

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ПУТІЛІН ДЕНИС АНАТОЛІЙОВИЧ



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

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

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор **Камишний Олександр Михайлович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Воронцова Лоліта Леонідівна**, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти» МОЗ України, завідувач кафедри клінічної лабораторної діагностики;

доктор медичних наук, професор **Вастьянов Руслан Сергійович**, Одеський національний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри загальної і клінічної патологічної фізіології.

Захист відбудеться «20» вересня 2018 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, Україна, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, Україна, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий «6» липня 2018 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.мед.н.



Т.В. Іваненко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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

В останні роки стало зрозуміло, що саме в панкреатичних лімфатичних вузлах (ПЛВ), які дренують підшлункову залозу, а також окремі сегменти кишківника відбувається початкова активація діабетогенних $CD8^+$ та $CD4^+$ Т-клітин до їх міграції в панкреатичні островці [Calderon V. et al., 2012]. Антиген-презентуючі клітини ПЛВ містять острівцеві антигени (Аг) і активують про-діабетогенні субпопуляції Т-лімфоцитів [Byersdorfer C. et al., 2005; Zhang Y. et al., 2010], посилюють Т-клітинну відповідь після початкової зустрічі з панкреатичними Аг в панкреатичних островцях [Mohan J. et al., 2013]. Між тим, роль ПЛВ в прогресії діабету вимагає додаткових уточнень і доповнень.

Метаболічні зміни, які розвиваються в умовах ЦД, насамперед гіперглікемія, здатні безпосередньо впливати на імунометаболізм лімфоцитів [Buck M. et al., 2015; Notamisliligil G., 2017; Freitag J. et al., 2016]. Т-клітини експресують низку транспортерів глюкози, основним із яких є Glut 1 [Palmer C. et al., 2016; Macintyre A. et al., 2014; Jones N. et al., 2017]. Продіабетогенні Th1 і Th17-клітини характеризуються високим рівнем експресії Glut 1 і схильністю до гліколізу [Michalek R. et al., 2011; Almeida L. et al., 2016], у супресорних Treg - навпаки, низький рівень експресії Glut 1 і висока швидкість окислювального метаболізму [Basu S. et al., 2015; Newton R. et al., 2016]. В свою чергу, важливим регулятором імунометаболізму лімфоцитів є протеїнкіназа mTOR [Pollizzi K. et al., 2015; Vignali P. et al., 2017], а одним із її блокаторів - метформін, який діє через АМФ-активуєму протеїнкіназу (АМПК) [Foretz M. et al., 2014; Hardie D. et al., 2014; Ma E. et al., 2017]. Висока активність mTOR здатна посилювати прогресію діабету через активацію ефекторних прозапальних субпопуляцій лімфоцитів [Shan J. et al., 2015; Liu Y. et al., 2015], і навпаки, низька сприяє диференціюванню Treg [Chapman N. et al., 2014; Zeng H. et al., 2015], блокуючих інсулін. Тим не менш, про рівень транскрипційної активності генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α* в ПЛВ при розвитку експериментального стрептозототин-індукованого цукрового діабету (ЕСЦД) майже нічого невідомо.

Критичну роль в прогресії діабету можуть грати і зміни експресії паттерн-розпізнаючих рецепторів (ПРР) вродженого імунітету, зокрема мембранних толл-подібних рецепторів 2 і 4 типу (TLRs), цитоплазматичних NOD-подібних рецепторів (NLR), сенсорів вірусних РНК RIG-подібних рецепторів (RLRs) [Tai N. et al., 2016; Needell J. et al., 2017; Itoh A. et al., 2017]. У мишей, дефіцитних по рецепторам NOD2, ЕСЦД не розвивається [Costa F. et al., 2016], порушена

індукція Th1 і Th17-клітин в ПЛВ, а про ефекти метформіна на експресію ПРР лімфоцитами ПЛВ взагалі нічого не відомо. Не менш важливу роль в розвитку діабету можуть грати порушення периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних Ag [Jeker L. et al., 2012], яка в ПЛВ регулюється генами *Aire* [Proekt I. et al., 2017] та *Deaf1* [Yip L. et al., 2015]. Зміни їх активності, в свою чергу, здатні впливати на розподіл ефекторних Т-клітин в ПЛВ [Yang S. et al., 2015; Gardner J. et al., 2013], а функціональні дефекти Treg поряд з експансією Th17-лімфоцитів є основними ознаками порушень в ПЛВ у пацієнтів з ЦД 1-го типу та експериментальних тварин [Ferraro A. et al., 2011; Nti B. et al., 2012; Sebastiani G. et al., 2017]. Резидентні до ПЛВ і панкреатичних острівців Т-клітини характеризуються низкою функціональних особливостей [Lu J. et al., 2017; Radenkovic M. et al., 2017].

Парапанкреатична жирова тканина (ПЖТ) також може бути важливим додатковим джерелом прозапальних стимулів в умовах діабету [Kumari M. et al., 2017; Shao L. et al., 2016], а адипоцити людини та гризунів експресують практично весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів [Schäffler A. et al., 2010]. ПЖТ містить цілі кластери клітин вродженої та адаптивної імунної системи [Kohlgruber A. et al., 2016], інфільтруючих адипоцитів від балансу яких залежить рівень продукції низки цитокінів, які чинять як системні, так і паракринні ефекти на функцію підшлункової залози. Treg ПЖТ взагалі виділені в окрему субпопуляцію [Becker M. et al., 2017].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології» (2012-2017 рр., № держреєстрації 0112U005642). Дисертант є співвиконавцем теми.

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

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

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

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

3. З'ясувати відносний рівень мРНК регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів *Aire* та *Deaf1* і динаміку клітинного складу $T\text{-bet}^+$ ($Th1$), $ROR\gamma^+$ ($Th17$) і $Foxp3^+$ -лімфоцитів ($Treg$) в панкреатичних лімфатичних вузлах щурів в цих же експериментальних групах.

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

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

Предмет дослідження — морфо-функціональний стан клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини в умовах експериментального стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету і після введення метформіну.

Методи дослідження: патофізіологічні (моделювання стрептозотоцинового діабету), біохімічні (визначення рівня глюкози), морфометричні (визначення площі і периметру клітин), імунофлюоресцентні (реакція прямої або непрямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних або поліклональних антитіл для ідентифікації $TLR2^+$ -, $TLR4^+$ -, $NOD2^+$ -, $RIGI^+$ -, $T\text{-bet}^+$ -, $ROR\gamma^+$ -, $Foxp3^+$ - і $mTog^+$ -клітин), метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ) (оцінка відносного рівня мРНК генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α* , *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *IL-1 β* , *IL-17A*), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз (розрахунок абсолютної і відносної щільності розподілу різних імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах панкреатичних лімфатичних вузлів і парапанкреатичної жирової тканини, а також щільності рецепторів на ідентифікованих імунопозитивних клітинах), методи статистичного аналізу отриманих результатів.

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

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

встановлено, що в умовах ЕСЦД знижується рівень ектопічної експресії в клітинах ПЛВ генів-регуляторів периферичної імунологічної толерантності *Deaf1* та *Aire*, що супроводжується зменшенням кількості Treg в ПЛВ. Експериментально доведено активацію компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЦД і зростання кількості TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ щурів, забезпечуючи нове розуміння молекулярного патогенезу ЦД 1-го типу.

Розширені наукові поняття щодо ролі жирової тканини у прогресії діабету. З'ясовано, що в умовах ЕСЦД зростає кількість TLR2⁺- та TLR4⁺-адипоцитів у парапанкреатичній клітковині, що індукує прозапальну сигналізацію в жировій тканині і підвищує рівень експресії мРНК IL1 β і IL17A на тлі транскрипційної репресії Foxp3. Обґрунтована доцільність застосування метформіну для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД. Вперше продемонстрована здатність метформіну впливати на транскрипційну активність генів *AMPK1 α* і *mTOR*, зменшувати чисельність лімфоцитів, експресуючих PRR, змінювати розподіл Treg і Th17-клітин у ПЛВ щурів з ЦД.

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

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у практику наукових досліджень і навчальний процес на кафедрах патологічної фізіології Буковинського державного медичного університету МОЗ України, Харківського національного медичного університету МОЗ України, Запорізького державного медичного університету МОЗ України, та кафедрі нормальної фізіології Запорізького національного університету МОН України, що підтверджено відповідними актами впровадження.

Дисертант, спільно з співавторами, брав участь у розробці й апробації нового способу виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразки тканин (Пат. на корисну модель Україна №102400), що дозволяє підвищити ефективність специфічного виділення цільового продукту та знизити матеріальні затрати та час проведення дослідження.

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно здійснив патентно-інформаційний пошук, провів аналіз вітчизняних і зарубіжних інформаційних джерел відповідно до теми дослідження. Здобувачем виконано експериментальне

моделювання досліджуваної патології, проведено статистичний аналіз отриманих результатів, розроблено основні теоретичні та практичні положення роботи. Спільно з науковим керівником здійснено вибір теми дисертаційної роботи, проведено аналіз та узагальнення отриманих результатів, обґрунтування та формулювання висновків. Автором написано всі розділи дисертації, оформлено наукові публікації й автореферат. У всіх наукових працях, що містять результати дисертаційних досліджень, використано фактичний матеріал, отриманий автором у процесі виконання роботи.

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

Апробація результатів дисертації. Апробація дисертаційної роботи відбулася 30 січня 2018 р. на спільному засіданні кафедр анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; патологічної фізіології; нормальної фізіології; патологічної анатомії і судової медицини; 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 Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю “Сучасні аспекти медицини та фармації” (Запоріжжя, 2014); VIIth meeting of the association of endocrinologist of Ukraine (Kyiv, 2014); VII Всероссийском диабетологическом конгрессе (Москва, 2015); 18th European Congress of Endocrinology (Munich, 2016); 46th Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, 2016); 19th European Congress of Endocrinology (Lisbon, 2017); International conference Novel Concepts in Innate Immunity (Tübingen, 2017).

Публікації. Результати дисертаційного дослідження висвітлено у 17 наукових працях, серед яких 6 статей у фахових виданнях України, 4 статті у закордонних періодичних виданнях, 6 публікацій у матеріалах і тезах наукових форумів, 1 патент України на корисну модель.

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

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведені на 100 самцях щурів лінії Вістар масою 110–150 г, віком 2–3 місяці. Щури перебували в умовах природного освітлення при вільному доступі до води та їжі. Об'єктом дослідження у експериментальних тварин були панкреатичні лімфатичні вузли, парапанкреатична жирова тканина та периферична кров. Експериментальні тварини були розподілені на п'ять експериментальних груп по 20 щурів. Група 1 – контрольні щури, яким одноразово внутрішньоочеревинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН=4,5); група 2 – щури з 3-х тижневим експериментальним стрептозотозин-індукованим цукровим діабетом (ЕСІЦД); група 3 – щури з 5-ти тижневим ЕСІЦД; група 4 – щури з 3-х тижневим ЕСІЦД, яким внутрішньошлунково щоденно на протязі 3-х тижнів вводили метформін в дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету; група 5 – щури з 5-ти тижневим ЕСІЦД, яким внутрішньошлунково щоденно на протязі 5-ти тижнів вводили метформін в дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету.

Для індукції ЕСІЦД стрептозотозин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг, розчиненому в 0,5 мл 0,1 М цитратному буфері (рН=4,5) перед самим моментом введення. Час, що минув з дня введення препарату, в подальшому викладенні матеріалу інтерпретувався як тривалість перебігу діабету. Визначення концентрації глюкози в крові, яку брали з хвостової вени, проводили глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу «BIONIMERightest™ GM 110» (Швейцарія) на 1, 3, 7, 14, 21 і 35 добу після ін'єкції стрептозотозину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 3 добу після введення стрептозотозину для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії натще > 8,0 ммоль/л. Для фармакологічної корекції нами використовувався метформін (АТ ТЕВА КУТНО, Польща), який вводили щурам внутрішньошлунково в дозі 50 мг/кг. Щурам з 3-х тижневим ЕСІЦД на протязі 3-х тижнів щоденно, починаючи з 1 дня індукції діабету; щурам з 5-ти тижневим ЕСІЦД на протязі 5-ти тижнів щоденно, починаючи з 1 дня індукції діабету. На 21 та 35 добу після введення STZ тварин виводили з експерименту методом одномоментної декапітації під наркозом (етамінал натрію 40 мг / кг внутрішньоочеревинно). Вилучали ПЛВ і ділянки ПЖТ, які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена і після промивки та дегідратації заливали в парапласт (TradeMark of McCormick Scientific, LLC: Made U.S.A.).

Для ідентифікації TLR2 і TLR4 у гістологічних зрізах ПЛВ і ПЖТ застосовували прямий імуофлюоресцентний метод з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флюоресцеїна ізотіоціанатом (FITC). Для ідентифікації NOD2, RIGI, T-bet, mTor, RORγt і Foxp3 у гістологічних зрізах

ПЛВ застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод з використанням відповідних поліклональних антитіл. Структуру популяції імунопозитивних клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів й даних їх морфометричних і денситометричних характеристик, за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Зображення отримували на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина). Вивчали імунопозитивні клітини, розташовані в паракортикальній зоні і м'якотних тяжках ПЛВ.

Для дослідження експресії мРНК генів *GLUT1*, *mTOR*, *AMPK1 α* , *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *IL-1 β* , *IL-17A* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР-РЧ) з використанням ампліфікатора CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems з програмним забезпеченням CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Використовували архівний гістологічний матеріал (парафінові блоки) віком 2 роки. Тотальну РНК отримували з гістологічних зрізів завтовшки 15 мкм, для цього проводили їх попередню депарафінізацію в ксилолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %). Підготовлені зразки гомогенізували, поміщали в пробірки "Ахуген" (США), проводили додаткову депарафінізацію і повторну регідратацію тканин, згідно протоколу дослідження. Виділення тотальної РНК проводили з використанням набору „Trizol RNA Prep 100” («ИЗОГЕН», РФ), для синтезу кДНК проводили реакцію зворотної транскрипції з використанням набору ОТ-1 фірми «Синтол» (РФ). Молекулярно-генетичні дослідження рівня експресії мРНК генів здійснювали за допомогою ампліфікатора CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набору реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмами Metabion (Німеччина) і ThermoScientific (США). В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний 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 в 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.

Одержані експериментальні дані обробляли на персональному комп'ютері за допомогою ліцензійного статистичного пакету «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft Inc., №AXXR712D833214FAN5). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). При порівнянні даних використовували параметричний t-критерій Стюдента, після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. При перевірці статистичних гіпотез нульову гіпотезу відкидали при $p < 0,05$.

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

Гіперглікемія викликала транскрипційну індукцію гена транспортерів глюкози *Glut 1* в клітинах ПЛВ. Зокрема, розвиток діабету призводив до зростання вмісту мРНК *Glut 1* в 9,9 разів ($p < 0,05$) на третьому тижні і в 28,9 разів ($p < 0,05$) на п'ятому тижні патологічного процесу (Рис.1 А). Ці зміни супроводжувались збільшенням рівня мРНК протеїнкінази mTOR в 5,3 рази ($p < 0,05$) при 3-х тижневому і в 3,3 рази ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСІЦД порівняно з контрольною групою щурів (Рис.1 В). Розвиток ЕСІЦД не впливав на загальну кількість mTOR⁺-клітин в ПЛВ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу і призводив до їх зростання на 5-й тиждень ЕСІЦД – на 24 % ($p < 0,05$) в паракортикальній зоні і на 34 % ($p < 0,05$) в м'якотних тяжах переважно за рахунок збільшення щільності популяції mTOR⁺-малих і середніх лімфоцитів.

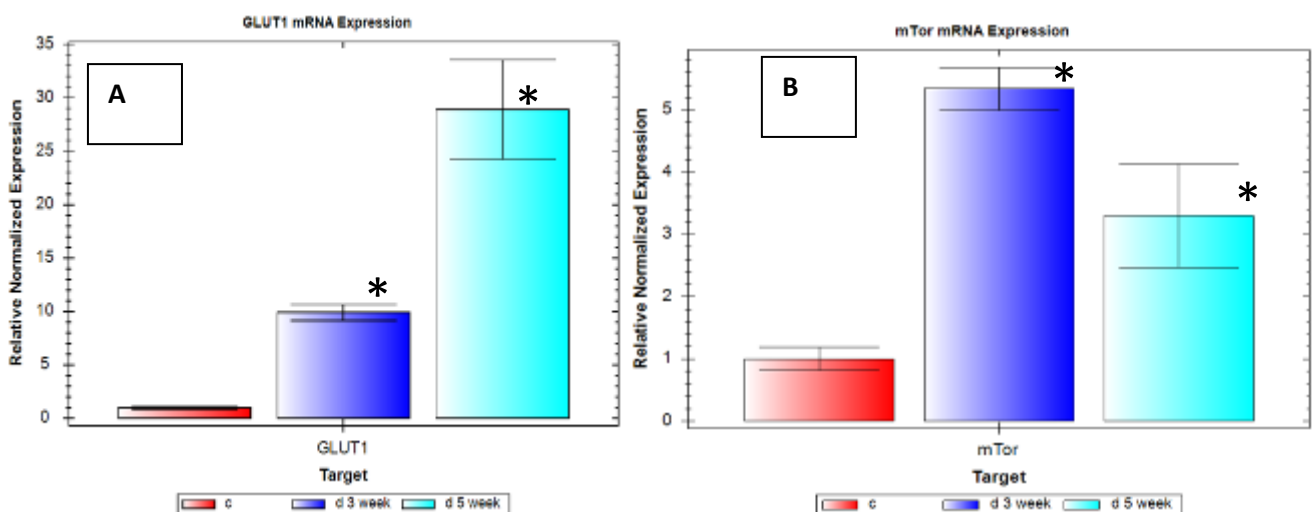


Рис. 1 Відносна нормалізована кількість мРНК генів *GLUT1* (А) та *mTOR* (В) в клітинах ПЛВ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta Ct$ з референс-геном *GAPDH*. c-контроль; d3, d5 – 3-х і 5-ти тижневий ЕСІЦД відповідно.

Отримані результати пояснюють, яким чином метаболічні зміни в умовах діабету здатні підсилювати автоімунну атаку на панкреатичні острівці, призводячи до формування “порочного” кола. Адже відомо, що CD4⁺T-клітини експресують цілий ряд транспортерів глюкози (Glut), зокрема Glut 1, 3, 6, і 8 [Macintyre A. et al., 2014]. Glut 1, зростання рівня транскрипційної активності якого ми і ідентифікували, функціонує головним чином на активованих, але не на перебуваючих у спокої CD4⁺T-клітинах, а зміна його експресії, напевне, може впливати на рівень диференціювання CD4⁺Th1 і Th17 клітин. Це припущення підтвердилось в наших наступних результатах, які продемонстрували превалювання прозапальних ефекторних субпопуляцій T-хелперів 1 і 17 типу в ПЛВ щурів з ЕСІЦД. Виявлена нами індукція гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЛВ, а також зростання кількості mTOR⁺-клітин, вочевидь, також були одним з тригерів превалювання Th1- і Th17-лімфоцитів в ПЛВ на фоні дефіциту супресорної сигналізації. Таке наше припущення підтверджується й іншими дослідниками, які продемонстрували, що при високій активності mTOR відбувається диференціювання «наївних» CD4⁺-клітин в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1, Th2, Th17, а також активація цитотоксичних CD8⁺-клітин [Waickman A. et al., 2012]. І навпаки, якщо активність mTOR в CD4⁺ клітинах низька, то вони диференціюються в Tрег клітини, які блокують розвиток інсуліту і прогресію діабету [Chi H., 2012].

Введення метформіну щурам з ЦД знижувало рівень глікемії (до 8,7±0,1 ммоль/л на 3 тиждень і до 7,6±0,1 ммоль/л на 5 тиждень, p<0,05) і призводило до зростання рівня транскрипційної активності АМФ-активованої протеїнкінази АМПК1α в ПЛВ. Так, відносна нормалізована кількість мРНК гену *АМПК1α* збільшувалась на 87 % (p<0,05) на 3 тиждень та майже в 38 разів (p <0,05) на 5 тиждень розвитку ЕСІЦД. Індукція АМПК1α закономірно пригнічувала експресію mTOR: ми спостерігали зменшення рівня мРНК мішені рапаміцина в ПЛВ у 14,7 разів (p<0,05) при 3-х тижневому та в 3 рази (p<0,05) при 5-ти тижневому ЕСІЦД порівняно з контрольною групою щурів. Рівень відносної нормалізованої експресії гену *Glut 1* знижувався в 2 рази (p <0,05) на 3 тиждень і в 5,7 разів (p<0,05) на 5 тиждень розвитку ЕСІЦД. При цьому кількість mTOR⁺-клітин знижувалась на 40 % (p<0,05) лише у м'якотних тяжках ПЛВ у тварин з 5-ти тижневим ЕСІЦД. Введення метформіну знижувало концентрацію мішені рапаміцину в mTOR⁺-імунопозитивних клітинах ПЛВ. Наші результати співпадають з іншими даними щодо здатності метформіну як АМФК-залежним, так і АМФК-незалежним шляхом впливати на метаболізм лімфоцитів [Zargouk M. et al., 2014]. Спроможність метформіну через активацію АМПК пригнічувати вироблення ефекторних T-лімфоцитів і стимулювати диференціювання T-регуляторних клітин була підтверджена низкою досліджень [Rolf J. et al., 2013; Kang K. et al., 2013], що пояснюють його здатність пригнічувати розвиток

автоімунних захворювань. Kang K. et al. (2013) продемонстрували здатність метформіну зменшувати кількість $\text{ROR}\gamma\text{t}^+ \text{CD4}^+ \text{Th17}$ -клітин в лімфатичних вузлах у мишей з автоімунним ревматоїдним артритом, знижувати рівень сироваткових прозапальних цитокінів TNF α і IL1 β . Здатність метформіну блокувати активацію Th17-клітин, продукцію IFN- γ і IL-17 була продемонстрована і на моделі системного червоного вовчака [Yin Y. et al., 2016]. Ефекти метформіну на рівень імунної відповіді також реалізуються через інгібування МНС-рестриктованої презентації антигенів клітин (АПК), зокрема шляхом супресії продукції дендритними клітинами ко-стимулюючих факторів, таких як CD80 і CD86 [Shin S. et al., 2013]. В нещодавньому дослідженні Forslund K. et al. (2015) продемонстрована здатність метформіну викликати зміни у кишковому мікробіомі у пацієнтів з ЦД 2 типу, зокрема впливати на продукцію коротколанцюгових жирних кислот, які через свої рецептори, зокрема FFAR2 – впливають на диференціювання Т-клітин, особливо Treg. Загалом, встановлене нами зростання рівня мРНК AMPK1 α та пригнічення експресії mTOR і Glut 1 в ПЛВ після введення метформіну щурам з ЦД свідчить про можливість його використання для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД.

Наступним етапом стало оцінити рівень активації компонентів вродженої імунної системи в ПЛВ. Як відомо, адаптивна ланка імунної відповіді без попереднього включення вроджених компонентів, зокрема сигналізації через ПРР, взагалі не працює. Ми припустили, що надмірна активація ПРР в ПЛВ може суттєво впливати на баланс Т-клітин в цьому регіоні і наступну прогресію інсуліту. Це і обумовило наш вибір дослідження цілої низки рецепторів вродженої імунної системи (РВІС) в ПЛВ – як мембранних, так і цитоплазматичних. Ми з'ясували, що розвиток діабету супроводжується зростанням кількості TLR2 $^{+}$ - (на 59 % – в 3,1 рази, $p < 0,05$), TLR4 $^{+}$ - (на 61 % – в 2,1 рази, $p < 0,05$), NOD2 $^{+}$ - (на 38 % – в 2 рази, $p < 0,05$) і RIGI $^{+}$ -лімфоцитів (в 2,4 рази – на 77 %, $p < 0,05$) у паракортикальній зоні і TLR4 $^{+}$ - (на 60 % на 3 тиждень, $p < 0,05$) та RIGI $^{+}$ -лімфоцитів (на 58 % – в 3,7 рази, $p < 0,05$) у м'якотних тяжках ПЛВ щурів, змінює щільність ПРР на імунних клітинах (Рис. 2. А-В). Ефекти по зростанню кількості клітин, експресуючих РВІС залежали від тривалості патологічного процесу – збільшення терміну ЕСЦД викликало сильнішу дію по відношенню до TLR2 $^{+}$ -, TLR4 $^{+}$ -, NOD2 $^{+}$ -лімфоцитів в паракортикальній зоні і RIGI $^{+}$ -лімфоцитів у м'якотних тяжках ПЛВ щурів (рис. 2. А-В). Отримані дані свідчать, що ЕСЦД призводить до значної активації вродженої імунної системи і це, в свою чергу, може суттєво впливати на рівень активації адаптивної імунної відповіді, диференціювання субпопуляцій хелперних Т-клітин в ПЛВ.

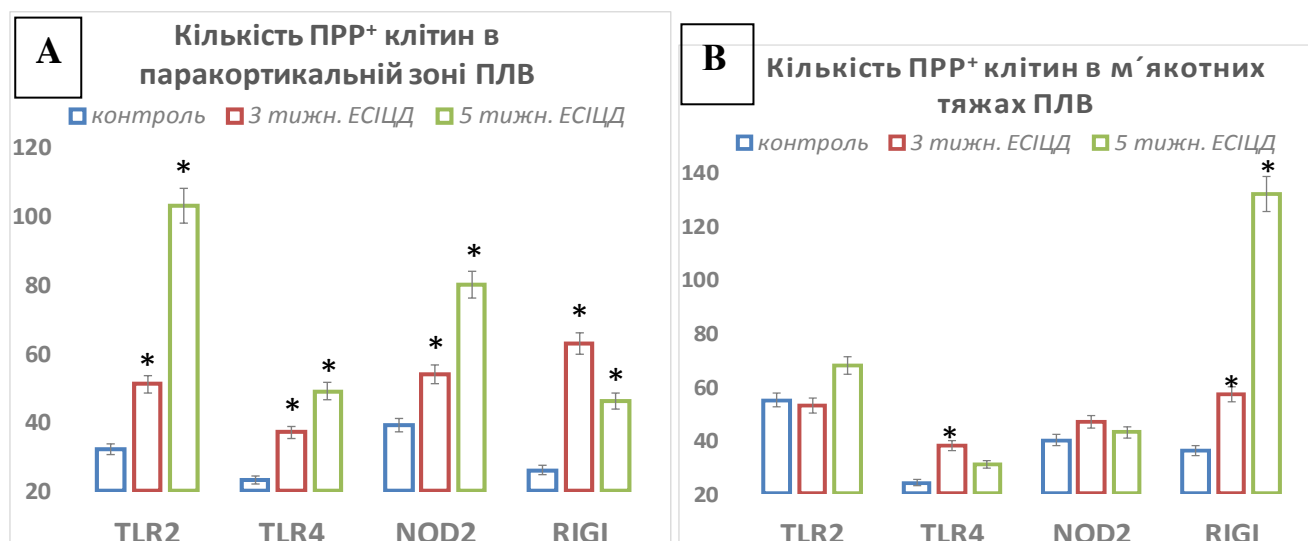


Рис. 2 Сумарна кількість клітин, експресуючих рецептори вродженого імунітету в паракортикальній зоні (А) і м'якотних тяжках ПЛВ (В) щурів з ЕСІЦД.

Отримані нами результати співпадають з низкою інших досліджень. Так, Kim et al. (2007) показали, що розвиток аутоімунного діабету (як спонтанного, так і стрептозотоцин-індукованого) було помітно уповільнено у TLR2^{-/-} мишей. Застосування в умовах стрептозотоцин-індукованого діабету у мишей лінії C57BL/6 агоністу TLR2 – *Pam3CSK4*- призводить до збільшення у ПЛВ кількості макрофагів, дендритних клітин, прозапальних CD4⁺TNFα⁺, CD4⁺IFNγ⁺ та CD4⁺IL-17⁺-клітин, а також зменшує число регуляторних CD25⁺Foxp3⁺ Т-лімфоцитів. Burrows et al. (2015) показали, що захворюваність діабетом достовірно не відрізнялась у звичайних і TLR2-дефіцитних мишей лінії NOD, якщо вони утримувались в безмікробних умовах. Це говорить про те, що коменсальні мікроорганізми регулюють про-діабетичні ефекти TLR2. Введення моноклональних антитіл до TLR4 блокує початок діабету у мишей і сприяє експансії Tregs, а нещодавні дослідження Costa F. et al. (2016) показали важливу роль NOD2 в розвитку стрептозотоцин-індукованого ЦД – у мишей, дефіцитних по NOD2 ЕСІЦД не розвивається, а також порушена індукція Th1 і Th17-клітин в ПЛВ. Передбачається, що саме в ПЛВ NOD2-рецептори активуються лігандами мікрофлори, що транслокується з кишечника з наступним підвищенням в них рівня IL-17– і IFN-γ– продукуюючих CD4⁺ і CD8⁺ ефекторних Т-клітин. Щодо виявленого нами підвищення рівня RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ, то дизрегуляцію системи цитоплазматичних сенсорів вірусної РНК, до яких і належать RIG-like рецептори, також пов'язують з прогресією ЦД [Wada J. et al., 2016].

Як показали наші результати, введення метформіну щурам з ЦД зменшує чисельність в ПЛВ лімфоцитів, експресуючих PRR, за винятком NOD2, впливає на щільність мембранних і концентрацію цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету. При цьому кількість клітин, експресуючих мембранні TLR2 і TLR4 зменшувалась більш активно у паракортикальній зоні (в 2,1 рази та на 41 % – в 2,5

рази відповідно, $p < 0,05$), а цитоплазматичних сенсорів вірусних РНК RIGI – у м'якотних тяжках ПЛВ щурів на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД (в 3,5 рази, $p < 0,05$). Таким чином, метформін гальмує рівень активації компонентів вродженої імунної системи в ПЛВ.

Як відомо, периферична імунологічна толерантність до панкреатичних антигенів в ПЛВ може бути опосередкована екстратимічними Aire-експресуючими клітинами (eTACs) [Gardner J. et al., 2008], а також фактором Deaf1 [Fletcher A. et al., 2011] і балансом між регуляторними (Tregs) та ефекторними Т-клітинами, зокрема Th1 і Th17 [Chow Z. et al., 2015]. Тому, наступний етап наших досліджень полягав у з'ясуванні відносного рівня мРНК регуляторів експресії периферичних тканиноспецифічних антигенів Aire та Deaf1 і динаміки клітинного складу Tbet⁺ (Th1), Rorγt⁺ (Th17) і Foxp3⁺-лімфоцитів (Treg) в ПЛВ щурів. Нами встановлено зменшення відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Deaf1* та *Aire* в ПЛВ. Зокрема, експресія Deaf1 зменшилась в 4,2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-х тижневим ЕСЦД і в 2,5 рази ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД порівняно з контрольною групою. Експресія Aire зменшилась в 2 рази ($p < 0,05$) в ПЛВ щурів з 3-тижневим ЕСЦД і в 50 разів ($p < 0,05$) у щурів з 5-ти тижневим ЕСЦД.

Роль змін експресії гену *Deaf1* нещодавно також була підтверджена і в інших роботах. Зокрема, Yip L. та ін. (2014) виявили, що експресія гену, що кодує регулятор транскрипції Deaf1 в ПЛВ змінюється паралельно з експресією генів, що кодують ряд специфічних для панкреатичних острівців тканинних антигенів, включаючи інсулін 1 (*Ins1*), інсулін 2 (*Ins2*), глюкагон і інші. При цьому експресія Deaf1 та генів, які кодують β-клітинні антигени була суттєво зменшена в ПЛВ мишей лінії *NOD* у віці 12 тижнів, час, який співпадає з початком деструктивного інсуліту. Щодо здатності Aire безпосередньо впливати на розподіл Treg і Th17-клітин, то Yang S. та ін. (2015) показали спроможність Aire впливати на перинатальну генерацію особливого пулу Foxp3⁺Treg-клітин, що зберігається і у дорослих.

Виявлені нами зміни експресії генів *Deaf1* та *Aire* здатні також, разом з регуляторами імунометаболізму лімфоцитів, безпосередньо впливати на процес диференціювання Т-клітин в ПЛВ. І дійсно, на наступному етапі ми продемонстрували, що розвиток ЕСЦД супроводжується змінами розподілу субпопуляцій Т-хелперів в ПЛВ щурів: сумарна щільність Tbet⁺-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ зросла на 56 % - 87 % ($p < 0,05$), у м'якотних тяжках ПЛВ ці ж показники збільшились в 2,3 рази і на 68 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою; загальна кількість Т-хелперів 17 типу у паракортикальній зоні ПЛВ підвищувалась в 2,6 разів ($p < 0,05$) на 3-й тиждень і на 46 % ($p < 0,05$) на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД, у м'якотних тяжках ПЛВ – на 65 % - 69 % відповідно ($p < 0,05$) (Рис. 3 А-В). Зростання чисельності Th1 більш виразним було у м'якотних тяжках, Th17 – у паракортикальній зоні ПЛВ. Діабет різноспрямовано

впливає на концентрацію транскрипційних факторів Tbet і ROR γ t в імунних клітинах. Розвиток діабету супроводжується зменшенням сумарної щільності субпопуляції Т-регуляторних клітин в ПЛВ на 3-й тиждень ЕСІЦД на 25 % - 28 % ($p < 0,05$), на 5-й – на 50 % ($p < 0,05$) лише в м'якотних тяжах, призводить до змін розподілу окремих класів Трег-лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію транскрипційного фактору Foxp3 в імунопозитивних клітинах м'якотних тяжів. Функціональні дефекти Т-регуляторних клітин є основними ознаками порушень в ПЛВ у пацієнтів з ЦД 1-го типу та експериментальних тварин [Nti B. et al., 2012]. Отримані нами результати співпадають з даними, що головними особливостями функціонального стану ПЛВ у пацієнтів з ЦД 1 типу є дисбаланс клітин Трег/Th17, збільшення кількості ІЛ-17-продукуючих CD4⁺ Т-клітин, специфічних до панкреатичних антигенів і присутність Трег зі зменшеною експресією Foxp3 та дефектною супресорною активністю [Ferraro A. et al., 2011].

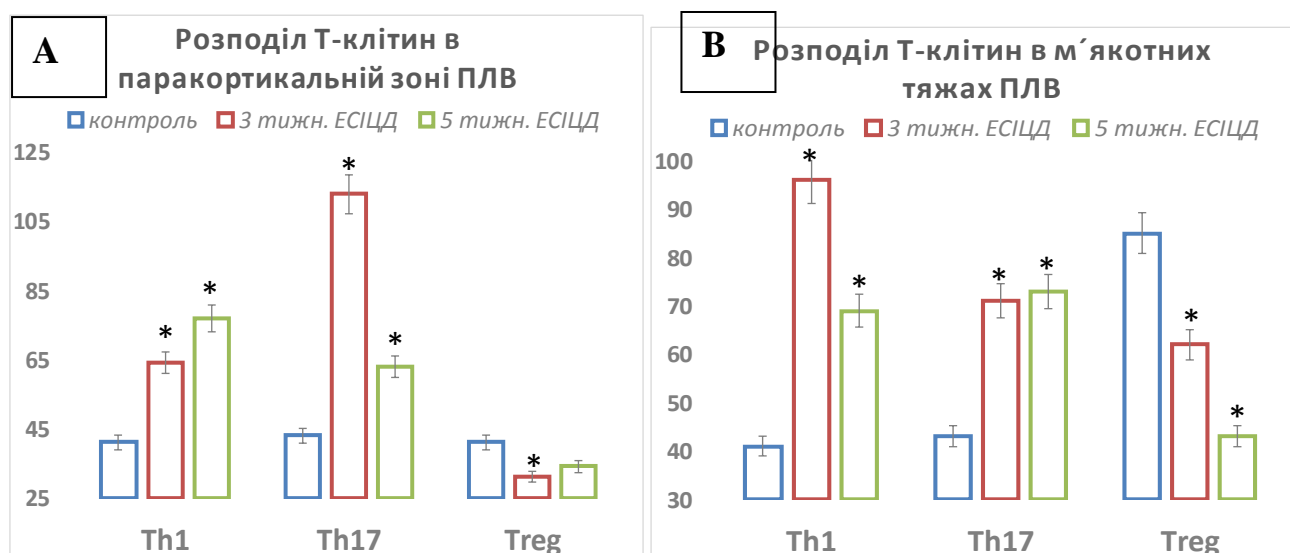


Рис. 3 Сумарна кількість Т-лімфоцитів в паракортикальній зоні (А) і м'якотних тяжах (В) ПЛВ щурів з ЕСІЦД.

Отримані нами результати також демонструють здатність метформіну збільшувати кількість Трег в ПЛВ, причому ці ефекти виражені на 3 тиждень розвитку діабету (в 2 рази, $p < 0,05$) і нівелюються до 5 тижня перебігу патологічного процесу. Введення метформіну майже не впливає на розподіл Th1-клітин у ПЛВ, за винятком паракортикальної зони у щурів з 5-ти тижневим ЕСІЦД, де їх сумарна щільність знижується на 48 % ($p < 0,05$), зменшує чисельність Th17-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 3-й тиждень (на 48 %, $p < 0,05$), а у м'якотних тяжах – на 5-й тиждень розвитку ЕСІЦД (на 27 %, $p < 0,05$) (Рис. 4 А-Д).

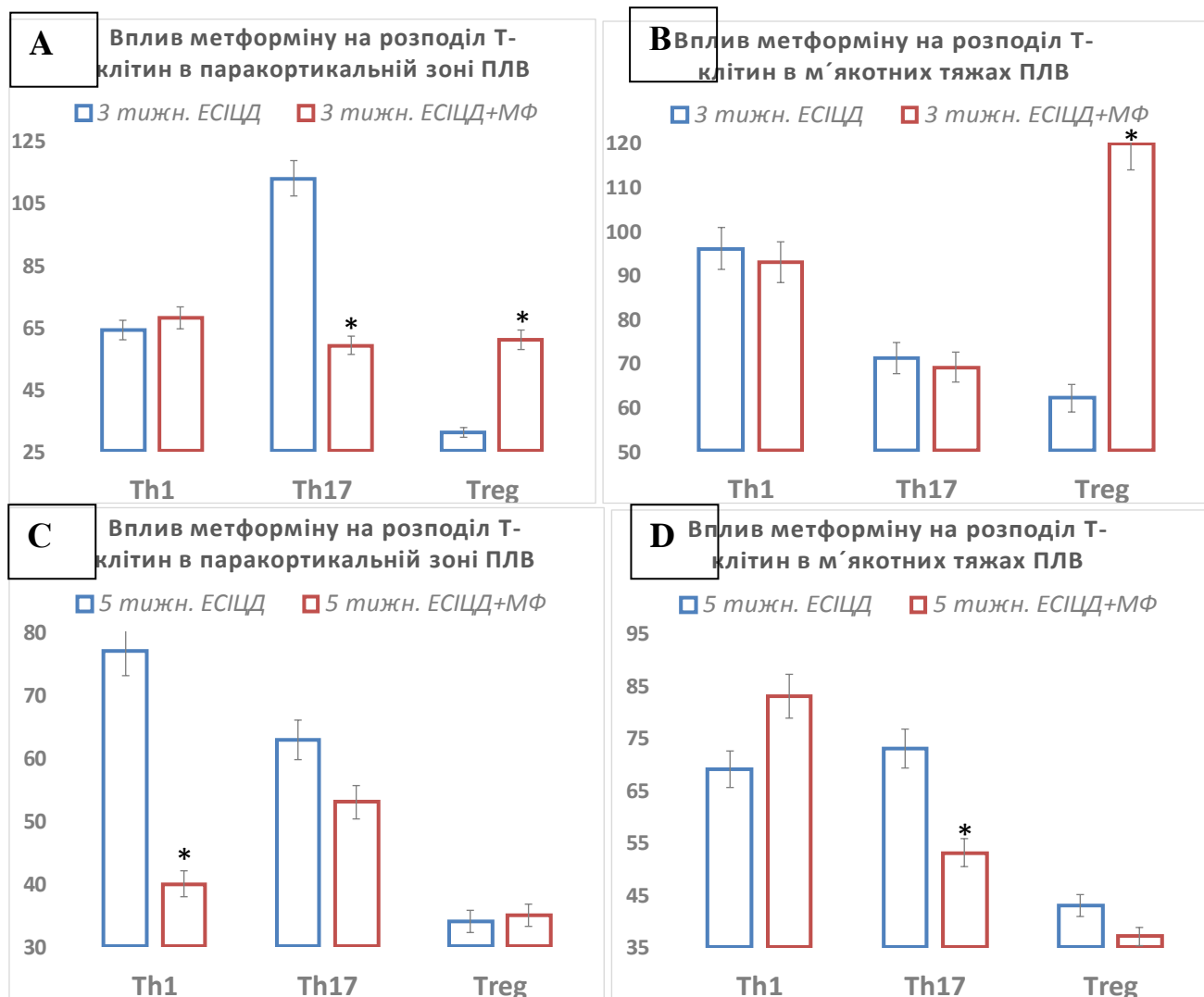


Рис. 4 Сумарна кількість Т-лімфоцитів в паракортикальній зоні (А, С) і м'якотних тяжах (В, D) ПЛВ щурів після введення метформіну тваринам з ЦД.

Наступний етап досліджень полягав у вивченні особливостей розподілу у ПЖТ адипоцитів, експресуючих TLR2 і TLR4 і відносного рівня мРНК генів *mTOR*, *Foxp3*, *IL1 β* і *IL17A* у ПЖТ при ЕСЦД і після введення метформіну. Адже, саме жирова тканина, що оточує панкреатичні острівці може бути важливим додатковим джерелом прозапальних стимулів. Ми з'ясували, що індукція діабету збільшує кількість TLR2⁺- (на 3й тиждень ЕСЦД – в 2,5 рази, на 5-й – на 77 %, $p < 0,05$) та TLR4⁺ – адипоцитів (на 3й тиждень ЕСЦД – в 1,9 разів, $p < 0,05$), переважно підвищує щільність TLR2- і TLR4-рецепторів на їх мембрані, що дійсно свідчить про активацію прозапальної сигналізації в ПЖТ. Введенням метформіну щурам з ЦД знижують загальну кількість TLR2⁺- адипоцитів на 16-24 % ($p < 0,05$), TLR4⁺- адипоцитів на 36 % ($p < 0,05$), лише на 3-й тиждень ЕСЦД, супроводжуються зменшенням щільності їх рецепторів на поверхні жирових клітин. В ряді інших досліджень також була показана здатність адипоцитів людини та гризунів експресувати практично весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів [Schäffler A. et al., 2010]. Наші результати демонструють

активне залучення TLR-2. Між тим, існуючі експериментальні роботи стосуються в основному ролі TLR-4, і насамперед в патогенезі ЦД 2 типу [Watanabe Y. et al., 2013].

Також нами було встановлено, що стрептозотоцин-індуковані метаболічні зміни викликають транскрипційну активацію гену протеїнкінази *mTOR* в клітинах ПЖТ: розвиток діабету призводить до зростання вмісту мРНК *mTOR* в 6,8 разів ($p < 0,05$) на 3 тиждень та в 3,6 разів ($p < 0,05$) на 5 тиждень патологічного процесу. Ці зміни не впливають на експресію мРНК регулятора диференціювання Т-регуляторних клітин *Foxp3* на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу та знижують її в 4,6 разів ($p < 0,05$) при 5-ти тижневому ЕСЦД порівняно з контрольною групою щурів. Виявлена нами активація ПРР на мембрані жирових клітин у ПЖТ закономірно підвищує рівень експресії мРНК прозапального цитокіну *IL1 β* – в 77,7 разів ($p < 0,05$) на 3 тиждень та 51,3 рази ($p < 0,05$) на 5 тиждень розвитку ЕСЦД, і Th17-залежного цитокіну *IL17A* – відповідно у 23,5 та 5,5 разів ($p < 0,05$).

Як відомо, рівень прогресії діабету багато в чому лімітується субпопуляцією Treg [Spence A. et al., 2016], складність і гетерогенність якої підтверджується виявленням тканиноспецифічних Tregs, в тому числі так званих VAT Tregs (visceral adipose tissue $CD4^+Foxp3^+$ regulatory T cells) або “Fat Tregs” [Zhou X. et al., 2015]. Виявлена нами залежність диференціювання Treg від рівня експресії *mTOR* показана і в ряді інших робіт [Zeng H. et al., 2013]. При цьому нами з’ясовано, що введення метформіну щурам з ЦД пригнічує експресію мРНК *mTOR* в ПЖТ у 4,5-5,9 разів ($p < 0,05$). Транскрипційна репресія *mTOR* призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Treg-клітинах ПЖТ – на 80 % ($p < 0,05$) на 3 тиждень та в 3,1 рази ($p < 0,05$) на 5 тиждень розвитку ЕСЦД. Отримані результати свідчать, що метформін, пригнічуючи активність *mTOR*, призводить до зростання рівня транскрипційної активності гену *Foxp3* в Treg-клітинах ПЖТ. Аналогічно Shin N. та ін. (2014) продемонстрували, що метформін збільшує кількість і процентну частку VAT Treg клітин у мишей, що знаходились на високо-жировій дієті.

Таким чином, у дисертаційній роботі ми вперше виявили цілий комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСЦД (Рис. 5): зміни імунометаболізму лімфоцитів, порушення формування периферичної імунологічної толерантності, активація ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах ПЛВ і адипоцитах ПЖТ, зміни розподілу ефекторних Т-клітин в ПЛВ, посилення прозапальної сигналізації в ПЖТ на фоні зменшення кількості Treg і рівня мРНК *Foxp3*. Продемонстрували перспективність метформіну для корекції виявлених змін.

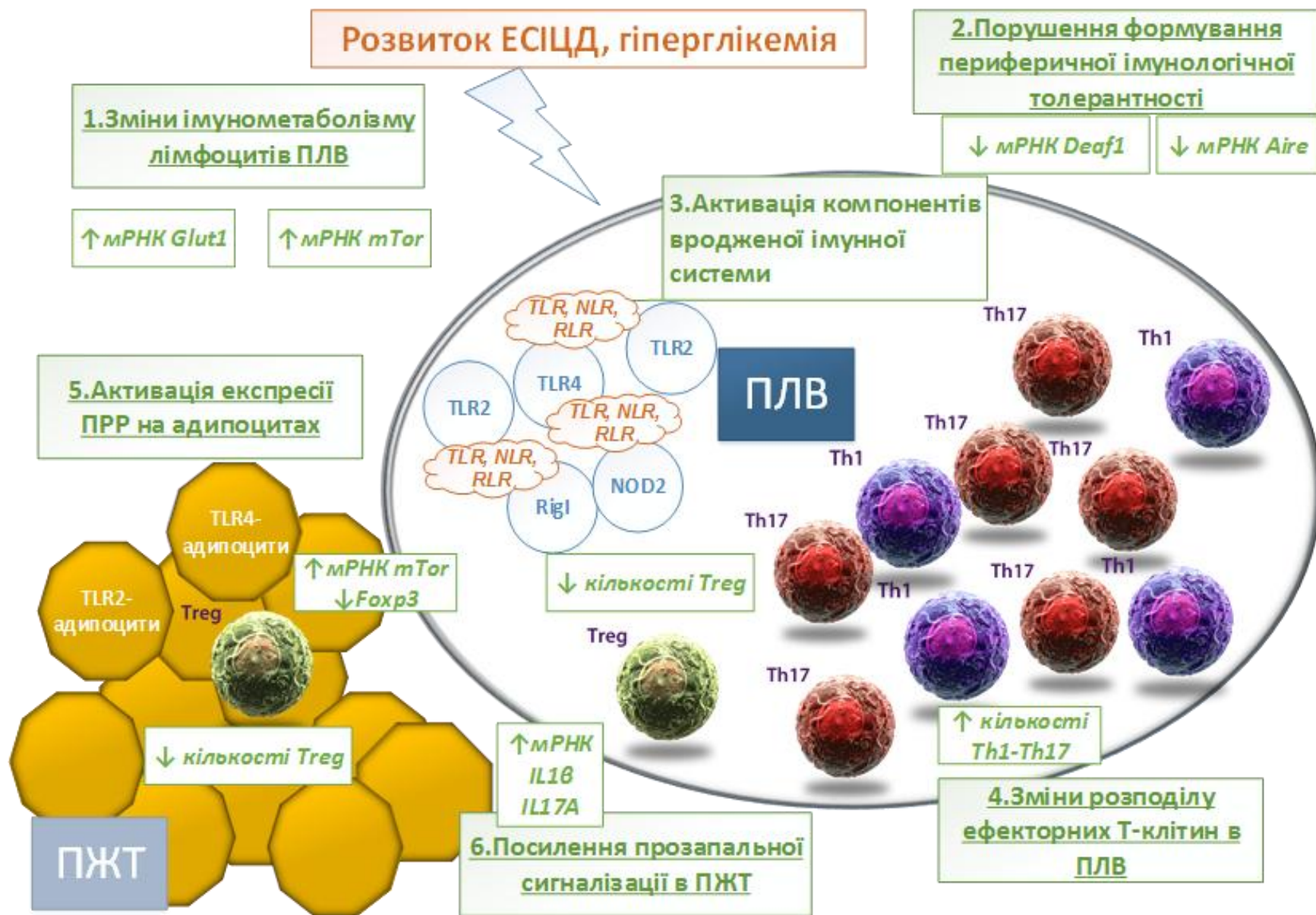


Рис. 5 Ключові зміни функціонального стану клітин ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСІД.

ВИСНОВКИ

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

1. Діабет викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* (в 9,9-28,9 разів) і протеїнкінази *mTOR* (в 5,3-3,3 рази) в клітинах ПЛВ, не впливає на загальну кількість *mTOR*⁺-клітин в ПЛВ на 3-й тиждень розвитку патологічного процесу і призводить до їх зростання на 5-й тиждень ЕСЦД – на 24 % в паракортикальній зоні і на 34 % в м'якотних тяжах переважно за рахунок збільшення щільності популяції *mTOR*⁺-малих і середніх лімфоцитів. Введення метформіну щурам з ЦД призводить до зростання рівня мРНК гену *AMPK1α* на 87 % на 3-й тиждень та майже в 38 разів на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД та пригнічення експресії *mTOR* (в 3-14,7 разів) і *Glut 1* (в 2-5,7 разів) в ПЛВ. При цьому кількість *mTOR*⁺-клітин знижувалась на 40 % лише у м'якотних тяжах ПЛВ у тварин з 5-ти тижневим ЕСЦД.

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

3. В умовах діабету знижується рівень транскрипційної активності генів *Deaf1* в ПЛВ щурів в 4,2 рази на 3-й тиждень і в 2,5 рази на 5-й тиждень, *Aire* – відповідно в 2 і 50 разів. Це супроводжується зменшенням сумарної щільності Treg в ПЛВ на 3-й тиждень на 25-28 %, на 5-й – на 50 % в м'якотних тяжах, призводить до змін розподілу окремих класів Foxp3⁺-лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію Foxp3 в імунопозитивних клітинах м'якотних тяжів. Діабет призводить до збільшення кількості як Tbet⁺- (у паракортикальній зоні ПЛВ на 56 %-87 %, у м'якотних тяжах – в 2,3 рази – на 68 %), так і RORγt⁺-лімфоцитів (у паракортикальній зоні ПЛВ в 2,6 разів – на 46 %, у м'якотних тяжах – на 65 %-69 %) у порівнянні з контролем, різноспрямовано впливає на концентрацію відповідних транскрипційних факторів в імунних клітинах. Введення метформіну вдвічі збільшує кількість Treg на 3-й тиждень діабету, майже не впливає на розподіл Th1⁺-клітин у ПЛВ, за винятком паракортикальної зони у щурів з 5-ти

тижневим ЕСЦД, де їх сумарна щільність знижується на 48 %, зменшує чисельність Th17-клітин у паракортикальній зоні ПЛВ на 3-й тиждень (на 48 %), а у м'якотних тяжках – на 5-й тиждень розвитку ЕСЦД (на 27 %).

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

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

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

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

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

4. Putilin D. A., Kamyshnyi A. M., Kamyshna V. A. Reduced *deaf1* mRNA expression during STZ-induced diabetes mellitus inhibits Foxp3⁺ regulatory T-cells differentiations in rat's pancreatic lymph nodes. *Mediterranean Journal of Biosciences*. 2016. № 1(1). С. 20-26. (Дисертантом самостійно проведено імунофлюоресцентне дослідження, обробка даних та підготовка матеріалу до друку).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

АНОТАЦІЯ

Путілін Д.А. Механізми змін функціонального стану клітин панкреатичних лімфатичних вузлів та парапанкреатичної жирової тканини при експериментальному цукровому діабеті та після введення метформіну. — 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, 2018.

В результаті роботи виявлено комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах ПЛВ і ПЖТ в умовах ЕСІЦД: зміни імунометаболізму лімфоцитів; порушення формування периферичної імунологічної толерантності; активація ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах ПЛВ і адипоцитах ПЖТ; зміни розподілу ефекторних Т-клітин в

ПЛВ; посилення прозапальної сигналізації в ПЖТ на фоні зменшення рівня мРНК Foxp3. Вперше встановлено, що гіперглікемія викликає транскрипційну індукцію генів транспортерів глюкози *Glut 1* та протеїнкінази *mTOR* в імунних клітинах ПЛВ, що є важливим тригером їх диференціювання в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1 і Th17. Експериментально доведено активацію компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЦД і зростання кількості TLR2⁺-, TLR4⁺, NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів у ПЛВ щурів, забезпечуючи нове розуміння молекулярного патогенезу ЦД 1-го типу. Розширені наукові поняття щодо ролі жирової тканини у прогресії діабету, обґрунтована доцільність застосування метформіну для корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД.

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

АННОТАЦІЯ

Путилин Д.А. Механизмы изменений функционального состояния клеток панкреатических лимфатических узлов и парапанкреатической жировой ткани при экспериментальном сахарном диабете и после введения метформина. — На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04. — патологическая физиология. Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2018.

В результате работы выявлено комплекс ключевых патофизиологических и функциональных изменений в клетках ПЛУ и ПЖТ в условиях ЭСИСД: изменения иммунометаболизма лимфоцитов; нарушение формирования периферической иммунологической толерантности; активация ПРР врожденной иммунной системы на лимфоцитах ПЛУ и адипоцитах ПЖТ; изменения распределения эффекторных Т-клеток в ПЛУ; усиление провоспалительной сигнализации в ПЖТ на фоне уменьшения уровня мРНК Foxp3. Впервые установлено, что гиперглікемія вызывает транскрипционную индукцию генов транспортеров глюкозы *Glut 1* и протеинкиназы *mTOR* в иммунных клетках ПЛУ, что является важным триггером их дифференцировки в эффекторные провоспалительные субпопуляции Th1 и Th17. Экспериментально доказано активацию компонентов врожденной иммунной системы при развитии СД и рост количества TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів в ПЛУ крыс, обеспечивая новое понимание молекулярного патогенеза СД 1-го типа. Дополнены научные понятия о роли жировой ткани в прогрессии диабета, обоснована целесообразность применения метформина для коррекции иммунных нарушений, развивающихся при СД.

Ключевые слова: сахарный диабет, лимфоциты, адипоциты, метформин, панкреатические лимфатические узлы, парапанкреатическая жировая ткань, иммунометаболизм.

SUMMARY

Putilin D.A. Mechanisms of the changes in the functional state of the pancreatic lymph nodes' cells and the parapancreatic adipose tissue in the experimental diabetes mellitus and after the metformin's introduction. – The manuscript.

The thesis is submitted for a candidate degree in Medical Sciences in specialty 14.03.04- Pathological physiology. - Zaporizhia State Medical University of the Health Care Ministry of Ukraine, Zaporizhia, 2018.

The thesis is devoted to the clarification of the peculiarities of the changes in the functional state of the lymphocytes of the pancreatic lymph nodes and parapancreatic adipose tissue in the experimental diabetes mellitus and after the metformin's introduction. To achieve the goal, immunofluorescence, immunohistochemical, methods of molecular genetic analysis (RT-PCR), computer analysis of images, statistical methods were used.

As a result of the work, a complex of key pathophysiological and functional changes in PLN and PAT cells was found in the ESIDM conditions: changes in the lymphocyte immune metabolism; violation of the formation of peripheral immunological tolerance; PRR activation of the congenital immune system on the lymphocytes of PLN and PAT adipocytes; changes in the distribution of effector T cells in the PLN; increase of pro-inflammatory signaling in the PAT on the background of the mRNA Foxp3 level's reduction.

It was first discovered that metabolic changes developing in conditions of DM can directly affect the immune metabolism of the PLN lymphocytes. It is proved that hyperglycemia causes transcriptional induction of Glut1 glucose transport genes and protein kinase mTOR in PLN cells, does't affect the total number of mTOR⁺-cells in PLN on the 3rd week of the pathological process's development and leads to their growth on the 5th week of ESIDM. It has been shown that the introduction of metformin to the diabetic rats leads to the increase of mRNA of the gene's level of AMPK1 α in 87 % on the 3rd week and almost in 38 times on the 5th week of the ESIDM development and the suppression of mTOR expression in the PLN (in 3-14.7 times) and Glut 1 (in 2-5,7 times) in PLN. At the same time, the number of mTOR⁺ -cells decreased in 40 % only in the pulpy bands, in the PLN in the animals with a 5-week ESIDM.

For the first time, it has been established that the level of ectopic expression in the PLN cells of the genes- regulators of peripheral immunological tolerance Deaf1 and Aire is reduced in the ESIDM conditions which is accompanied by a decrease of Treg in the PLN. In particular, the Deaf1 expression has decreased in 4.2 times in the rats' PLN with 3-week ESIDM and in 2.5-times in rats with the 5 week the ESIDM in comparison to the control group. Aire expression has decreased in 2-times in PLN in the rats with 3-week ESIDM and in 50-times in the rats with 5-week ESIDM.

It is experimentally proved the activation of the congenital immune system's components in the DM development and the growth of TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺ and RIGI⁺ lymphocytes in the PLN of rats, providing a new understanding of the molecular pathogenesis of DM type 1. Effects on the growth of the number of cells expressing receptors of congenital immunity depended on the duration of the pathological process – an increase of the ESIDM caused a stronger effect in relation to TLR2⁺, TLR4⁺, NOD2⁺ lymphocytes in the paracortic area and RIGI⁺ lymphocytes in the pulpy bands of the PLN of the rats. The obtained results indicate, that the ESIDM leads to the significant activation of the congenital immune system, and this, in turn, can significantly affect the level of the adaptive immune response's activation, the differentiation of the subpopulations of the helper T-cells in the PLN.

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

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

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

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

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЦД	– цукровий діабет
ЕСЦД	– експериментальний стрептозотоцин-індукований цукровий діабет
ПЛВ	– панкреатичні лімфатичні вузли
ПЖТ	– парапанкреатична жирова тканина
ПАМП	– патоген-асоційовані молекулярні образи (патерни)
PPR	– патерн - розпізнаючі рецептори
Th	– Т хелпери
TLR	– Toll – подібні рецептори
NLR	– NOD– подібні рецептори
RLR	– RIG – подібні рецептори
NOD2	– (nucleotide binding oligomerization domain containing 2), рецептор групи NLR
RIGI	– (retinoic acid-inducible gene 1), рецептор групи RLR, фермент хеліказа
mTOR	– мішень рапаміцину, серин/треонінова протеїнкіназа ссавців
AMPK	– 5'АМФ-активуюча протеїнкіназа
GLUT1	– глюкозний транспортер 1 типу
Aire	– аутоімунний регулятор
Deaf1	– (deformed epidermal autoregulatory factor 1), транскрипційний регулятор експресії периферичних антигенів
ПТА	– периферичні тканиноспецифічні антигени
IL1 β	– інтерлейкін 1 β
IL17A	– інтерлейкін 17A
Th1	– Т-хелпери 1 типу
Th17	– Т-хелпери 17 типу
Treg	– 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 γ t	– (ретиноїд-орфан рецептор γ t) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т- клітин у напрямку Th17
PBIC	– рецептори вродженої імунної системи

Підписано до друку 02.07.2018 р. Гарнітура Times New Roman.
Папір друкарський. Формат 60×90/16. Умовн. друк. арк. 1,0.
Обл.-вид. арк. 0,9. Друк — ризограф.
Наклад — 100 прим. Зам. № 7857.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26