

Резюме. Изучено влияние блокирования циклооксигеназы в условиях водно-иммобилизационного стресса на изменение показателей NO-синтазной системы, процессов липопероксидации и состояние микрофлоры в тонкой и толстой кишках. Показано, что водно-иммобилизационный стресс сопровождается резким возрастанием активности iNOS, повышением процессов липопероксидации в слизистой оболочке тонкой и толстой кишки, а также изменением микрофлоры: количество эшерихий увеличивалось, энтерококков уменьшалось в тонкой и возрастало в толстой кишке. Отмечено пролиферацию оппортунистических энтеробактерий в подвздошной кишке. Блокирование циклооксигеназы напроксеном на фоне водно-иммобилизационного стресса сопровождалось снижением активности iNOS в тонкой и толстой кишках сравнительно с показателями стресса, одновременно усиливалась активность cNOS в толстой кишке. При этом наблюдалась активация энтерококков в двенадцатиперстной кишке, резкое уменьшение эшерихий в подвздошной кишке, умеренное снижение содержания последних в проксимальной части толстой кишки, а увеличение - в дистальной ее части. Дисбиоз, активация процессов липопероксидации и изменения показателей NO-синтазной системы в условиях совместного действия стресса и блокирования циклооксигеназы могут создавать предпосылки для развития деструктивных изменений, лежащих в основе энтеропатий.

Ключевые слова: стресс, нестероидные противовоспалительные препараты, оксид азота, микрофлора.

Hural' A.R., Fomenko I.S., Shykula R.G., Panasyuk N.B., Sklyarov A.Ya., Korniyuchuk O.P.
CHARACTERISTIC OF INTESTINAL MICROFLORA AND CHANGES OF NO-SYNTASE SYSTEM UNDER COMBINED ACTION OF ACUTE STRESS AND CYCLOOXYGENASE BLOCKAGE

Summary. In experiments on rats with modeled water-restrained stress it was studied the influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on changes of NO-synthase system parameters, processes of lipoperoxidation and the status of microflora in small and large intestines. It was shown, that the water-restrained stress was accompanied by the considerable increase of iNOS activity and the rise of lipoperoxidation processes intensity. The increase of *Escherichia coli* content and the decrease in *Enterococcus* spp. concentration in the small intestine with their simultaneous rise in the large intestine was notices under these conditions. Proliferation of opportunistic enterobacteriae in iliac was marked. Cyclooxygenase blockage with naproxen prior to water-restrained stress model was accompanied by the decrease of iNOS in small and large intestines with the synchronous rise of cNOS activity in the large intestine as compared with indexes in stress. The moderate increase in *Enterococcus* spp. content in duodenum with the rise of *Escherichia coli* concentration in the ileum was shown. *Escherichia coli* decreased in the proximal part of the large intestine and decreased in its distal part. Disbiosis, intensification of lipoperoxidation processes and changes in NO-synthase system parameters under condition of simultaneous action of stress and cyclooxygenase blockage can create preconditions for the development of destructive changes and enteropathias.

Key words: stress, NSAIDs, nitric oxide, microflora.

Стаття надійшла до редакції 9.12.2013 р.

Гураль Адріана Романівна - старший лаборант кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; +38 067 439-33-21; e-mail: adriana_herman@i.ua

Шикюла Роксолана Григорівна - доцент кафедри мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; +38 097 373-11-29

Корнійчук Олена Петрівна - зав. каф мікробіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; +38 097 225-58-72

Склярів Олександр Якович - д-р мед н, проф., зав. каф біохімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; +38 067 938-37-23; sklyarov@meduniv.lviv.ua

Фоменко Ірина Степанівна - к. біол. н, доцент кафедри біохімії; +38 050 690055056; biochemistry@meta.ua

Панасюк Наталія Богданівна - к. мед. н, асистент кафедри біохімії; +38 093 228-91-03

© Путілін Д.А., Камишний О.М., Коновалова О.О., Камишна В.А.

УДК: 616.37-031.64-018.1:616-097]:616.379-008.64]-092.9

Путілін Д.А., Камишний О.М., Коновалова О.О., Камишна В.А.

Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології (пр.-т Маяковського 26, м. Запоріжжя, Україна, 69035)

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ TLR2 І TLR4 АДИПОЦИТАМИ ПАРАПАНКРЕАТИЧНОЇ КЛІТКОВИНИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

Резюме. Досліджено вплив експериментального цукрового діабету на експресію TLR2 і TLR4 адипоцитами парапанкреатичної клітковини у щурів лінії Вістар. Встановлено, що розвиток ЕЦД збільшував кількість TLR2⁺ - та TLR4⁺ - адипоцитів та переважно підвищував щільність TLR2⁺ - і TLR4⁺ - рецепторів на їх мембрані. Введенням метформіну діабетичним щурам знижали загальну кількість TLR2⁺ - адипоцитів на 16 % (ЕЦД1) - 22 % (ЕЦД2), TLR4⁺ - адипоцитів на 36 % (ЕЦД1), супроводжувалися зменшенням щільності TLR2⁺ - і TLR4⁺ - рецепторів на поверхні жирових клітин.

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет, адипоцит, TLR2, TLR4.

Вступ

Картина патогенезу ЦД як першого, так і другого типу свідчить про активну участь імунних механізмів в

порушенні ендокринної функції панкреатичних острівців [Jin, 2013; Culina, 2013]. В свою чергу, в ос-

танні роки з'являється все більше даних про роль жирової тканини в організмі як одного з регуляторів активності функціонування імунної системи [Schiffler, Schirmerich, 2010]. Жирова тканина є не тільки важливим метаболічним регулятором і ендокринним органом, що синтезує більше 30 білків - "адипокінів", але і органом імунної системи [Kopp et al., 2009; Kaminski, Randall, 2010], дисрегуляція якого призводить до морфологічної перебудови - "ремоделювання" адипоцитів, розвитку запалення жирової тканини, та є невід'ємним компонентом в прогресуванні багатьох захворювань, в тому числі і ЦД [Procaccini et al., 2011; Matarese et al., 2012]. Відомо, що жирова тканина може містити цілі кластери клітин вродженої та адаптивної імунної системи, такі як макрофаги, дендритні клітини, NK- і NKT-лімфоцити, цитотоксичні лімфоцити, T-регуляторні Treg, різноманітні субпопуляції T-хелперів -Th1, Th2, Th17, які інфільтрують адипоцити [Feuerer et al., 2009]. Від балансу цих клітин залежить рівень прозапальної сигналізації в жировій тканині та продукція таких цитокінів як IL1 β , IL6, IL17, IL18, TNF α , IFN γ , здатних безпосередньо впливати на прогресію інсуліту [Caspar-Vauguil et al., 2009]. Проте, включення адаптивної імунної системи залежить від рівня сигналізації через паттерн-розпізнаючі рецептори (PRR - pattern-recognition receptors) спадкової, одними з важливих представників яких є толл-подібні рецептори TLR2 і TLR4 [Jialal et al., 2014]. Лігандами TLR2 є ліпопротеїди, ліпoteйхоєві кислоти, пептидоглікан, ліпоарабіноманнан, зімозан, хітин практично всіх мікроорганізмів, TLR4 - ліпополісахариди (LPS) грам-негативних бактерій. Крім того, діабет супроводжується цілим рядом метаболічних порушень, а природніми лігандами TLR-4, здатними їх активувати, є насичені жирні кислоти [Yin et al., 2014].

Мета цієї роботи полягала в з'ясуванні особливостей експресії TLR2 і TLR4 адипоцитами парапанкреатичної клітковини у щурів лінії Вістар з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД).

Матеріали та методи

Дослідження проведені на 60 самцях щурів лінії Вістар вагою 115-135 грам, отриманих з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП "Біомодель-сервіс" (Київ). Тварини були розділені на 5 експериментальних груп по 12 щурів: контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН = 4,5) (група 1); щури з 3-тижневим експериментальним стрептозотозин-індукованим діабетом (ЕЦД1) (група 2); щури з 3-тижневим експериментальним стрептозотозин-нікотинамід-індукованим діабетом (ЕЦД2) (група 3); щури з 3 тижневим ЕЦД1 (група 4) та ЕЦД2 (група 5), яким в/ш щоденно на протязі 3 тижнів вводили *метформін* в дозі 50 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету. Для індукції ЕЦД1 стрептозотозин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг, розчиненого в 0,5

мл 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) перед самим моментом введення. Індукцію ЕЦД2 здійснювали STZ в дозі 65 мг/кг з попереднім (за 15 хв.) введенням нікотинамїду (внутрішньочеревно - 230 мг/кг) [Masiello et al., 1998; Szkudelski, 2012]. 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 "BIONIMERight testTMGM 110" (Швейцарія) через 12 годин і на 1, 2, 3, 5, 7, 14 і 21 добу після ін'єкції стрептозотозину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 21 добу після введення STZ тварин виводили з експерименту декапітуванням під ефірним наркозом. Вилучали ділянки парапанкреатичної клітковини (ППК), які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена і після промивки заливали в парапласт.

Структуру популяції TLR2⁺ та TLR4⁺ адипоцитів вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних та денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротаційному мікромі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи ППК, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (рН = 7,4) і фарбували з первинними кролячими поліклональними антитілами (ПКАТ) до TLR2 та TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, США) протягом 18 годин у вологій камері при T = 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин (T = 37°C) з 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 розмішували 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, що отримується 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, характерною для адипоцитів, експресуючих TLR. Обчислювалися морфометричні та денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. Щільність TLR на поверхні адипоцитів визначали враховуючи інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічну флюоресценцію препарату (так званий "фон"). На підставі цих показників обчислювалася коректована клітинна флюоресценція (в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції УОІФ): Integrated Density (інтегрована щільність)

- (площа виділених клітин * середню флуоресценцію фона).

Результати. Обговорення

Розвиток експериментального стрептозотозин-індукованого діабету (ЕЦД1) супроводжувався збільшенням загальної кількості TLR2⁺ адипоцитів в 2,5 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з контролем, в той час як цей же показник при експериментальному стрептозотозин-нікотинамід-індукованому діабеті (ЕЦД2) зростав на 83 % ($p < 0,05$) (рис. 1 А). Індукція ЕЦД1 призводила до зростання щільності TLR2⁺ рецепторів на поверхні адипоцитів всіх класів на 9 - 23 % ($p < 0,05$) відносно контролю, а при ЕЦД2 цей показник зростав у великих адипоцитів в 9,4 рази ($p < 0,05$) і зменшувався у середніх та малих адипоцитів на 8 % ($p < 0,05$) та на 13 % ($p < 0,05$), відповідно.

Вивчення розподілу TLR4⁺ адипоцитів показало, що в умовах індукції ЕЦД1 спостерігається збільшення їх сумарної щільності на 95 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем, тоді як в умовах ЕЦД2 достовірних змін не виявлено. Розвиток ЕЦД1 призводив до зниження щільності TLR4⁺ рецепторів на поверхні великих адипоцитів на 12 % ($p < 0,05$) відносно контролю. В той час як цей же показник серед великих адипоцитів при ЕЦД2, навпаки, зріс на 33 % ($p < 0,05$).

Після введення метформіну сумарна щільність TLR2⁺ адипоцитів знизилася на 16 % (ЕЦД1) ($p < 0,05$) та на 22 % (ЕЦД2) ($p < 0,05$) у порівнянні з діабетичними щурами, тоді як загальна кількість TLR4⁺ адипоцитів зменшувалася на 36 % ($p < 0,05$) тільки у випадку ЕЦД1 (рис. 1 В). Введення в умовах ЕЦД1 метформіну знайшло відображення у зниженні щільності TLR2⁺ рецепторів на 21 % ($p < 0,05$) у середніх адипоцитів та на 12 % ($p < 0,05$) у малих, в порівнянні з діабетичними тваринами. Схожі зміни спостерігалися і у випадку ЕЦД2 - введення метформіну викликало зниження щільності TLR2⁺

рецепторів на поверхні великих адипоцитів на 92 % ($p < 0,05$) та на поверхні середніх - на 7 % ($p < 0,05$). Щільність TLR4⁺ рецепторів в умовах введення метформіну односпрямовано знижувалась як при ЕЦД1 (на поверхні великих адипоцитів на 10 % ($p < 0,05$), середніх - на 14 % ($p < 0,05$), малих - на 13 % ($p < 0,05$)), так і при ЕЦД2 (на 14 % ($p < 0,05$) у великих адипоцитів в порівнянні з діабетичними тваринами).

В ряді інших досліджень також була показана здатність адипоцитів людини та гризунів експресувати практично весь спектр відомих Toll-подібних рецепторів, від TLR-1 до TLR-9 [Kopp et al., 2009; Schiffer, Schiffer, 2010]. Із них найбільш детально досліджені TLR-2 і TLR-4, представлені в жировій тканині в суттєво більших кількостях в порівнянні з іншими TLRs [Watanabe et al., 2013]. Характерно, що наші результати показують активне залучення рецепторів вродженої імунної системи у розвиток не тільки ЦД 2 типу, а і ЕЦД1, а також участь в цьому процесі TLR-2. Між тим, існуючі експериментальні роботи стосуються в основному ролі TLR-4 в патогенезі ЦД2. Так, отримано цілий ряд доказів того, що TLR4 є привабливим кандидатом для зв'язку вроджених імунних реакцій та резистентності до інсуліну: по перше, експресія TLR4 підвищується в адипоцитах при ожирінні [Shi et al., 2006], по друге, TLR4 - нокаутні миші захищені від визваної ожирінням інсулінорезистентності [Tsukumo et al., 2007], по третє, делеція TLR4 в гематопоетичних клітинах покращує індуковану високожировою дієтою резистентність жирової тканини до інсуліну [Saberj et al., 2009]; по четверте, насичені жирні кислоти активують NF- κ B в макрофагах жирової тканини TLR4-залежним шляхом [Watanabe et al., 2013]. У діабетичних мишей рівень TLR-4 підвищений, а стимуляція ЛПС веде до надмірної активації секреції запальних цитокінів і зниження утворення проти-запального цитокіна ІЛ-10 [Watanabe et al., 2013]. У хво-

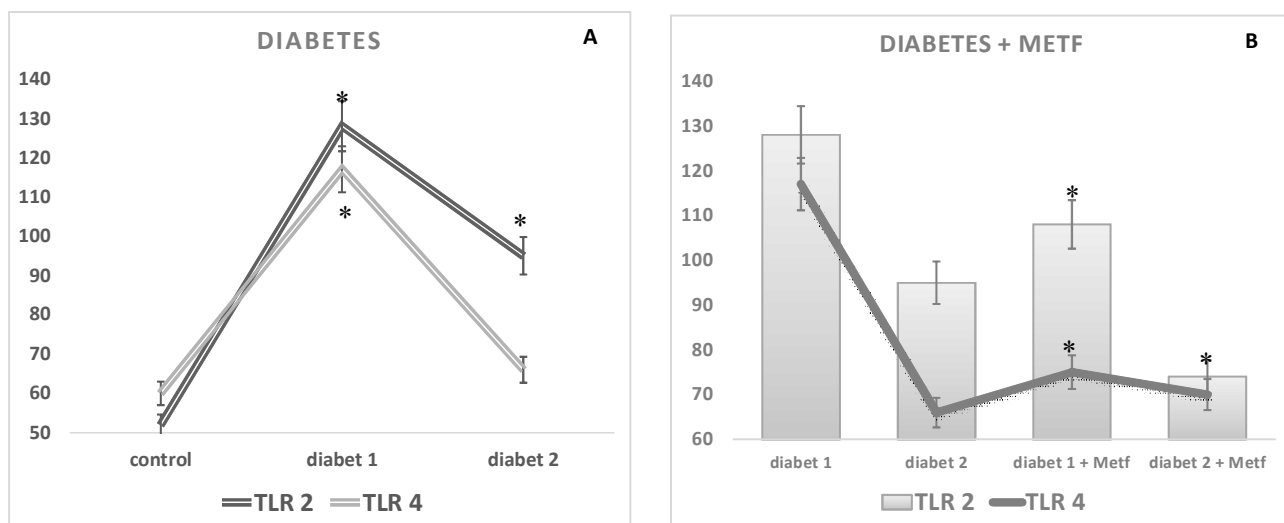


Рис. 1. Сумарна щільність (на 10 мм²) TLR2⁺- і TLR4⁺- адипоцитів у ППК при розвитку діабету (А) і введенні метформіну (Metf) діабетичним тваринам, * - $p < 0,05$.

рих на ЦД 2 типу на 76 % підвищений рівень циркулюючих ЛПС, жирова тканина достовірно більше експресує TLR-2, MyD88, NF-κB, а ЛПС в ізольованих адипоцитах, отриманих із підшкірно-жирової клітковини людей з ЦД 2 типу, в більшій мірі стимулювала експресію TLR-2, TRAF6, NF-κB в порівнянні з адипоцитами здорових людей [Shvarts, 2010]. Одноразове введення інсуліну хворим ЦД-2 знижувало експресію мРНК TLR-1, -2, -4, -7 і -9 [Shvarts, 2010] в мононуклеарних клітинах крові.

Koenen T. et al. (2011) показали, що вісцеральна жирова тканина (ВЖТ) володіє більш вираженим прозапальним потенціалом в порівнянні з підшкірною (ПЖТ) [Koenen et al., 2011]. Зокрема, процент CD8⁺-Т-лімфоцитів в ВЖТ був значно вище, ніж в ПЖТ (41,6 проти 30,4 %, p<0,05). Адипоцити ВЖТ характеризувалися більш високою продукцією IL-1β (у 10 раз, p<0,05), IL-18 (у 3 рази, p<0,05), IL-6 і IL-8 (у 3 і 4 рази відповідно, p<0,05) у порівнянні з ПЖТ [Koenen et al., 2011]. І на решті, активність каспази-1 в адипоцитах ВЖТ була у 3 рази вище, що створює умови для активації інфламмасоми та пояснює більш високу "схильність" ВЖТ до розвитку запалення [Koenen et al., 2011]. В свою чергу, контроль рівня глікемії у хворих на ЦД 1 типу призводить до зміни співвідношення ВЖТ до ПЖТ [Jacob et al., 2006]. Так, якщо без лікування це співвідношення складало 0,29±0,15 (p<0,05), то нормалізація рівня глюкози призводила до зміни даного індексу до 0,36±0,18 (p<0,05) [Jacob et al., 2006].

Важливим стратегічним завданням є пошук ефективних шляхів корекції імунних порушень, що розвиваються при ЦД та підтримують його прогресію. В зв'язку з цим ми зупинили свій вибір на *метформіні*, що здатний знижувати концентрацію глюкози в крові через АМФ-активуюему протеїназу (АМФК) [Russo et al., 2013]. Проте, значно більший інтерес представляє нещодавно відкрита здатність *метформіну* через АМФК впливати на активність ключового регулятора клітинного метаболізму, росту, проліферації та виживання клітин mTOR (mammalian target of rapamycin) [Hardie, 2013]. mTOR-протеїназа серин - треонінової специфічності, яка в клітині існує як субодинаця внутрішньоклітинних мультимолекулярних сигнальних комплексів mTORC1 і mTORC2. mTOR- сигналізація є однією із основних детермінант Т-клітинного диференціювання [Xu et al., 2013; Yang, Chi, 2012]. При високій активності mTOR відбувається

диференціювання наївних CD4⁺-клітин в ефекторні прозапальні субпопуляції Th1, Th2, Th17, а також активація цитотоксичних CD8⁺-клітин [Waickman, Powell, 2012]. І навпаки, якщо активність mTOR в CD4⁺ клітинах низька, то вони диференціюються в Treg клітини, які блокують розвиток інсуліну і прогресію діабету [Chi, 2012; Powell et al., 2012]. Метформін, як і рапаміцин, але більш м'яко, без розвитку імуносупресії, пригнічує активність mTOR, і зменшує інтенсивність запалення в жировій тканині [Hardie, 2013]. Отримані нами дані свідчать про здатність метформіну зменшувати щільність TLR2⁺ і TLR4⁺ рецепторів на поверхні жирових клітин. Одержані результати побічно підтверджуються і для інших типів клітин. Так, Soraya H. et al. (2012) показали здатність метформіну пригнічувати експресію TLR4 та його адаптерного білка MyD88 в кардіоміоцитах, знижувати продукцію TLR-залежних прозапальних цитокинів TNFα і IL-6 [Soraya et al., 2012]. Була встановлена здатність метформіну пригнічувати активність NF-κB і продукцію IL-1β, IL-6 і IL-8 ендотеліальними клітинами людини [Soda et al., 2006]. Andrews M. et al. (2012) продемонстрували здатність метформіну знижувати рівні мРНК TNF-α і TLR 2/4 в моноцитах периферичної крові у хворих з ЦД2 типу [Andrews et al., 2012].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Розвиток ЕЦД1 збільшував кількість TLR2⁺ та TLR4⁺ адипоцитів в 2,5 рази і на 95 % відповідно, підвищував щільність TLR2⁺-рецепторів на поверхні адипоцитів всіх класів на 9 - 23 %, різноспрямовано впливав на щільність TLR4⁺ рецепторів.

2. Індукція ЕЦД2 призводила до зростання кількості TLR2⁺-адипоцитів на 83 %, не впливала на чисельність TLR4⁺-жирових клітин, збільшувала щільність TLR2⁺ і TLR4⁺ рецепторів на мембрані у великих адипоцитах.

3. Введенням метформіну діабетичним щурам знижали загальну кількість TLR2⁺ адипоцитів на 16 % (ЕЦД1)-22% (ЕЦД2), TLR4⁺ адипоцитів на 36 % (ЕЦД1), супроводжувалися зменшенням щільності TLR2⁺ і TLR4⁺ рецепторів на поверхні жирових клітин.

Значний практичний інтерес представляють подальші вивчення експресії рецепторів вродженого імунітету, зокрема NOD-2 та RIG-I адипоцитами в умовах розвитку ЕЦД.

Список літератури

- Andrews M. Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor-α, Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients / M. Andrews, N. Soto, M. Arredondo / Rev. Med. Chil. - 2012. - Vol. 140. - P. 1377-1382.
- Caspar-Bauguil S. Adipose tissue lymphocytes: types and roles / S. Caspar-Bauguil, B. Cousin, S. Bour // J. Physiol. Biochem. - 2009. - Vol. 65. - P. 423-436.
- Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions / H. Chi // J. Nat Rev Immunol. - 2012. Apr. - Vol. 325. - P. 38.
- Culina S. Insulin and type 1 diabetes: immune connections / S. Culina, V. Brezar, R. Mallone // Eur. J. Endocrinol. - 2013. - Vol. 17. - P. 19-31.
- Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide / P. Masiello, C. Broca, R. Gross et al. // J. Diabetes. - 1998. Feb. - Vol. 224. - P. 9.
- Feuerer M. Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems / M. Feuerer, L. Herrero, D. Cipolletta // J. Nat Med. - 2009. August. 15. - P. 930-939.
- Hardie D. AMPK : a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer / D. Hardie // J.

- Diabetes. - 2013. Jul. 62. - Vol. 2164. - P. 72.
- Jacob A. The visceral and subcutaneous fat changes in type 1 diabetes: a pilot study / A. Jacob, B. Adams-Huet, P. Raskin // J. Diabetes. Obes. Metab. - 2006. Sep. 8. - Vol. 524. - P. 30.
- Jialal I. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective / I. Jialal, H. Kaur, S. Devaraj // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2014. Jan. - Vol. 99. - P. 39-48.
- Jin C. Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression / C. Jin, J. Henao-Mejia, R. Flavell // J. Cell Metab. - 2013. Jun. - Vol. 873. - P. 82.
- Kaminski D. Adaptive immunity and adipose tissue biology / D. Kaminski, T. Randall // J. Trends Immunol. - 2010. Oct. 31. - P. 384-390.
- Koenen T. The inflammasome and caspase-1 activation: a new mechanism underlying increased inflammatory activity in human visceral adipose tissue / T. Koenen, R. Stienstra, L. van Tits // J. Endocrinology. - 2011. Oct. - Vol. 3769. - P. 78.
- Kopp A. Innate immunity and adipocyte function: ligand-specific activation of multiple Toll-like receptors modulates cytokine, adipokine, and chemokine secretion in adipocytes / A. Kopp, C. Buechler, M. Neumeier // J. Obesity. - 2009. Apr. 17. - Vol. 648. - P. 56.
- Matarese G. At the crossroad of T cells, adipose tissue, and diabetes / G. Matarese, C. Procaccini, V. De Rosa // J. Immunol. Rev. - 2012. Sep. - Vol. 116. - P. 34.
- Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor- κ B in human vascular wall cells / K. Isoda, J.L. Young, A. Zirlik et al. // J. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 2006. Mar. 26. - Vol. 611. - P. 7.
- mTOR, linking metabolism and immunity / X. Xu, L. Ye, K. Araki et al. // J. Semin Immunol. - 2012. Dec. - Vol. 429. - P. 35.
- Powell J.D. Regulation of immune responses by mTOR / J.D. Powell, K.N. Pollizzi, E.B. Heikamp et al. // Annu. Rev. Immunol. - 2012. - P. 30, 39-68.
- Procaccini C. Obesity and susceptibility to autoimmune diseases / C. Procaccini, F. Carbone, M. Galgani // J. Expert Rev. Clin. Immunol. - 2011. May. - Vol. 287. - P. 94.
- Russo G.L. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer / G.L. Russo, M. Russo, P. Ungaro // J. Biochem. Pharmacol. - 2013. Aug. - Vol. 339. - P. 50.
- Saberi M. Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice / M. Saberi, N. Woods, C. de Luca // J. Cell Metab. - 2009. Nov. - Vol. 419. - P. 29.
- Sch?ffler A. Innate immunity and adipose tissue biology / A. Sch?ffler, J. Sch?lmerich // J. Trends Immunol. - 2010. Jun. - Vol. 228. - P. 35.
- Short-term treatment with metformin suppresses toll like receptors (TLRs) activity in isoproterenol-induced myocardial infarction in rat: are AMPK and TLRs connected? / H. Soraya, S. Farajnia, S. Khani et al. // J. Int Immunopharmacol. - 2012. Dec. - Vol. 785. - P. 91.
- Shvarts V. Physiological and pathological role of adipose tissue innate immune system receptors / V. Shvarts // J. Patol. Fiziol. Eksp. Ter. - 2010. Jul-Sep. - P. 45-51.
- Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model / T. Szkudelski // J. Exp. Biol. Med. (Maywood). - 2012. May. - Vol. 481. - P. 90.
- TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance / H. Shi, M.V. Kokoeva, K. Inouye et al. // J. Clin. Invest. - 2006. Nov. - Vol. 3015. - P. 25.
- Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and β -cell dysfunction / J. Yin, Y. Peng, J. Wu et al. // J. Leukoc. Biol. - 2014. Jan. - P. 47-52.
- Tsukumo D. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance / D. Tsukumo, M. Carvalho-Filho, J. Carnevali // J. Diabetes. - 2007. Aug. - Vol. 1986. - P. 98.
- Waickman A.T. mTOR metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function / A.T. Waickman, J.D. Powell // J. Immunol. Rev. - 2012. Sep. - P. 43-58.
- Watanabe Y. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance / Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu // J. Nutrients. - 2013. Sep. - Vol. 3757. - P. 78.
- Yang K. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation / K. Yang, H. Chi // J. Semin Immunol. - 2012. Dec. - Vol. 421. - P. 8.

Путилин Д.А., Kamiшный А.М., Коновалова О.О., Kamiшная В.А.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TLR2 И АДИПОЦИТАМИ ПАРАПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ КЛЕТЧАТКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Резюме. Исследовано влияние экспериментального сахарного диабета на экспрессию TLR2 и TLR4 адипоцитами парапанкреатической клетчатки у крыс линии Вистар. Установлено, что развитие ЕСД увеличивало количество TLR2⁺- и TLR4⁺- адипоцитов и преимущественно повышало плотность TLR2⁺- и TLR4⁺- рецепторов на их мембране. Введением метформина диабетическим крысам снижали общее количество TLR2⁺- адипоцитов на 16 % (ЕСД1) - 22 % (ЕСД2), TLR4⁺- адипоцитов на 36 % (ЕСД1), сопровождалось уменьшением плотности TLR2⁺- и TLR4⁺- рецепторов на поверхности жировых клеток.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, адипоцит, TLR2, TLR4.

Putilin D.A., Kamiyshny A.M., Konovalova O.O., Kamiyshnaya V.A.

THE PECULIARITIES OF THE EXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 ADIPOCYTES OF PARAPANCREATIC CONNECTIVE TISSUE OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Summary. It is researched the influence of experimental diabetes mellitus on the expression of TLR2 and TLR4 by adipocytes of parapancreatic fibrous in the rats of Wistar line. It is detected that the development of EDM increased the number of TLR2⁺- and TLR4⁺- adipocytes and increased the density TLR2⁺- and TLR4⁺- receptors on their membran. The introduction of metformin to the diabetic rats reduced the general number of TLR2⁺- adipocytes in 16 % (EDM1) - 22 % (EDM2), TLR4⁺- adipocytes in 36 % (EDM1) accompanied by the decrease of the density TLR2⁺- and TLR4⁺- receptors of the surface of adipose cells.

Key words: experimental diabetes mellitus, adipocytes, TLR2, TLR4.

Стаття надійшла до редакції 9.12.2013 р.

Путилін Денис Анатолійович - асистент кафедри нормальної фізіології ЗДМУ; +38 067 732-23-12; des.doctor@mail.ru

Камишний Олександр Михайлович - д.мед.н., доцент, зав. каф. мікробіології, вірусології і імунології ЗДМУ; +38 0612 34-26-31; alexkamushnyu@yandex.ru

Коновалова Ольга Олександрівна - магістр по лабораторній діагностиці, ст. лаб. каф. мікробіології, вірусології і імунології ЗДМУ; +38 0612 34-26-31

Камишна Вікторія Анатоліївна - к.мед.н., ст. викладач каф. анатомії людини з курсом оперативної хірургії і топографічної анатомії ЗДМУ; +38 0612 34-25-31

© Бабійчук Ю.В.

УДК: 616.002.51

Бабійчук Ю.В.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, кафедра хірургії медичного факультету №2 (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИЙ РОЗВИТОК ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ В СИСТЕМІ КРОВІ

Резюме. *Туберкульоз на сьогодні є актуальною медико-соціальною проблемою не тільки в Україні, а й в усьому світі. Новий метод діагностики базується на застосуванні мікроскопії мазка крові та виявлення в системі крові стадій розвитку збудника туберкульозу, а в разі необхідності проводяться бактеріологічні дослідження крові з використанням середовища ВЛАКОН, на якому ріст колоній можна отримати за 2 - 3 доби. Метою наших досліджень було удосконалення експрес-методу виявлення збудника туберкульозу в системі крові з використанням цифрової мікроскопії. Дослідження проведено на 50 кролях породи Шиншила. Вдослідну групу відібрано 40 кролів, в яких викликана експериментальна модель туберкульозу. В контрольну відібрано 10 кролів, яким нічого не вводилось. Проводилась цифрова світлова мікроскопія зразків крові. При мікроскопії мазка в різні періоди зараження у полі зору мікроскопу з'являлись різні агенти стадій розвитку мікобактерії у вигляді артроспор, молекулів, коків, паличок, зеброподібних стебел. Молекул збудника туберкульозу в еритроциті починає розвиватися, утворюючи кокоподібні форми всередині еритроцита, а сам еритроцит збільшується, набираючи округлої форми. Проникнення в еритроцит молекула може призвести до утворення гігантських еритроцитів в середині яких розвивається коковидна форма збудника туберкульозу.*

Ключові слова: *поліморфізм, експериментальний туберкульоз, цифрова мікроскопія, еритроцит.*

Вступ

Туберкульоз на сьогодні є актуальною медико-соціальною проблемою не тільки в Україні, а й в усьому світі. Щорічно у світі виявляється від 7 до 10 млн. хворих на туберкульоз осіб, помирає 2,5 - 3 млн. Загальна кількість хворих становить 50 - 60 млн. Туберкульоз займає перше місце в структурі смертності від інфекційних та паразитарних хвороб [Толстанов, 2001; Колос та ін., 2006]. Під впливом антибактеріальної терапії, яка проводиться у хворих на туберкульоз, мікобактерія туберкульозу (МБТ) із типових форм трансформуються в інші, в тому числі в ті, які фільтруються. Ці морфологічні форми з новими біологічними властивостями зберігають вірулентність, вони спроможні затримати одужання хворого або ж спричинити рецидив захворювання. Дослідники дотримуються думки про те, що існуючі методи мікроскопічної діагностики малоефективні внаслідок олигобацилярності патологічного матеріалу, а наявність у хворих клінічних ознак туберкульозу при негативних бактеріоскопії та посіві вимагає допоміжних методів дослідження для виявлення змінених форм збудника [Мельник та ін., 2006]. Новий метод діагностики базується на застосуванні мікроскопії мазка крові та виявлення в системі крові стадій розвитку збудника туберкульозу, а в разі необхідності проводяться бактеріологічні дослідження крові з використанням середовища ВЛАКОН, на якому ріст колоній можна отримати за 2 - 3 доби [Власенко, Багрич, 2001].

Метою наших досліджень було удосконалення експ-

рес-методу виявлення збудника туберкульозу в системі крові з використанням цифрової мікроскопії.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 50 кролях породи Шиншила, відібраних у трьох місячному віці і розподілених на дві групи (контрольну і дослідну). В дослідну групу відібрано 40 кролів, в яких викликана експериментальна модель туберкульозу з внутрішньоперитоніальним введенням в масляному розчині біокультур *Mycobacterium bovis* в дозі 0,1 мг/мл, при якій зберігається можливість для персистенції мікобактерій. В контрольну відібрано 10 кролів, яким нічого не вводилось. Досліди проведені згідно наказу від 01.03.2012 р Міністерства освіти і науки, молоді і спорту України №249 "Про затвердження порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах". Контрольних і дослідних тварин утримували в клітках, догляд і годівля були аналогічними, за тваринами постійно проводився моніторинг. З вушної вени кролів обох груп набиралась кров через 10 днів від початку зараження, 120 днів від початку експерименту. Проводилась цифрова світлова мікроскопія нативних нефарбованих зразків крові (роздавлена крапля) з використанням системи світлових фільтрів для кращої візуалізації та зразки крові фіксувались, окрашувались по Романовському-Гімзе. Мікроскопія проводилась на біологічному мікроскопі Konus Biorex-3 з цифровою фотокамерою DCM 500 з розрешенням 5 Мп., зб. x1000.