

# 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

Т.М. ПРОЗОРОВА, О.М. КАМИШНИЙ, І.О. ТОПОЛ

Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна

E-mail: alexkamyshny@yandex.ru

Брижові лімфатичні вузли (БЛВ) є основним місцем індукції периферійної імунологічної толерантності до різноманітних антигенів, у тому числі й панкреатичних [13], а також основним “перехідним” пунктом для пулу рециркулюючих лімфоцитів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ). Головними регуляторами хоумінгу лімфоцитів у БЛВ є адресин *Madcam1* (mucosal addressin cell adhesion molecule 1) – адгезивний білок венул із високим ендотелієм лімфоїдних утворень КАЛТ, хемокінові рецептори *Sxcr4* (C-X-C chemokine receptor type 4) і *Ccr7* (C-C chemokine receptor type 7), лігандами для яких є *Cxcl12*, *Ccl19* і *Ccl21* відповідно. Хемокін-рецепторна взаємодія між парами *Ccl19/21–Ccr7* та *Cxcl12–Sxcr4*, а також *Madcam1* та його лігандом інтегрином  $\alpha 4\beta 7$  регулюють надходження до ЛВ більшості імунних клітин. Так, вхід Т-клітин у ЛВ порушується за відсутності *Ccr7*-сигналізації, в тому числі у мишей лінії *plt/plt*, які не мають *Ccl21*, а також *Ccl19* [21]. Вихід лімфоцитів із БЛВ своєю чергою регулюється сфінгозин-1-фосфат S1P-рецепторами (*S1pr1–S1pr5*) [23], серед яких лімфоцитами найбільш активно експресується перший тип – *S1pr1* [20]. Після активації імунних клітин у БЛВ експресія *S1pr1* на їх мембрані зростає, і лімфоцити реагують на зміни градієнта S1P та залишають лімфатичні вузли [9].

**Мета дослідження** – з’ясувати рівень експресії мРНК генів *Madcam1*, *S1pr1*, *Sxcr4* і *CCR7* і його вплив на розподіл Th1-, Th17- і Treg-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним

гестаційним діабетом і за умов формування толерантності до орального введення інсуліну.

**Матеріали й методи дослідження.** Тварин поділено на шість експериментальних груп по 20 особин: нащадки інтактних щурів лінії Wistar (самці) віком 1 місяць (група 1) і 6 місяців (група 2), яким на 15-ту добу датованої вагітності одноразово внутрішньоочеревинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН = 4,5); нащадки щурів лінії Wistar (самці) з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД) віком 1 місяць (група 3) і 6 місяців (група 4), яким на 15-ту добу датованої вагітності одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотин дозою 45 мг/кг; нащадки щурів з ЕГД віком 1 місяць (група 5), яким перорально піпеткою упродовж перших 14 днів життя вводили людський інсулін короткої дії (ACTRAPID® HM, NOVO NORDISK, Данія) дозою 30 МО (1050 мкг = 1,05 мг, 1 МО відповідає 35 мкг безводного людського інсуліну); нащадки щурів з ЕГД віком 6 місяців (група 6), яким перорально впродовж перших 14 днів життя вводили інсулін дозою 30 МО.

Молекулярно-генетичні дослідження з використання методу полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) в експериментальних тварин здійснювали на БЛВ. Їх поміщали у фіксатор Буена, проводили дегідратацію за допомогою висхідних концентрацій етанолу й укладали у парафінові блоки. Досліджували архівний матеріал віком до 2 років. РНК отримували з гістологічних зрізів завтовшки 15 мкм, для цього проводили їх депарафінізацію у ксилолі та регідратацію у низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %). Тотальну РНК виділяли за допомогою набору Trizol RNA Prep 100 (Ізоген Lab., LTD, Російська Федерація), який містить *Trizol reagent* (лізуючий реагент, до складу якого входять денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол із рН = 4,0) та *ExtraGene E* (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли згідно з протоколом до набору.

Для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Російська Федерація). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої  $H_2O$ , очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5x реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотню транскрипцію проводили при 45 °С впродовж 45 хв із наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хв. при 92 °С.

Для визначення рівня експресії мРНК досліджуваних генів *Madcam1* (NM\_019317.1), *Cxcr4* (NM\_022205.3), *Sipr1* (NM\_017301.2), *Ccr7* (NM\_199489.4) використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімераза Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої  $H_2O$ . Специфічні пари праймерів (5'–3') для аналізу досліджуваних і референсного генів, що їх добирали за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)), виготовлені фірмою Metabion (Німеччина) (див. таблицю).

Після початкової денатурації упродовж 10 хв при 95 °С ампліфікація складалася з 45 циклів. Її проводили за таких умов: денатурація – 95 °С, 15 с, відпал – 59–61 °С, 30–60 с, елонгація – 72 °С, 30 с. Як референтний ген для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів використано ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (*GAPDH*). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом  $\Delta\Delta C_t$ . Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В експеримент

були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці у реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторях.

**Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів**

| Ген            | Праймер                                                   | t, °C          | Product length (bp) | Exon junction |
|----------------|-----------------------------------------------------------|----------------|---------------------|---------------|
| <i>Cxcr4</i>   | F = TGCCATGGAAATATACACTTCGG<br>R = TCCAGACCCTACTTCTTCGGGA | 58,87<br>59,64 | 52                  | 81/82         |
| <i>Ccr7</i>    | F = CTGGTCATTTTCCAGGTGTGC<br>R = TGGTGTTCCTCGCCGATGTAG    | 59,73<br>59,83 | 67                  | 138/13        |
| <i>Madcam1</i> | F = CCAAACTGGTGCTGACACAT<br>R = TCTGGCTCTGTAGGACTGGAA     | 58,68<br>59,92 | 51                  | 662/663       |
| <i>S1pr1</i>   | F = CGGATCGCGCGGTGTAG<br>R = GAAACAGCAGCCTCGTCA           | 60,73<br>61,23 | 70                  | 61/62         |
| <i>GAPDH</i>   | F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG<br>R = GCCTGCTTCACCACCTTCT       | 61<br>60       | 52                  | 825/826       |

Структуру популяції лімфоцитів T-bet<sup>+</sup> (Th1), Rorγt<sup>+</sup> (Th17) і Foxp3<sup>+</sup> (Treg) вивчали за результатами аналізу серійних гістологічних зрізів БЛВ і даних їх морфометричних та денситометричних характеристик. Для проведення дослідження на ротаційному мікроскопі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи БЛВ. Їх депарафінізували в ксилолі, проводили регідратацію у низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4) і обробляли первинними кролячими поліклональними антитілами (ПКАТ) до T-bet, Rorγt і Foxp3 (Santa Cruz Biotechnology, США, sc-1550-R) 18 год. у вологій камері при t = 4 °C. Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв (t = 37 °C) із вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), кон'югованими з FITC. Після інкубації всі зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і розміщували в суміші гліцерину та фосфатного буфера (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Зображення, отримане на мікроскопі Primo Star (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) за допомогою високочутливої камери Axio Cam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводили в комп'ютер. При цьому в автоматичному режимі визначалися області зі статистично значущою флюоресценцією. Обчислювалися морфометричні та денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. Визначали абсолютну (кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup> площі зрізу) і відносну (%) щільність розподілу імунопозитивних клітин різних класів у досліджених зонах БЛВ.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Дослідження експресії гена *Ccr7* в БЛВ показало, що у нащадків щурів з ЕГД значно збільшився вміст мРНК цих хемокинових рецепторів – у 26,8 разу ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і в 21 раз ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних порівняно з контрольною групою (рис. 1, а, б). Уміст мРНК рецептора *Cxcr4* в обох вікових групах достовірно не змінився (рис. 1, в, г). Відносна нормалізована кількість мРНК адресну *Madcam1* у віці 1 місяць зросла у 2,4 разу ( $p < 0,05$ ), а в 6 місяців – в 2,3 разу ( $p < 0,05$ ) (рис. 1, д, е). Під час дослідження експресії гена *S1pr1* отримано такі результати: у першій віковій групі вміст мРНК *S1pr1* зріс у 3,6 разу ( $p < 0,05$ ), у старших тварин – у 5 разів ( $p < 0,05$ ) (рис. 1, ж, з).

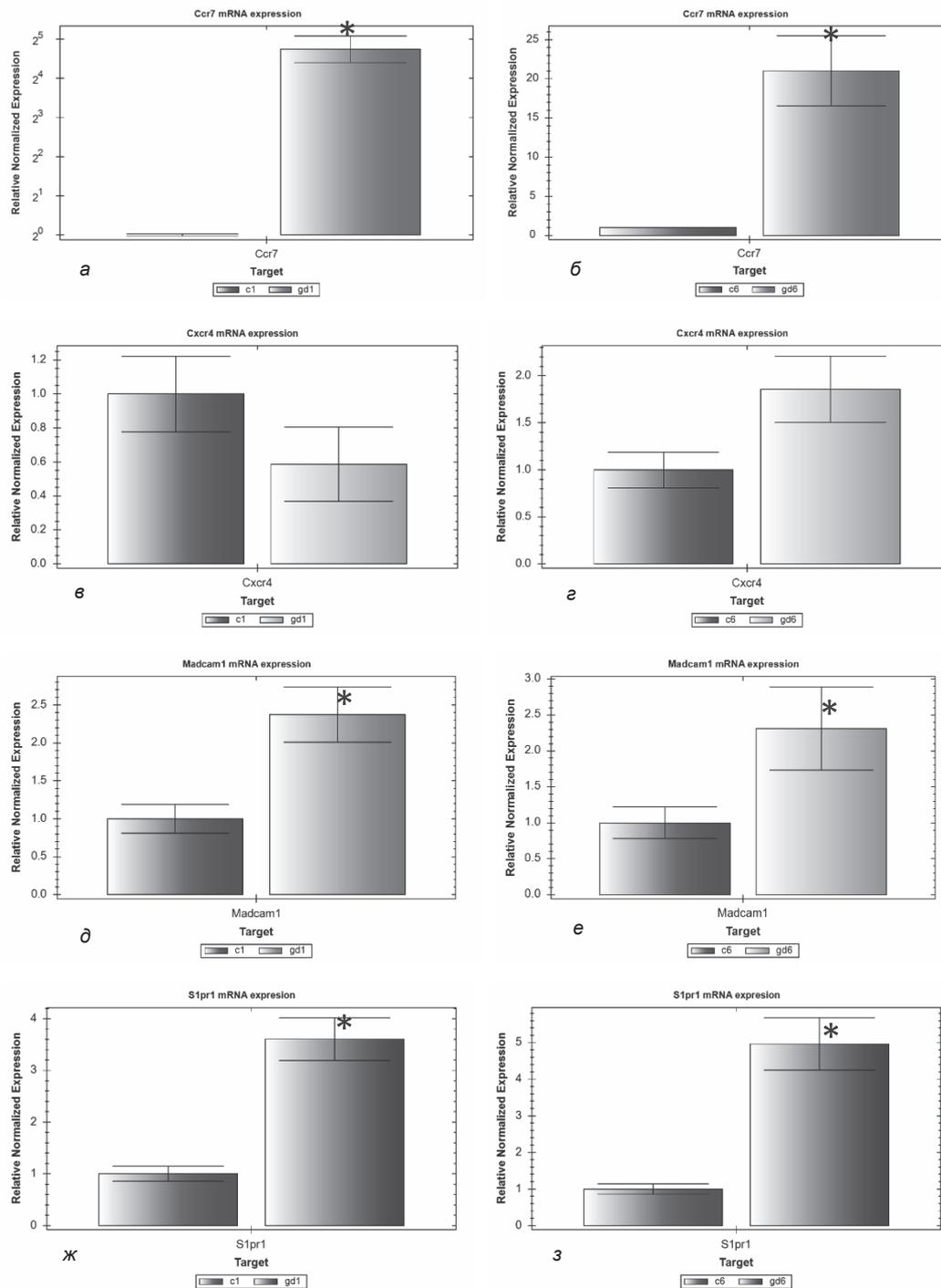


Рис. 1. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ccr7* (а, б), *Cxcr4* (в, г), *Madcam1* (д, е) і *S1pr1* (ж, з) у клітинах БЛВ. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta C_t$  з референтним геном *GAPDH*. c1, c6-контроль 1 і 6 міс.; gd1, gd6 – нащадки щурів з ЕГД. \* –  $p < 0,05$ .

Групи тварин, нащадків щурів з ЕГД, яким перорально протягом перших 14 днів життя вводили інсулін, порівняно з нащадками щурів з ЕГД показали такі результати: кількість мРНК гена *Ccr7* у 1-місячних тварин зменшилася на 81 % ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних щурів достовірних змін не

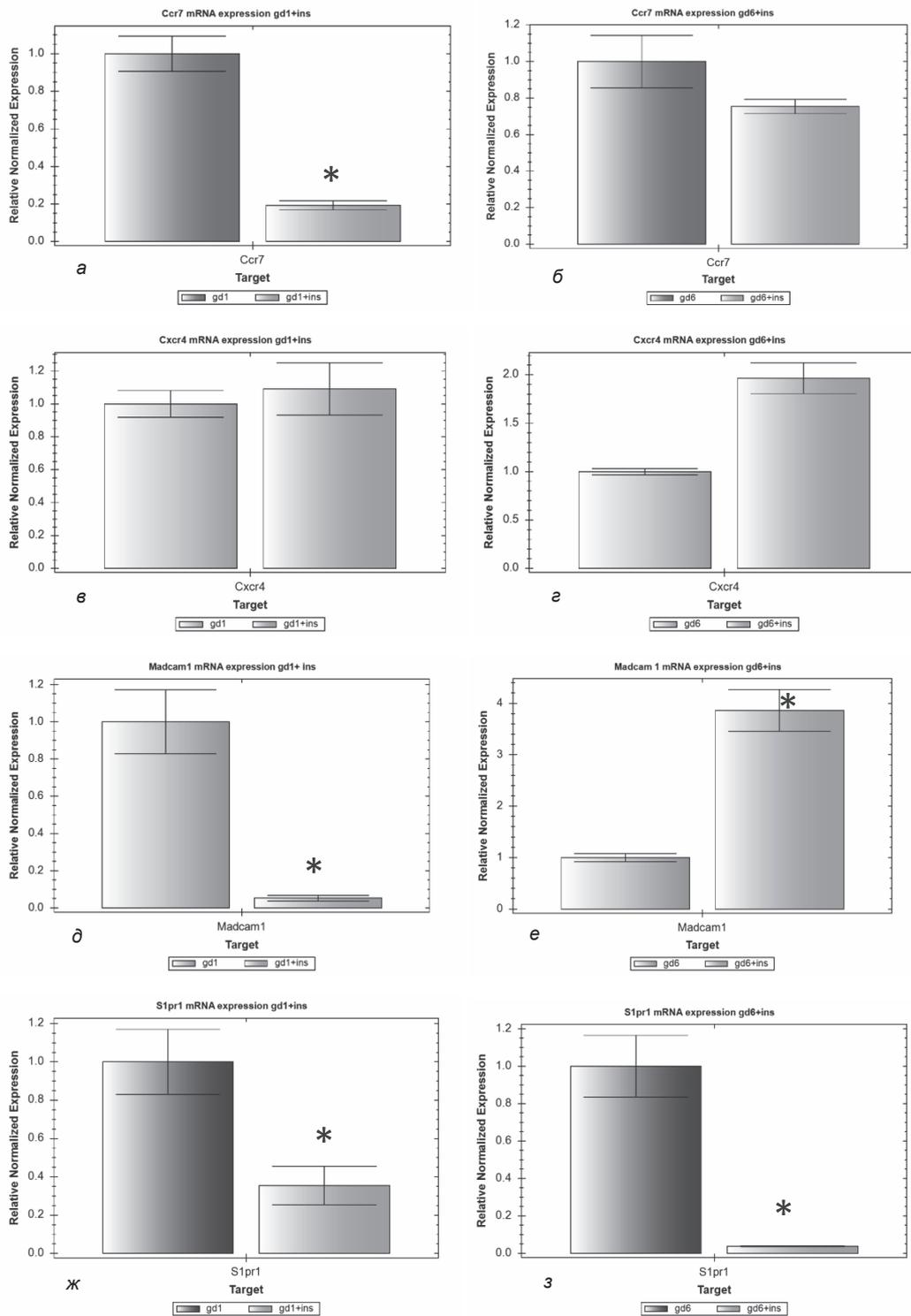


Рис. 2. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ccr7* (а, б), *Cxcr4* (в, з), *Madcam1* (д, е) і *S1pr1* (ж, з) у клітинах БЛВ. Нормалізація за методом  $\Delta\Delta C_t$  з референтним геном *GAPDH*. gd1, gd6 – нащадки шурів з ЕГД; gd1+ins, gd6+ins – після введення інсуліну. \* –  $p < 0,05$ .

виявлено (рис. 2, а, б). Експресія гена *Cxcr4* не зазнала достовірних змін у обох вікових групах (рис. 2, в, з). Кількість мРНК адресину *Madcam1* у віці 1 місяць зменшилася на 95 % ( $p < 0,05$ ), тоді як у 6-місячних щурів збільшилась в 3,9 разу ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, д, е). Вміст мРНК гена *S1pr1* у щурів першої вікової групи знизився на 65 % ( $p < 0,05$ ), а старшої – на 96 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, ж, з).

Зміни рівня експресії регуляторів “хоумінгу” лімфоцитів у БЛВ впливали на розподіл окремих субпопуляцій Т-хелперів. Так, сумарна щільність Т-bet<sup>+</sup>-клітин у 1-місячних нащадків тварин з ЕГД порівняно з групою контролю в кірковому плато зроста вдвічі, у щурів віком 6 місяців спостерігалось збільшення на 56 %. У мозкових тяжках цей показник збільшився у 2,6 та в 2,8 разу ( $p < 0,05$ ) відповідно (рис. 3, а, б). У групі тварин, що перорально отримували інсулін, спостерігали зниження сумарної щільності Т-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у кірковому плато на 33 % ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і на 41 % ( $p < 0,05$ ) – у 6-місячних щурів. У мозкових тяжках загальна кількість Th1 після введення інсуліну зменшувалася тільки у 6-місячних тварин – на 44 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 3, а, б).

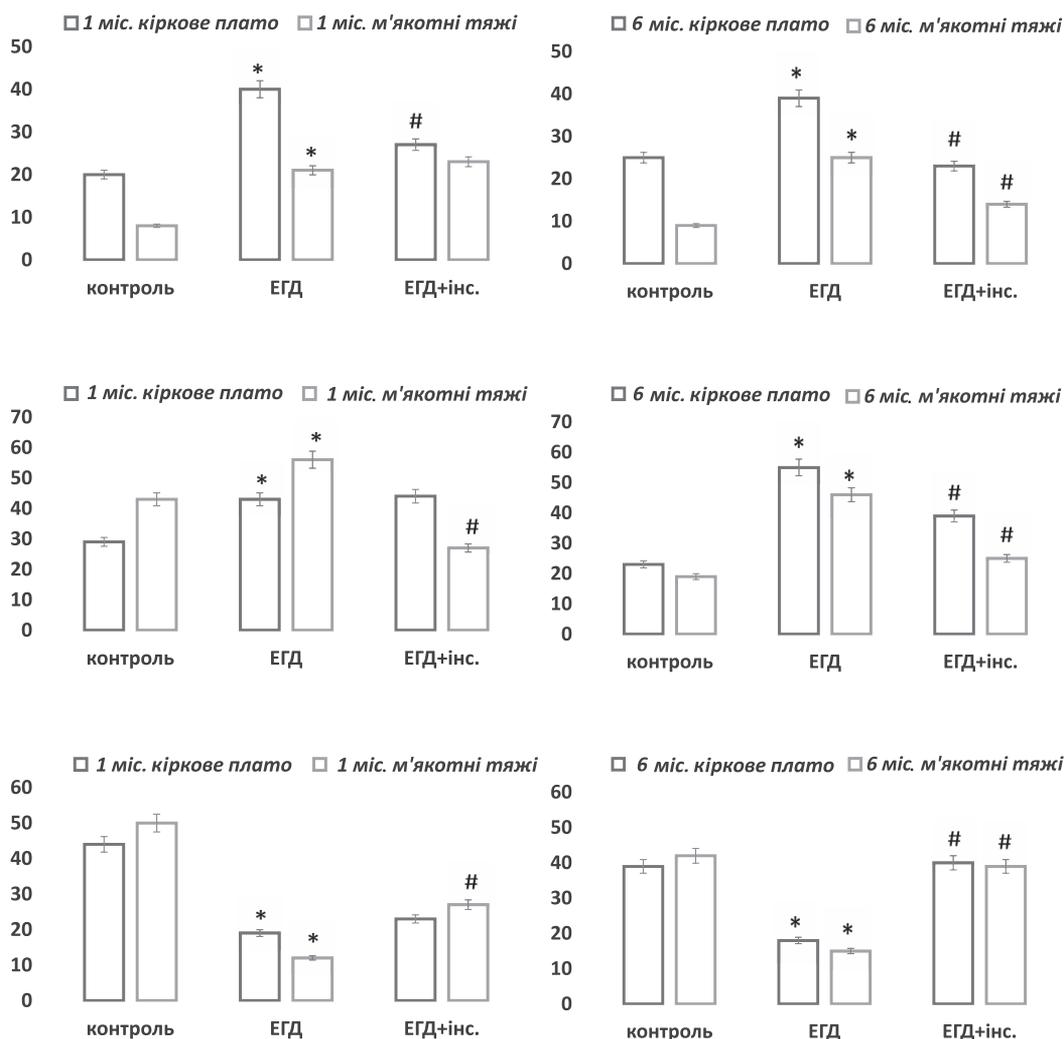


Рис. 3. Сумарна щільність Т-bet<sup>+</sup> (а, б), Rorγt<sup>+</sup> (в, з), Foxp3<sup>+</sup> (д, е) - імунопозитивних клітин у БЛВ щурів групи контролю, нащадків щурів з ЕГД і щурів, які перорально отримували інсулін упродовж перших 14 днів. \* –  $p < 0,05$ .

Аналіз розподілу  $\text{Ror}\gamma^+$ -клітин БЛВ щурів показав, що: у 1-місячних нащадків з ЕГД сумарна щільність  $\text{Th17}$  кіркового плато достовірно вища на 48 % ( $p < 0,05$ ), ніж у групі контролю. У 6-місячних тварин кількість  $\text{Ror}\gamma^+$ -лімфоцитів цієї зони збільшувалася у 2,4 разу. У мозкових тяжках сумарна щільність  $\text{Th17}$  у 1-місячних нащадків тварин з ЕГД зросла на 51 % ( $p < 0,05$ ), у 6-місячних щурів – у 2,4 разу ( $p < 0,05$ ) (рис. 3, в, з). Після введення інсуліну сумарна щільність лімфоцитів  $\text{Ror}\gamma^+$  у кірковому плато 1-місячних тварин достовірно не змінилася, а у 6-місячних спостерігали її зниження. У мозкових тяжках число  $\text{Ror}\gamma^+$ -клітин 1-місячних тварин зменшилося на 52 % ( $p < 0,05$ ) і на 46 % ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних. Кількість  $\text{Foxp3}^+$ -лімфоцитів у кірковому плато нащадків щурів з ЕГД у 1-місячних тварин менша на 57 % ( $p < 0,05$ ), у 6-місячних – на 54 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з групою контролю. У мозкових тяжках також спостерігали зменшення Т-регуляторних клітин на 76 % і на 64 % ( $p < 0,05$ ) відповідно (рис. 3, д, е). У щурів, що отримували інсулін, виявлено такі результати: сумарна щільність  $\text{Foxp3}^+$ -клітин у 1-місячних щурів у кірковому плато достовірно не змінилась, а в 6-місячних зросла в 2,2 разу ( $p < 0,05$ ). У мозкових тяжках чисельність  $\text{Treg}$  зросла в 2,3–2,6 разу ( $p < 0,05$ ) (рис. 3, д, е).

*Ccr7*-опосередковані сигнали впливають на Т-клітинний гомеостаз у лімфатичних вузлах на різних рівнях, а також на активацію і поляризацію різних субпопуляцій Т-хелперів [15]. Так, *Ccr7* відіграє важливу роль у функціонуванні Т-регуляторних клітин, виконуючи при цьому подвійну роль: для індукованих  $\text{Treg}$  експресія *Ccr7* необхідна для їх ефективного праймування в ЛВ [4], тоді як “ефекторні”  $\text{Tregs}$ , вочевидь, використовують *Ccr7* для виходу з тканин, а тому *Ccr7* обмежує їх надмірне накопичення у периферійних тканинах [14]. Хоча загальна чисельність  $\text{Treg}$  в тимусі у *Ccr7*-нокаутних мишей і мишей дикого типу однакова, їх супресорні функції на периферії порушені внаслідок неспроможності потрапляти в лімфатичні вузли і позиціонуватися в межах Т-клітинних зон ЛВ [7]. Нещодавнє дослідження Mackley E.C. et al. (2015) показало, що міграція групи вроджених  $\text{ROR}\gamma$ -лімфоцитів із кишківника в БЛВ теж є *Ccr7*-залежною [12], причому такі клітини цілеспрямовано мігрують саме в БЛВ, а не в інші групи ЛВ. *Ccr7*-*l*-миші більш сприйнятливі до інфекцій, що викликаються *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania donovani* й *Toxoplasma gondi* [16], демонструють збільшення лімфоцитарної інфільтрації периферійних тканин і панкреатичних острівців, порушення у центральній і периферійній толерантності до власних антигенів та дефекти функціонування  $\text{Treg}$  клітин, що призводить до розвитку поліорганных аутоімунних реакцій [6]. Це супроводжується збільшенням титру циркулюючих аутоантитіл до великої кількості тканиноспецифічних антигенів, а також утворенням ектопічних третинних лімфоїдних структур на слизових оболонках [5]. Shan Z. et al. (2014) з'ясували важливу роль *Ccr7* у залученні Т-клітин у панкреатичні острівці у NOD-мишей [22], за допомогою RT-PCR показали інтенсивну експресію мРНК *Ccr7* та його лігандів *Ccl19* і *Ccl21* в запалених, але не в інтактних острівцях. Під час вимкнення *Ccr7*-сигналізації блокувалась міграція близько 75 % Т-клітин із крові до панкреатичних острівців, але це не чинило жодного впливу на міграцію В-лімфоцитів у острівці. Одержані результати свідчать, що *Ccr7* і його ліганди відіграють важливу роль у залученні Т-клітин в острівці і, таким чином, у патогенезі ЦД1. У деяких працях показана роль *Ccr7*-сигналізації у формуванні оральної толерантності до різних АГ – оральну толерантність не вдається індукувати у *Ccr7*-дефіцитних мишей через порушення міграції ДК із власної пластини слизової оболонки кишківника в БЛВ [27].

Збільшення рівня мРНК ще одного з регуляторів “хоумінгу” лімфоцитів – *Madcam1* в БЛВ підтверджене результатами, в яких показано, що РНК транскрипти *Madcam1* добре експресуються в ендотелії як лімфоїдної, так і нелімфоїдних тканин, зокрема, у тонкому і товстому кишківнику,

мезентеріальних і панкреатичних лімфовузлах, селезінці [3]. Ця експресія підвищується у відповідь на дію прозапальних цитокінів, у тваринних моделях запальних захворювань кишківника та у пацієнтів із хворобою Крона і виразковим колітом [24]. *Madcam1* ексклюзивно експресований у венулах із високим ендотелієм БЛВ, але не периферійних ЛВ [17]. Даних про експресію *Madcam1* у БЛВ у нащадків з ЕГД немає. Відомо лише, що адгезія лімфоцитів, що регулюється системою  $\alpha 4\beta 7$  інтегрин/*Madcam1*, у край важлива для міграції В-клітин у панкреатичні лімфатичні вузли (ПЛВ) в неопасистих діабетичних (NOD) мишей. Так, В-лімфоцити з ПЛВ 3–4-тижневих NOD-мишей характеризуються високим рівнем експресії інтегрину  $\alpha 4$ , LFA-1 і проміжним рівнем інтегрину  $\beta 7$ . У дослідженні *in vivo* показано, що В-клітини мігрували з кровоплину в ПЛВ більш ефективно, ніж у периферійні ЛВ. Крім цього, антитіла до *Madcam1* та інтегрину  $\alpha 4\beta 7$  пригнічували міграцію більш ніж 90 % В-лімфоцитів у ПЛВ [28]. Одноразова внутрішньочеревна ін'єкція анти-*Madcam1* антитіл 3-тижневим NOD-мишам значно сповільнювала надходження В-лімфоцитів у ПЛВ протягом принаймні двох тижнів. Ці результати демонструють, що  $\alpha 4\beta 7$ -інтегрин/*Madcam1* шлях адгезії відіграє важливу роль у міграції В-лімфоцитів у ПЛВ у мишей лінії NOD і може бути потенційною мішенню для терапії ЦД1. Значення *Madcam1* у розвитку цього типу діабету показано і в іншому дослідженні. Так, реактивні до панкреатичних острівців CD4<sup>+</sup>-клітини здатні ініціювати розвиток діабету 1-го типу в разі перенесення їх новонародженим NOD мишам, але не викликають його у дорослих тварин. Ці відмінності зумовлені неоднаковим рівнем експресії *Madcam1* у панкреатичних острівцях у новонароджених і дорослих мишей [19]. Крім цього, блокада адресину запобігає індукції діабету в новонароджених мишей.

На останньому етапі хоумінгу лімфоцитів у ЛВ важливу роль відіграє ще один хемокиновий рецептор – *Cxcr4*, відомий як фузин, або CD184, що зв'язується зі специфічним лігандом, молекулою SDF-1 (stromal-derived factor). У нормі SDF-1 виробляють стромальні клітини багатьох тканин, а *Cxcr4* експресується на поверхні CD4<sup>+</sup> Т-клітин, дендритних клітин і В-лімфоцитів. Ми не виявили змін рівня мРНК *Cxcr4* у БЛВ у нащадків шурів з ЕГД, хоча в деяких працях було показано, що сигнальний шлях *Cxcr4/Cxcl12* захищає мишей лінії NOD від аутоімунного діабету [26]. Рівні мРНК *Cxcr4* були збільшені в ПЛВ 4-тижневих NOD-мишей порівняно з мишами Balb/C [1]. Значне зниження рівня експресії *Cxcr4* зафіксовано у тварин віком 12 тижнів і в рівнях мРНК, і в рівнях білка, тоді як збільшувався їх вміст у панкреатичних острівцях. Уведення *AMD3100*, антагоніста *Cxcr4*, зменшувало кількість *Cxcr4*<sup>+</sup> і SDF1-позитивних клітин у запалених острівцях і надавало захисні ефекти проти аутоімунного діабету. Водночас рівень транскрипції *Cxcl12*, ліганда *Cxcr4*, значно підвищується в кістковому мозку NOD-мишей порівняно з мишами ліній Balb/c і C57BL/6. Уведення NOD-мишам *AMD3100* мобілізує регуляторні Т-клітини і гематопоетичні стовбурові клітини кісткового мозку на периферію, пригнічує інсуліт і уповільнює початок діабету [11]. Трансгенні миші, що надекспресують SDF-1, стійкі 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 антиапоптотичного білка Bcl-2 і фосфорилювання проапоптотичного білка Bad [29].

Інгібування *S1pr* на Т- або В-лімфоцитах (FTY720, fingolimod) робить ці клітини нечутливими до зміни градієнта концентрації S1P між лімфатичними вузлами і біологічними рідинами і тим самим забезпечує опосередковану рецепторами *Ccr7* затримку циркулюючих лімфоцитів у лімфатичних вузлах [2]. FTY720 продемонстрував ефективність у декількох моделях імунологічних захворювань, у тому числі ревматоїдного артритру, міастенії, розсіяного склерозу, ЦД1 [25]. Підвищення рівня експресії мРНК *S1pr1* у лімфоцитах БЛВ може відігравати важливу роль у розвитку ЦД. Так, при-

пинення виходу лімфоцитів із ПЛВ за допомогою агоніста S1P рецепторів FTY720 у мишей лінії NOD запобігає подальшому прогресуванню діабету навіть під час значного інсуліту [18], при цьому після його застосування в острівцевих CD8-лімфоцитах не зростає рівень експресії цитотоксичних молекул гранзиму В, інтерферону  $\gamma$  і CD107a [8]. Мезентеріальна лімфаденектомія значно знижує розмір популяції Th17-лімфоцитів у кишківнику. Введення FTY720 індукує накопичення  $\alpha 4\beta 7^+$  IL-17A<sup>+</sup> проліферуючих клітин у БЛВ [10].

**Висновки.** Зміни в рівні експресії регуляторів “хоумінгу” лімфоцитів у БЛВ впливають на розподіл Th1-, Th17- і Treg-клітин у нащадків щурів з ЕГД. Формування оральної толерантності до інсуліну супроводжується зниженням відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *S1pr1* у клітинах БЛВ, сумарної щільності Ror $\gamma$ <sup>+</sup>- і T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Aboumrad E, Madec AM, Thivolet C.* The CXCR4/CXCL12 (SDF-1) signalling pathway protects non-obese diabetic mouse from autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2007;148:432-439.
2. *Chew WS, Wang W, Herr DR.* To fingolimod and beyond: The rich pipeline of drug candidates that target S1P signaling. 2016;113:521-532.
3. *Clahsen T, Pabst O, Tenbrock K, Schippers A, Wagner N.* Localization of dendritic cells in the gut epithelium requires MAdCAM-1. *Clin Immunol.* 2015;156(1):74-84.
4. *Comerford I, Harata-Lee Y, Bunting MD, Gregor C, Kara EE, McColl SR.* A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24(3):269-283.
5. *Davalos-Misslitz AC, Rieckenberg J, Willenzon S, Worbs T, Kremmer E, Bernhardt G, Förster R.* Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 2007;37:613-622.
6. *Field J, Biondo MA, Murph K et al.* Experimental Autoimmune Gastritis: Mouse Models Of Human Organ-specific Autoimmune Disease. *International Reviews of Immunol.* 2009;28:93-110.
7. *Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A.* CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):362-371.
8. *Graham KL, Krishnamurthy B, Fynch S, Mollah ZU, Slattery R, Santamaria P 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;178(6):2716-2725.
9. *Griffith JW, Sokol CL, Luster AD.* Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:659-702.
10. *Kawabe T, Sun SL, Fujita T, Yamaki S, Asao A, Takahashi T et al.* Homeostatic proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells in mesenteric lymph nodes generates gut-tropic Th17 cells. *J Immunol.* 2013;190(11):5788-5798.
11. *Leng Q, Nie Y, Zou Y, Chen J.* 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;9:51.
12. *Mackley EC, Houston S, Marriott CL, Halford EE, Lucas B, Cerovic V et al.* CCR7-dependent trafficking of ROR $\gamma$  ILCs creates a unique microenvironment within mucosal draining lymph nodes. *Nat Commun.* 2015;6:58-62.
13. *Macpherson A.* Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med.* 2006;203(3):497-500.
14. *Menning A, Hopken UE, Siegmund K, Lipp M, Hamann A, Huehn J.* Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. *Eur J Immunol.* 2007;37:1575-1583.
15. *Moschovakis GL, Förster R.* Multifaceted activities of CCR7 regulate T-cell homeostasis in health and disease. *Eur J Immunol.* 2012;42(8):1949-1955.
16. *Olmos S, Stukes S, Ernst JD.* Ectopic activation of Mycobacterium tuberculosis specific CD4<sup>+</sup> T cells in lungs of CCR7<sup>-/-</sup> mice. *J of Immunol.* 2010;184:895-901.
17. *Pabst O, Wahl B, Bernhardt G, Hammerschmidt SI.* Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(10):945-951.
18. *Penaranda C, Tang Q, Ruddle NH, Bluestone JA.* Prevention of diabetes by FTY720-mediated stabilization of peri-islet tertiary lymphoid organs. *Diabetes.* 2010;59(6):1461-1468.
19. *Phillips JM1, Haskins K, Cooke A.* MAdCAM-1 is needed for diabetes development mediated by the T cell clone, BDC-2.5. *Immunology.* 2005;116(4):525-531.
20. *Rivera J, Proia RL, Olivera A.* The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):753-763.
21. *Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Förster R.* Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:203-242.
22. *Shan Z, Xu B, Mikulowska-Mennis A, Michie SA.* CCR7 directs the recruitment of T cells into inflamed pancreatic islets of nonobese diabetic (NOD) mice. *Immunol Res.* 2014;58(2-3):351-357.
23. *Spiegel S, Milstien S.* The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):403-415.
24. *Tarabar D, Hirsch A, Rubin DT.* Vedolizumab in the treatment of Crohn's disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;10(3):283-290.
25. *Tsuji T, Inoue M, Yoshida Y, Fujita T, Kaino Y, Kohno T.* 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;3:132-137. **26.** Vidaković M, Grdović N, Dinić S, Mihailović M, Uskoković A, Jovanović J. The Importance of the CXCL12/CXCR4 Axis in Therapeutic Approaches to Diabetes Mellitus Attenuation. *Front Immunol.* 2015;6:403. **27.** Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, Pabst O. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006;203:519-527. **28.** Xu B, Cook RE, Michie SA. Alpha4beta7 integrin/MAdCAM-1 adhesion pathway is crucial for B cell migration into pancreatic lymph nodes in nonobese diabetic mice. *J Autoimmunol.* 2010;35(2):124-129. **29.** Yano T, Liu Z, Donovan J, Thomas MK, Habener JF. 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;56:2946-2957.

Стаття надійшла до редколегії 28.02.2017

## RESEARCH ARTICLE

### **Transcriptional Induction of Regulatory Genes *Madcam1*, *S1pr1*, *Cxcr4* and *Ccr7* that Control Lymphocyte Recirculation and Homing in Terms of Experimental Gestational Diabetes Affects T-cells Distribution in Mesenteric Lymph Nodes in Offspring**

T. PROZOROVA, A. KAMYSHNY, I. TOPOL

Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, Ukraine

Formation of peripheral immunological tolerance (PIT) to self-antigens is an important mechanism for preventing the development of autoimmune diseases. Maternal hyperglycemia that develops in gestational diabetes (GD) can influence on the morphogenesis of the immune system and leads to violations of PIT formation to pancreatic antigens. Using mucosa is an attractive way to treatment by administering antigens as tolerogen, especially in children. In animal models oral or intranasal administration of antigen can induce PIT. Mesenteric lymph nodes (MLN) is a major transition point for recirculating lymphocytes of gastrointestinal associated lymphoid tissue and at the same time - the main places for PIT induction. Homing of lymphocytes in MLN is regulated with addressin *Madcam1*, chemokine receptors *Cxcr4* and *Ccr7*. And sphingosine-1-phosphate receptors *S1pr1* activate T-cell exit from MLN. We studied descendants of intact Wistar rats (males), offspring of rats with experimental gestational diabetes (EGD) and descendants of rats with EGD which received short-acting human insulin orally using a pipette for the first 14 days of life at a dose of 30 IU. Each group was studied in age 1 and 6 months.

We use RT-PCR method for investigating of mRNA expression levels of genes *Madcam1*, *Cxcr4*, *Ccr7* and *S1pr1* in MLN of experimental rats. As reference gene to determine the relative value of changes in the expression level of target genes was used glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. Normalized relative quantity of cDNA target genes was determined by the method  $\Delta\Delta Ct$ . The structure of the population of T-bet<sup>+</sup>, Rorγt<sup>+</sup>, Foxp3<sup>+</sup>-cells (i.e., Th1, Th17 and Treg-lymphocytes) were studied based on the analysis of serial histological sections of MLN and data of their morphometric and densitometric characteristics. We determined the absolute (number of cells per 1 mm<sup>2</sup> of area) and relative (%) density the subsets of immunopositive cells in the investigated areas of MLN.

Expression analysis of homing receptors in MLN revealed an expected significant increasing of *Ccr7* and *Madcam1* mRNA in offsprings of animals with EGD, indicating the activation of the immune cells of the lymphoid tissue of the intestine, which is accompanied by intensification of lymphocytes homing and confirms the involvement of these receptors in the pathogenesis of diabetes mellitus. We were unable to detect changes in the mRNA levels of another regulator - *Cxcr4* in MLN of the offspring of rats with EGD. Increased expression level of S1PR1 mRNA of MLN lymphocytes in the offspring of animals with diabetes confirms its important role in the progression of diabetes. Signals of chemokine receptors affect the activation of different Th cells subsets and we may assume their pivotal role in the development of autoimmune diseases, particularly diabetes type 1, through violation of oral tolerance. Oral tolerance is generated exclusively in MLN antigens that are transported from the intestinal surface by DCs through the afferent lymphatics. Thus it is possible to establish communication between the homing

---

regulators and various subsets of Th cells. We recorded a significant increase of T-bet<sup>+</sup> and Rorγt<sup>+</sup>-cells in the offspring of rats with EGD, which corresponds to the activation of pro-inflammatory lymphocytes Th1 and Th17. At the same time, we observed a decrease of Foxp3<sup>+</sup>-cells, Treg-lymphocytes responsible for the suppression of the immune response.

**Key words:** experimental gestational diabetes, mesenteric lymph nodes, *Madcam1*, *Cxcr4*, *Ccr7*, *S1pr1*.