 432–9.
171. Leng Q., Nie Y., Zou Y. et al. Elevated CXCL12 expression in the bone marrow of NOD mice is associated with altered T cell and stem cell trafficking and diabetes development. *BMC Immunol.* 2008. Vol. 15, P. 51.
172. Yano T., Liu Z., Donovan J. et al. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 attenuates diabetes in mice and promotes pancreatic beta-cell survival by activation of the prosurvival kinase *Akt*. *Diabetes.* 2007. Vol. 56, P. 2946–57.
173. Chew W.S., Wang W., Herr D.R. To fingolimod and beyond: The rich pipeline of drug candidates that target S1P signaling. *Pharmacol Res.* 2016. Vol. 113, P. 521–532.
174. Tsuji T., Inoue M., Yoshida Y. Therapeutic approach for type 1 diabetes mellitus using a novel immunomodulator, FTY720 (Fingolimod), in combination with once daily injection of insulin glargine, examined in non-obese diabetic (NOD) mice. *J Diabetes Invest.* 2012. Vol. 3, P. 132–137.
175. Penaranda C., Tang Q., Ruddle N.H. et al. Prevention of diabetes by FTY720-mediated stabilization of peri-islet tertiary lymphoid organs. *Diabetes.* 2010. Vol. 59(6), P. 1461–8.
176. Graham K.L., Krishnamurthy B., Fynch S. 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.

177. Kawabe T., Sun S.L., Fujita T. et al. Homeostatic proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. *J Immunol.* 2013. Vol. 190(11), P. 5788–98.
178. Jo E.K., Kim J.K., Shin D.M. et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol.* 2016. Vol. 13(2), P. 148–59.
179. Bimson B.E., Rosenn B.M., Morris S.A. et al. Current trends in the diagnosis and management of gestational diabetes mellitus in the United States. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016. P. 1–6.
180. Koren R., Ashwal E., Hod M. et al. Insulin detemir versus glyburide in women with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol.* 2016. Vol. 32(11). P. 916–919.
181. Lamkanfi M., Mueller J.L., Vitari A.C. et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol.* 2009. Vol. 187, P. 61–70.
182. Masters S.L., Dunne A., Subramanian S.L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nat Immunol.* 2010. Vol. 11(10), P. 897–904.
183. Hughes F.M. Jr, Kennis J.G., Youssef M.N. et al. The NACHT, LRR and PYD Domains-Containing Protein 3 (NLRP3) Inflammasome Mediates Inflammation and Voiding Dysfunction in a Lipopolysaccharide-Induced Rat Model of Cystitis. *J Clin Cell Immunol.* 2016. Vol. 7(1), P. 396.
184. Lawlor K.E., Vince J.E. Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: is there a role for mitochondria? *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. Vol. 1840, P. 1433–1440.
185. Patel M.N., Carroll R.G., Galván-Peña S. et al. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol Med.* 2017. Vol. 23(2), P. 165–180.
186. Pellegrini C., Antonioli L., Lopez-Castejon G. et al. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Front Immunol.* 2017. Vol. 25, P. 36.

187. Kumar P., Subramaniam G. Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes. *Cytokine*. 2015. Vol. 71(2), P. 366–76.
188. Chung Y., Chang S.H., Martinez G.J. et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009. Vol. 30(4), P. 576–87.
189. Mailer R.K, Joly A.L., Liu S. et al. IL-1beta promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci Re P*. 2015. Vol. 5, P. 14674.
190. Pontillo A., Brandao L., Guimaraes R. et al. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity*. 2010. Vol. 43(8), P. 583–9.
191. Carlos D., Costa F.R., Pereira C.A. et al. Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome and Predisposes to Type 1 Diabetes in Murine Model. *Front Immunol*. 2017. Vol. 8, P. 164.
192. Volpe C.M., Anjos P.M., Nogueira-Machado J.A. Inflammasome as a New Therapeutic Target for Diabetic Complications. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2016. Vol. 10(1), P. 56–62.
193. Friebe-Hoffmann U., Antony L., Kruessel J.S. et al. Peripheral Immunological Cells in Pregnant Women and their Change during Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2017. Vol. 125(10), P. 677–683.
194. Hasan S., Aho V., Pereira P. et al. Gut microbiome in gestational diabetes: a cross-sectional study of mothers and offspring 5 years postpartum. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018. Vol. 97(1), P. 38–46.
195. Mokkala K., Houttu N., Vahlberg T. et al. Gut microbiota aberrations precede diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2017. Vol. 54(12), P. 1147–1149.
196. Chen Q., Francis E., Hu G. et al. Metabolomic profiling of women with gestational diabetes mellitus and their offspring: Review of metabolomics studies. *Diabetes Complications*. 2018. Vol. 32(5), P. 512–523.

197. Spahn T.W., Weiner H.L., Rennert P.D. et al. Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol.* 2002. Vol. 32(4), P. 1109–13.
198. Bonifacio E., Ziegler A.G., Klingensmith G. et al. Effects of high-dose oral insulin on immune responses in children at high risk for type 1 diabetes: the Pre-POINT randomized clinical trial. *JAMA.* 2015. Vol. 313(15), P. 1541–9.
199. Huang F.P. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Ex P. Med.* 2000. Vol. 191, P. 435–444.
200. Roep B.O. Immune modulation in humans: implications for type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014. Vol. 10, P. 229–242.
201. Roep B.O. Primary prevention for type 1 diabetes mellitus? *Nat. Rev. Endocrinology.* 2015. Vol. 11, P. 451–452.
202. Kamyshny A., Putilin D., Kamyshna V. 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.* 2015. Vol. 1, № 1. P. 20–26

## ДОДАТОК А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи



Харківського національного

медичного університету

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ

МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

№17899/2000

2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

- Найменування пропозиції для впровадження:** „Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну”.
- Установа, автор:** Запорізький державний медичний університет, кафедра нормальної фізіології, асистент Прозорова Т.М.
- Джерело інформації:** Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології*. 2016. № 3(57). С. 50 - 59.  
Розвиток гестаційного діабету супроводжується характерними змінами у брижових лімфатичних вузлах у нащадків, що у подальшому грає роль у виникненні та розвитку аутоімунних захворювань, зокрема цукрового діабету.
- Де і коли впроваджено:** На кафедрі патологічної фізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету у лекційному курсі та проведенні практичних занять за темами: «Значення реактивності в патології. Алергічна реактивність» «Патологічна фізіологія імунної системи». «Аутоімунні захворювання»
- Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Т.М. Прозорової у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль брижових лімфатичних вузлів у механізмах розвитку аутоімунних захворювань.
- Термін впровадження:** січень-травень 2020 навчальний рік.
- Зауваження та пропозиції:** не вносились.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри патологічної фізіології  
ім. Д.О. Альперна  
Харківського національного  
медичного університету МОЗ України  
д. мед. н., професорка

О.В. Ніколаєва



## ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної  
роботи Запорізького державного  
медичного університету МОЗ  
України

професор Візир Валерій Анатолійович

2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** механізми формування оральної толерантності до інсуліну у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом.
2. **Установа-розробник, автор:** Запорізький державний медичний університет МОЗ України, кафедра нормальної фізіології (69074, м. Запоріжжя, пр.. Маяковського, 26), проф. Камишний О.М., ас. Прозорова Т.М., доц. Камишна В.А.
3. **Джерела інформації:**  
Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Mechanisms of oral tolerance to insulin in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*. 2017. V.2 (2), P. 27 - 33.
4. **Де і коли введено:** кафедра патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету МОЗ України, січень-травень 2020 року.
5. **Результати застосування методу:** матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри патологічної фізіології на практичних заняттях та лекціях з тем: «Аутоімунні захворювання», «Патологія вуглеводного обміну» (обговорено на засіданні кафедри 29.05.2020 р., протокол № 17).
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо механізмів формування оральної толерантності та її ролі у виникненні
7. **Зауваження та пропозиції:** Не вносилися.

Завідуюча кафедрою патологічної фізіології  
Запорізького державного медичного  
університету МОЗ України,  
д.мед.н., професор

О.В. Ганчева

## ДОДАТОК АЗ

З А Т В Е Р Д Ж У Ю  
 Про затвердження навчальної роботи  
 Української медичної стоматологічної академії  
 доктор медичних наук, професор  
 Д.С. Аветіков  
 « 2 » грудня 2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Найменування пропозиції для впровадження:** „Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну”.
  - Установа, автор:** Запорізький державний медичний університет, кафедра нормальної фізіології, пошукувач Прозорова Т.М.
  - Джерело інформації:** Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології*. 2016. № 3(57). С. 50 - 59.  
Розвиток гестаційного діабету супроводжується зміною рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 у нащадків і відповідними змінами концентрації транскрипційних факторів в імунопозитивних клітинах, що може істотно впливати на виникнення та розвиток аутоімунних захворювань, зокрема цукрового діабету.
  - Де і коли впроваджено:** На кафедрі патофізіології Української медичної стоматологічної академії у лекційному курсі та проведенні практичних занять за темами: «Реактивність і резистентність», «Патологія вуглеводного обміну».
  - Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Т.М. Прозорової у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль аутоімунних регуляторів AIRE, DEAF1, транскрипційного фактору FOXP3, костимуляторної молекули CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у механізмах розвитку аутоімунних захворювань, а також формування оральної толерантності як методу корекції імунних порушень.
  - Термін впровадження:** січень-травень 2020 навчальний рік.
  - Зауваження та пропозиції:** не вносились.
- Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри (протокол № 9 від 15.12.2020 р.).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патофізіології,  
 Української медичної стоматологічної академії,  
 д.мед.н., професор



В.О. Костенко

## ДОДАТОК А4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

В.д. ректора Одеського національного  
медичного університету, д.мед.н., професор

Вастьянов Р.С.

2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** «Особливості розподілу Т-регуляторних лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах, у нащадків щурів с експериментальним гестаїним діабетом».
2. **Установа, автор:** Запорізький державний медичний університет, кафедра нормальної фізіології, асистент Прозорова Т.М.
3. **Джерело інформації:** Российский иммунологический журнал. 2015. – том 9(18), №2(1). – С. 306–307: Исследование особенностей распределения Т-регуляторных лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах, у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом». Розвиток гестаційного діабету супроводжується змінами кількості та розподілу Т-регуляторних лімфоцитів у брижових лімфатичних вузлах у нащадків, що може впливати на виникнення та розвиток автоімунних захворювань, зокрема цукрового діабету.
4. **Де і коли впроваджено:** На кафедрі загальної та клінічної патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького Одеського національного медичного університету у лекційному курсі та проведенні практичних занять за темами: «Значення реактивності в патології. Алергічна реактивність» «Патологічна фізіологія імунної системи». «Аутоімунні захворювання»
5. **Результати впровадження:** Використання результатів наукових досліджень Т.М. Прозорової у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль Т-регуляторних лімфоцитів у механізмах розвитку автоімунних захворювань.
6. **Термін впровадження:** січень-травень 2020 навчального року
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносились.
8. **Затверджено** на засіданні кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології імені В.В. Підвисоцького від 14 червня 2020 р.), протокол № 8

## Відповідальний за впровадження:

Доцент кафедри загальної та клінічної  
патологічної фізіології ім. В.В. Підвисоцького  
Одеського національного медичного  
університету МОЗ України, доцент

Поспелов О.М.



## ДОДАТОК А5



"Затверджую"

Проректор з науково-педагогічної роботи  
Тернопільського національного  
медичного університету

проф. Шульгай А. Г.

06 20 20 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Найменування пропозиції для впровадження: «Вплив експериментального гестаційного діабету на рівень експресії мРНК AIRE і характер диференціювання Foxp3+клітин в брижових лімфатичних вузлах у нащадків».
2. Установа, автор: Запорізький державний медичний університет, кафедра нормальної фізіології, асистент Прозорова Т.М.
3. Джерело інформації: Камышный А.М., Прозорова Т.М., Камышная В.А. Влияние экспериментального гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК AIRE и характер дифференцировки Foxp3+клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства. *Морфология*. 2015. Т. 9, №2. С. 29 - 35.  
Розвиток експериментального гестаційного діабету супроводжується зниженням рівня експресії мРНК аутоімунного регулятора AIRE і характеру диференціювання регуляторних Foxp3+клітин в брижових лімфатичних вузлах у нащадків.
4. Де і коли впроваджено: На кафедрі функціональної і лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету при проведенні практичних занять
5. Результати впровадження: Використання результатів наукових досліджень Т.М. Прозорової у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів про роль аутоімунного регулятора AIRE і регуляторних Foxp3+клітин в брижових лімфатичних вузлах у механізмах розвитку аутоімунних захворювань.
6. Термін впровадження: січень-травень 2020 року.
7. Зауваження та пропозиції: не вносились.
8. Затверджено на засіданні кафедри функціональної і лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету 23.06.2020, протокол № 7

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри  
функціональної і лабораторної діагностики,

проф. М. І. Марущак

**ДОДАТОК Б**  
**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ АВТОРОМ ПРАЦЬ НА ТЕМУ**  
**ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Камышный А.М., Прозорова Т.М., Камышная В.А. Влияние экспериментального гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК AIRE и характер дифференцировки Foxp3+клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства. *Морфология*. 2015. Т. 9, №2. С. 29–35. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

2. Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3,CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології*. 2016. № 3(57). С.50–59. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

3. Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Mechanisms of oral tolerance to insulin in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*. 2017. V.2 (2), P. 27–33. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

4. Прозорова Т.М., Камишний О.М., Топол І.О. Транскрипційна індукція генів – регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів *madcam1*, *s1pr1*, *sxcg4* і *scg7* в умовах експериментального гестаційного діабету, що впливає на розподіл Т-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2017. № 1. С. 23–33. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

5. Камишний О.М., Прозорова Т.М., Камишна В.А. Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламіду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних

вузлах у нащадків. *Патологія*. 2017. Т. 14, № 2(40), С. 149–155. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

6. Прозорова Т.М., Камишна В.А., Морозова О.В., Коваль Г.Д., Камишний О.М. Особливості експресії рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2018. Т. 17, № 2 (64). С. 63–69. (Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку).

7. Прозорова Т.М., Крупей К.С., Камишний О.М. Ключові функціональні зміни у клітинах брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2020. № 1, С. 36–41. (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

8. Prozorova T., Tokarskyu O., Fedoniuk L., Harbuzova V., Morozova O., Egorov A., Kamyshnyi A. Changes in the Transcriptional Activity of the Lymphocyte Homing Regulatory Genes *Madcam1*, *Cxcr3*, *Ccr7* and *S1pr1* Affect Structure of the Population of *T-bet<sup>+</sup>*, *Roryt<sup>+</sup>* and *Foxp3<sup>+</sup>* cells in Mesenteric Lymph Nodes in Offspring of Rats with Experimental Gestational Diabetes *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*. 2020. V. 27 (3), P. 185–194 (Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)

9. Прозорова Т.М. Характер розподілу Th17-клітин в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я: Збірка тез доповідей*. (м. Запоріжжя 26–27 березня 2015р.). Запоріжжя. 2015. С. 63.

10. Prozorova T., Kamyshny A. Reduction of autoimmune regulator Aire mRNA and number of Treg-cells in mesenteric lymph nodes in the offspring of rats with experimental gestational diabetes. *18th European Congress of Endocrinology*. (Munich, 28–31 May 2016). Munich. 2016. Vol. 41, P. 260. (Дисертантом

*самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).*

11. Prozorova T., Kamyshny A. Expression level of Aire, Deaf1, Foxp3, Ctla4 and IL-10 mRNA in the offspring of rats with experimental gestational diabetes and in conditions of insulin oral tolerance formation. *Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI)*. (Hamburg, 27–30 Sept. 2016). Hamburg. 2016. P. 319. *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку).*

12. Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Changes in gene expression MADCAM1, S1PR1, CXCR4 and CCR7 in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *19th European Congress of Endocrinology*. (Lisbon, 20–23 May 2017) Lisbon. 2017. Vol. 49, P454 *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*

13. 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).*

## ДОДАТОК В

### ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

- Всеукраїнська конференція молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2016), *(усна доповідь і публікація)*;
- 18<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (Munich, 2016), *(публікація)*;
- Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, 2016), *(стендова доповідь і публікація)*;
- 9<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (Lisbon, 2017), *(публікація)*;