

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ПРОЗОРОВА ТЕТЯНА МИХАЙЛІВНА**



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

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

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Запоріжжя – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор медичних наук, професор **Камишний Олександр Михайлович**, Тернопільський національний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України, професор 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;

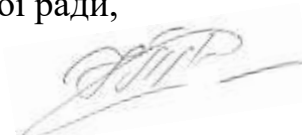
доктор медичних наук, професор **Костенко Віталій Олександрович**, Українська медична стоматологічна академія МОЗ України, завідувач кафедри патофізіології.

Захист відбудеться « 27 » квітня 2021 р. о 10<sup>00</sup> 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 « 26 » березня 2021 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради,  
доцент



Т.В. Іваненко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Гестаційний цукровий діабет (ГД) – це порушення толерантності до глюкози різного ступеня тяжкості, що виявляється у 2–6 % всіх вагітностей [Eades C.E. et al., 2017]. Різні звіти вказують на те, що материнський імунітет змінюється під час вагітності [Nyangahu D.D. et al., 2018]. Менше відомо про те, як внутрішньоутробна гіперглікемія змінює імунне мікросередовище нащадків. ГД є одним з чинників ризику розвитку надалі у потомства імунних та метаболічних порушень, зокрема цукрового діабету (ЦД) 1 і 2 типів. Вагітність у нормі викликає зміни імунного статусу у напрямку імуносупресії, що нівелюється в умовах ГД. Так, у жінок з ГД відбувається збільшення маркерів активації Т-лімфоцитів, самих Т-клітин та дефіцит CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Тобто, інтранатальна гіперглікемія, що розвивається при ГД, може впливати на морфогенез органів імунної системи нащадків [Ziegler S.M. et al., 2018].

Формування імунологічної толерантності до власних антигенів (Аг) в ембріогенезі є важливим механізмом, що попереджує розвиток аутоімунних захворювань (АІЗ) в постнатальному періоді. В останні роки була знайдена екстратимічна експресія цілого ряду периферичних тканиноспецифічних антигенів (peripheral tissue-specific antigens, PTSAs), у тому числі таких панкреатичних Аг як інсулін та проінсулін, регулятором ектопічної транскрипції яких є аутоімунний регулятор (Aire) [Metzger T. et al., 2011]. Численні екстратимічні Aire-експресуючі клітини (extrathymic Aire-expressing cells, eTACs) знаходяться в лімфатичних вузлах (ЛВ) та представляють собою один з критичних факторів формування периферичної імунної толерантності (ПІТ) [Carpino G. et al., 2016]. Клітини стромы ЛВ експресують PTSAs [Cohen J. et al., 2014], однак регулюється їх експресія не лише eTACs, а й транскрипційним регулятором Deaf1 (deformed autoregulatory factor 1) [Yip L. et al., 2015]. В свою чергу, Aire та Deaf1 є регуляторами диференціювання ще одного учасника негативного контролю розвитку АІЗ - індубельних Т-регуляторних клітин (iTreg), експресуючих транскрипційний фактор Foxp3 [Shevach E. et al., 2014]. Дія iTreg реалізується через продукцію супресорних цитокінів - IL10, IL13, IL35, TGFβ та залежить від експресії негативних костимуляторних молекул, таких як CTLA-4 [Wang S. et al., 2016]. Так, стромальні Deaf1-експресуючі клітини брижових лімфатичних вузлів (БЛВ) виробляють ретиноеву кислоту, яка сприяє розвитку Foxp3<sup>+</sup>-регуляторних Т-клітин [Hammerschmidt S., 2008 ], а Yang S. та ін. показали здатність Aire генерувати в перинатальний період особливу популяцію Foxp3<sup>+</sup>Treg-клітин, яка стійко зберігається у дорослих мишей також [Yang S. et al., 2015]. Місце експонування Аг має вирішальне значення для підтипу регуляторних Т-клітин і механізму індукції толерантності [Geem D. et al., 2016].

БЛВ – це основне місце для індукції оральної толерантності (ОТ) до різноманітних Аг серед інших лімфоїдних тканин [Stagg A.J. 2018; Sricharunrat T. et al., 2018]. Презентація харчових Аг відбувається саме в БЛВ, а

не в пейєрових бляшках (ПБ), а ОТ не може бути індукована у мишей, позбавлених БЛВ, але це не впливає на тварин, в яких було видалено ПБ [Kunkel D., 2003]. Крім того, БЛВ є головним “перехідним” пунктом для пула рециркулюючих лімфоцитів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини. Головними регуляторами “хоумінга” лімфоцитів в БЛВ є адресин MAdCAM-1, хемокінові рецептори CXCR4 і CCR7 [Macpherson A.J. et al., 2006]. В свою чергу, вихід лімфоцитів з БЛВ регулюється сфінгозин-1-фосфат (S1P) рецепторами (S1PR1-S1PR5) [Spiegel S. et al., 2011], серед яких лімфоцитами найбільш активно експресується 1 тип – S1PR1 [Rivera J. et al., 2008].

У тваринних моделях, оральне або інтраназальне введення антигену може індукувати ПТТ, а головним місцем для індукції ПТТ є БЛВ, в яких відбувається інтенсивна активація наївних Т-лімфоцитів та їх диференціювання в субпопуляцію ефекторних клітин [Sricharunrat T. et al., 2018].

На сучасному етапі використання слизових оболонок є привабливим шляхом для введення Аг як толерогенів, зокрема основного  $\beta$ -клітинного Аг – інсуліну, особливо у ранньому віці [Weigmann V. et al., 2012]. Крім того, важливою ланкою патогенезу ГД є активація одного з NOD-подібних рецепторів вродженого імунітету (РВІ) - NLRP3-інфламасоми [Larras M., 2014]. Серед інгібіторів інфламасоми перспективним є глібенкламід, який до того ж може ефективно коригувати гіперглікемію у вагітних [Netea M.G. et al., 2015].

Отже, і сьогодні залишається багато питань щодо з'ясування патогенетичних механізмів функціонального стану лімфоцитів БЛВ у нащадків, що під час ембріогенезу зазнали впливу хронічної гіперглікемії, не достатньо визначено характер змін їх стану після індукції оральної толерантності до інсуліну та введення глібенкламиду вагітним. Відповіді на ці підняті питання можуть бути отримані після комплексного визначення рівнів транскрипційної активності генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il10* та генів-регуляторів рециркуляції і «хоумінгу» лімфоцитів, вивчення характеру експресії мРНК NLRP3-інфламасоми і розподілу NLRP3<sup>+</sup>-клітин, встановлення розподілу рецепторів вродженого імунітету та клітинного складу субпопуляцій Т-хелперів T-bet<sup>+</sup> (Th1), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (Th17) і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів (Treg) в БЛВ нащадків самиць із гетаційним діабетом.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом планових науково-дослідних робіт кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології» (державний реєстраційний номер 0112U005642, терміни виконання 2012-2017рр.) та «Молекулярно-генетичний аналіз змін транскриптому генів імунної відповіді і кишкового мікробіому в умовах експериментальної патології та розробка методів їх корекції» (державний реєстраційний номер 0118U007141, терміни виконання 2018-2022рр.). Дисертант є їх співвиконавцем.

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

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

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

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

3. Вивчити розподіл рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, NOD2 і RIGI серед лімфоцитів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, самиць з ЕГД після введення глібенкламиду та за умов індукції у нащадків оральної толерантності до інсуліну.

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

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

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

**Методи дослідження:** патофізіологічні (моделювання експериментального гестаційного діабету), біохімічні (визначення рівня глюкози), морфометричні (визначення площі і периметру клітин), імунофлюоресцентні (реакція прямої або непрямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних або поліклональних антитіл для ідентифікації TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, RIGI<sup>+</sup>-, T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>-клітин), метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (оцінка відносного рівня мРНК генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз (розрахунок абсолютної і відносної щільності розподілу різних імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах БЛВ, щільності рецепторів на ідентифікованих імунопозитивних клітинах), методи статистичного аналізу отриманих результатів.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В результаті роботи за допомогою сучасних молекулярно-генетичних і імуофлюоресцентних методів виявлено комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД.

Дослідження показало зміни експресії регуляторів рециркуляції і «хоумінгу» лімфоцитів, дало можливість виявити порушення формування периферичної імунологічної толерантності та активацію патерн-розпізнавальних рецепторів (ППР) вродженої імунної системи на лімфоцитах БЛВ.

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

Виявлено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігаються порушення імуно толерантності, які формуються через репресію гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*, та зниження кількості Т-регуляторних клітин. Підтверджено позитивний ефект перорального введення інсуліну в перші 2 тижні життя нащадків, що нівелює ці зміни та викликає транскрипційну активацію генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* і *Il-10*.

Встановлено, що через пренатальну гіперглікемію у нащадків відбувається значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *Slpr1*, тоді як індукція оральної толерантності до інсуліну його багаторазовим введенням із першої доби життя, супроводжується вже на 1-у місяці від народження зниженням мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *Slpr1* в клітинах БЛВ, тобто її формуванням de novo.

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

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

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

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

Дисертант, спільно зі співавторами, брала участь у розробці й апробації нового способу виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин (пат. на корисну модель Україна, МПК09В 23/28, №17281; пат. на корисну модель Україна, МПК G01N 21/00, №72775).

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

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

Робота виконана у відділі молекулярно-генетичних досліджень навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ, який акредитований на право проведення вимірювань, що знаходяться в сфері державного метрологічного нагляду (Свідоцтво про технічну компетентність № 033/18 від 26 грудня 2018р.).

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

Результати досліджень, отримані в процесі виконання дисертаційної роботи, оприлюднені на конференції Всеукраїнській конференції молодих

вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини та фармації» (Запоріжжя, 2016); 18<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (Munich, 2016); Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI) (Hamburg, 2016); 19<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (Lisbon, 2017).

**Публікації.** Результати дисертаційного дослідження висвітлено у 13 наукових працях, серед яких 4 статті у фахових виданнях України, 2 статті у закордонних періодичних виданнях, 2 статті, які індексуються міжнародними наукометричними базами, 4 публікацій у матеріалах і тезах наукових форумів, 1 патент на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел (202 найменування, у тому числі 14 – кирилицею та 188 – латиницею) та додатків. Дисертація викладена на 192 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 36 таблицями та 46 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Дослідження проведені на 160 нащадках щурів лінії Wistar, віком 1 і 6 місяців. Щури перебували в умовах природного освітлення при вільному доступі до води та їжі. Експериментальні тварини були розподілені на 8 експериментальних груп по 20 щурів. Групи 1 та 2 – нащадки контрольних самиць, віком 1 і 6 місяців; групи 3 та 4 – нащадки самиць з ЕГД віком 1 і 6 місяців; групи 5 та 6 – 1 і 6 місячні нащадки самиць з ЕГД, яким під час вагітності проводили фармакологічну корекцією глібенкламідом; група 7 та 8 – 1 і 6 місячні нащадки самиць з ЕГД, яким протягом перших 14 днів життя проводили пероральне введенням інсуліну.

Для індукції ЕГД використовували стрептозотонин (SIGMA Chemical, США) розчинений в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH=4,5), який вводили самицям віком 6-7 місяців внутрішньоочеревинно в дозі 45 мг/кг на 15 добу датованої вагітності, що відповідає останньому триместру вагітності. На 2-3 добу після введення стрептозотонину у всіх самок після 10-годинного голодування визначали рівень глюкози венозної крові з хвостової вени глюкозооксидазним методом. В експеримент відбирали тварин з рівнем глікемії більше 8 ммоль/л. Щурят від самок з ЕГД відсаляли через місяць після народження. Для фармакологічної корекції використовувався глібенкламід (Фармак, Україна), який вводили самцям з ЕГД внутрішньошлунково в дозі 5 мг/кг на протязі 7 діб щоденно, починаючи з 1 дня індукції діабету. Людський інсулін короткої дії (Novo Nordisk, Данія) вводили нащадкам самиць з ЕГД перорально (за допомогою піпетки), протягом перших 14 днів життя. Після виведення щурів означених груп з експерименту (під тіопенталовим наркозом в дозі 120 мг/кг ваги) у них вилучали БЛВ, які на 20 годин занурювали в фіксатор Буена, після промивки та дегідратації заливали в парапласт (TradeMark of McCormick Scientific, LLC: Made U.S.A.).



Для ідентифікації TLR2 і TLR4 у гістологічних зрізах БЛВ застосовували прямий імуофлюоресцентний метод з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флюоресцеїна ізотіоціанатом (FITC). Для ідентифікації NOD2, RIGI, T-bet, Nlrp3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у гістологічних зрізах ПЛВ застосовували непрямий імуофлюоресцентний 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 (НИН, 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 у паракортикальній зоні і мозкових тяжках БЛВ.

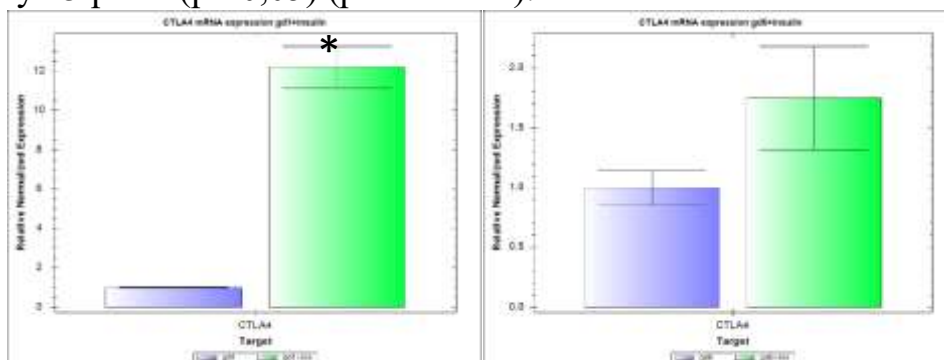
Для дослідження експресії мРНК генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *IL10*, *Ctla4*, *Cxcr4*, *Ccr7*, *Madcam1*, *Slpr1* використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу з використанням ампліфікатора CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems з програмним забезпеченням CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Використовували архівний гістологічний матеріал (парафінові блоки) віком 3 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, розміщували 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](http://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  $\Delta\Delta$ Сt. 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» (StatSoftInc., №АХХR712D833214FAN5). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). При порівнянні даних використовували параметричний t-критерій Стьюдента, 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 у нащадків щурів з ЕГД спостерігається значне зниження вмісту мРНК аутоімунного регулятора (в 8,1 рази ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних та в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних нащадків у порівнянні з контрольною групою тварин. Вміст мРНК транскрипційного регулятора *Deaf1* у 1-місячних тварин достовірно не змінювався, а у 6-місячних нащадків спостерігалось її зменшення в 9,2 рази ( $p < 0,05$ ). Що стосується мРНК транскрипційного фактору *Foxp3*, то у 1-місячних щурів цієї групи виявлено значне його зменшення – у 50 раз ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних – в 2,5 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем.

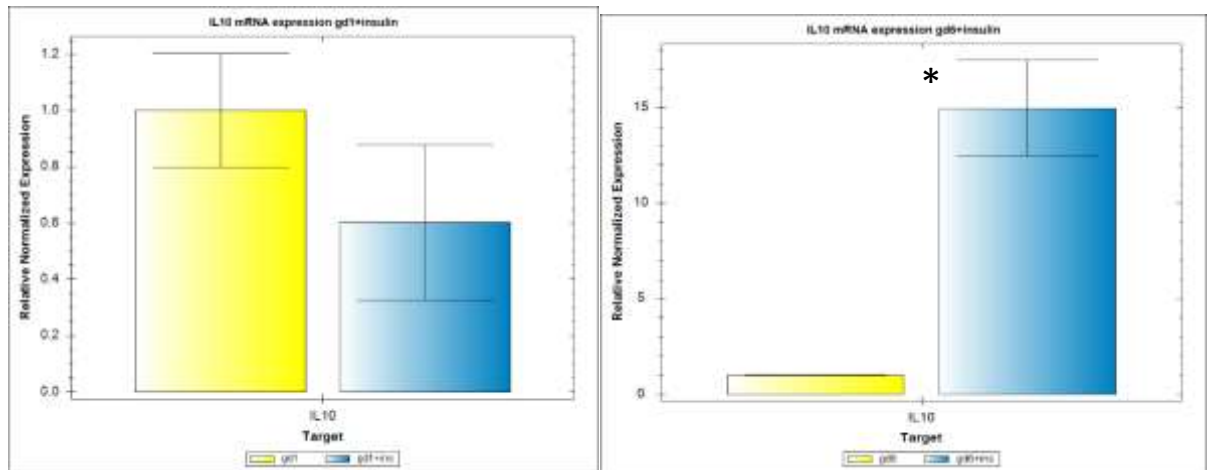
Нащадки щурів з ЕГД, яким перорально протягом перших 14 днів життя вводили інсулін показали наступні результати: у 1-місячних щурів спостерігалася транскрипційна індукція гену *Aire* - вміст мРНК аутоімунного регулятора збільшувався в 13,2 рази ( $p < 0,05$ ), у 6-місячних – в 2 рази ( $p < 0,05$ ). Транскрипційний регулятор *Deaf1* в першій віковій групі продемонстрував значне зростання – в 11,5 раз ( $p < 0,05$ ), а в наступній повертався до рівня нащадків з ЕГД. Дослідження експресії транскрипційного фактору *Foxp3* показало, що у 1-місячних щурів відбулося збільшення вмісту його мРНК в 5,2 рази ( $p < 0,05$ ), а у 6-місячних – в 3,3 рази ( $p < 0,05$ ).

В експериментальних групах нащадків, що отримували перорально інсулін, також були досліджені експресія мРНК коstimуляторних молекул *Ctla4* та Treg-залежного супресорного цитокіну IL-10. Були отримані наступні результати: у віці 1 місяця відносна кількість мРНК гену *Ctla4* зросла у 12,2 рази ( $p < 0,05$ ), а у віці 6 місяців – достовірно не змінювалась (рис.1 А і В). Вміст мРНК *IL-10*, навпаки, у першій віковій групі не змінювався, проте в 6-місячних щурів він зріс у 15 разів ( $p < 0,05$ ) (рис.2 А і В).



Примітка. (\*) – достовірність відмінностей при  $p < 0,05$ .

Рисунок 1 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ctla4* в клітинах БЛВ нащадків щурів з ЕГД після введення інсуліну у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В)



Примітка. (\*)— достовірність відмінностей при  $p < 0,05$ .

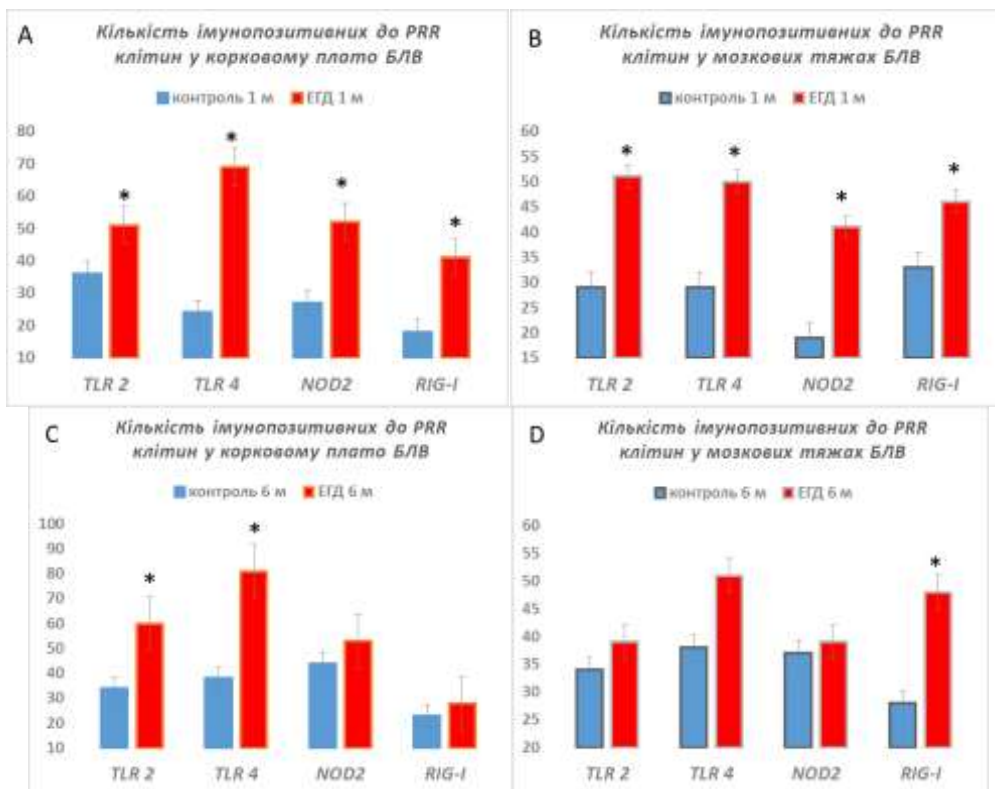
Рисунок 2 – Відносна нормалізована кількість мРНК генів *IL10* в клітинах БЛВ нащадків щурів з ЕГД після введення інсуліну у віці 1 місяця (А) та 6 місяців (В)

Наступним етапом стало визначення кількісного рівня транскриптів генів-регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів *Madcam1*, *S1pr1*, *Cxcr4* і *CCR7*, а також характеру експресії мРНК NLRP3-інфламасоми і розподілу NLRP3<sup>+</sup>-клітин в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну, після введення глібенкламіду вагітним самкам. З'ясовано, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігається значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MadCAM* та *S1pr1*, проте рівень експресії *Cxcr4* в обох вікових групах достовірно не змінився. Формування оральної толерантності до інсуліну супроводжувалося зниженням відносної нормалізованої кількості мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *S1pr1* в клітинах БЛВ. Розвиток ЕГД супроводжувався транскрипційною індукцією гена *Nlrp3* в БЛВ у нащадків, рівень мРНК якого зростав в 5 разів ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і в 3 рази ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних тварин. Введення глібенкламіду під час вагітності інгібує транскрипцію гена *Nlrp3* у нащадків лише у віці 1 місяця (в 5,3 рази,  $p < 0,05$ ) і не змінює у старшій віковій групі. У нащадків щурів з ЕГД зростає щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ більш виразно на ранніх термінах спостереження. Прийом глібенкламіду вагітними самицями знижує у нащадків кількість NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів лише у віці 1 місяця (на 33 %, коркове плато), тоді як у 6-місячних їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає.

Наступний етап досліджень полягав у вивченні розподілу рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, NOD2 і RIGI серед лімфоцитів БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, після введення самицям під час вагітності глібенкламідом, в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну у нащадків. Встановлено, що пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, більш виразно на 1 місяці життя, змінює щільність PPP на імунних клітинах (рис. 3). В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато

БЛВ зменшується чисельність TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – TLR2<sup>+</sup>- і RIG-I<sup>+</sup>-клітин. Динаміка по зменшенню кількості клітин, імунопозитивних до PRR, у корковому плато БЛВ зберігається до 6-місячного віку, супроводжується переважним зменшенням щільності мембранних і концентрації цитоплазматичних PVI в обох вікових групах, насамперед у лімфобластів. Введення глібенкламіду вагітним самкам знижує у корковому плато БЛВ 1-місячних нащадків кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів, у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-клітин, взагалі не впливає на їх чисельність у мозкових тяжках, переважно зменшує щільність PRR на імунопозитивних лімфоцитах БЛВ на ранніх термінах спостереження (рис. 4).

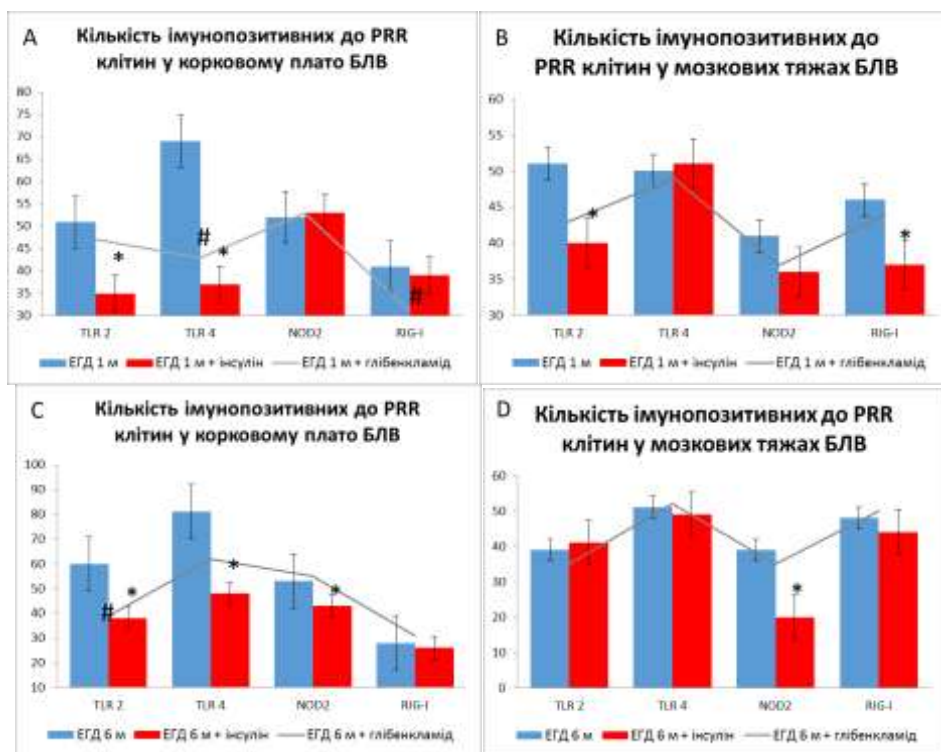
Ці результати вказують на те, що TLR4-опосередковане вивільнення запальних цитокінів може бути одним із факторів, що приводить до підвищення рівня глюкози у пацієнтів з ГД. Крім того, можна стверджувати, що TLR4 є однією з ланок патогенезу ГД. Щодо виявленого збільшення кількості NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, то це може свідчити, що не лише мембранні Толл-подібні рецептори, але і цитоплазматичні сенсори вродженої ланки імунної системи можуть грати важливу роль у патогенезі імунних порушень у них.



Примітка. (\*) – достовірність відмінностей при  $p < 0,05$ .

Рисунок 3 – Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (А, С) та мозкових тяжках (В, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків самиць з нормальною вагітністю та після ЕГД

Отримані в дослідженні результати узгоджуються з іншими даними щодо здатності ГД чинити значний вплив не лише на імунні процеси у матері, але і у нащадків. У дослідах доведена роль TLR4 у пацієнтів з ГД. Рівні експресії TLR4 у моноцитах материнської периферичної крові та рівні TNF- $\alpha$  у сироватці були підвищені у жінок з ГД у порівнянні зі здоровими вагітними жінками. Ці результати вказують на те, що TLR4-опосередковане вивільнення запальних цитокінів може бути одним із факторів, що приводить до підвищення рівня глюкози у пацієнтів з ГД [Xie B.G. et al., 2014]. Крім того, можна стверджувати, що TLR4 є однією з ланок патогенезу ГД. Це підтверджується і результатами по підвищенню рівня мРНК TLR2 і TLR4 у моноцитах периферичної крові у жінок з ГД, як одного з показників ранніх метаболічних порушень в умовах розвитку ГД [Kuzmicki M. et al., 2013].



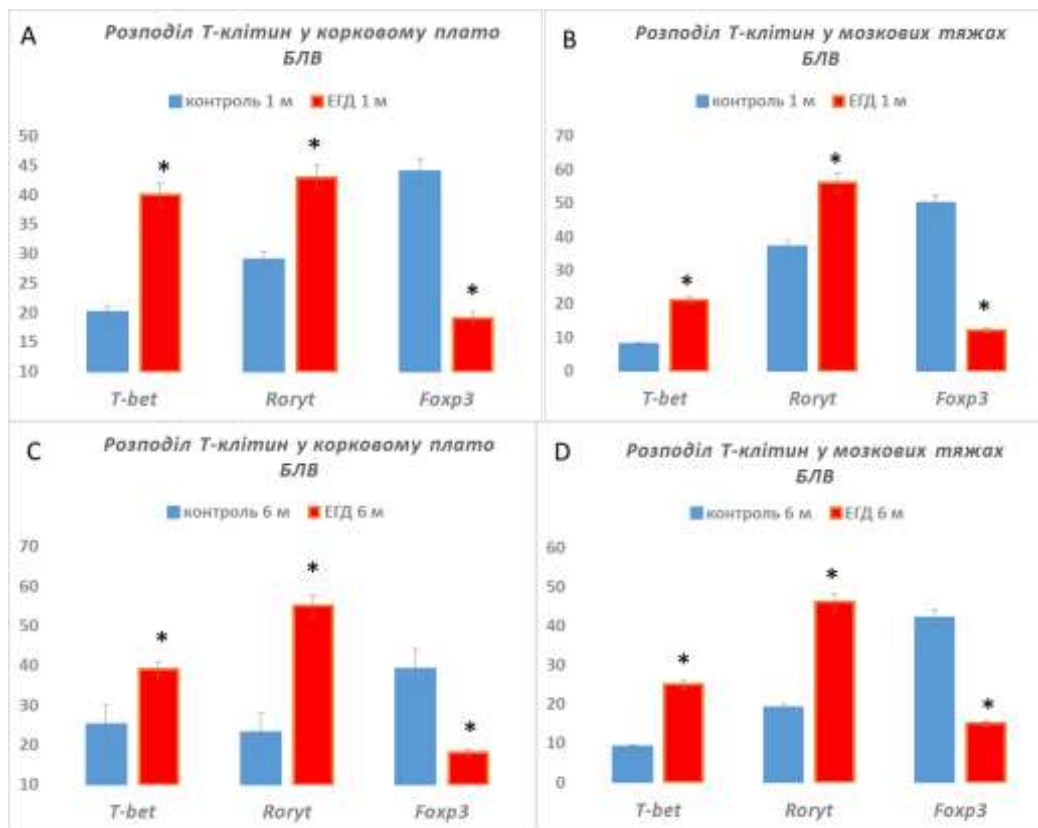
Примітка. (#, \*) – достовірність відмінностей при  $p < 0,05$ .

Рисунок 4 – Щільність імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (А, С) та мозкових тязях (В, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків у нащадків самиць з нормальною вагітністю, після ЕГД, на фоні введення глібенкламід вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам

Щодо виявленого збільшення кількості NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД, то це може свідчити, що не лише мембранні толл-подібні рецептори, але і цитоплазматичні сенсори вродженої імунної системи можуть грати важливу роль у патогенезі імунних порушень у них. Така надмірна активація РВІ, за даними літератури, може бути викликана щонайменше двома факторами: по-перше, в умовах розвитку ГД у людини і ЕГД у експериментальних тварин спостерігаються значні порушення складу кишкової

мікробіоти як у матері, так і у нащадків [Hasan S. et al., 2018], що суттєво змінює рівень лігандів для ПРР; по-друге, ЕГД супроводжується змінами метаболічного профілю у нащадків, що включають зміни метаболізму амінокислот, біосинтезу стероїдних гормонів, метаболізму гліцерофосфоліпідів та жирних кислот, які теж можуть розпізнаватися РВІ [Mokkala K. et al., 2017].

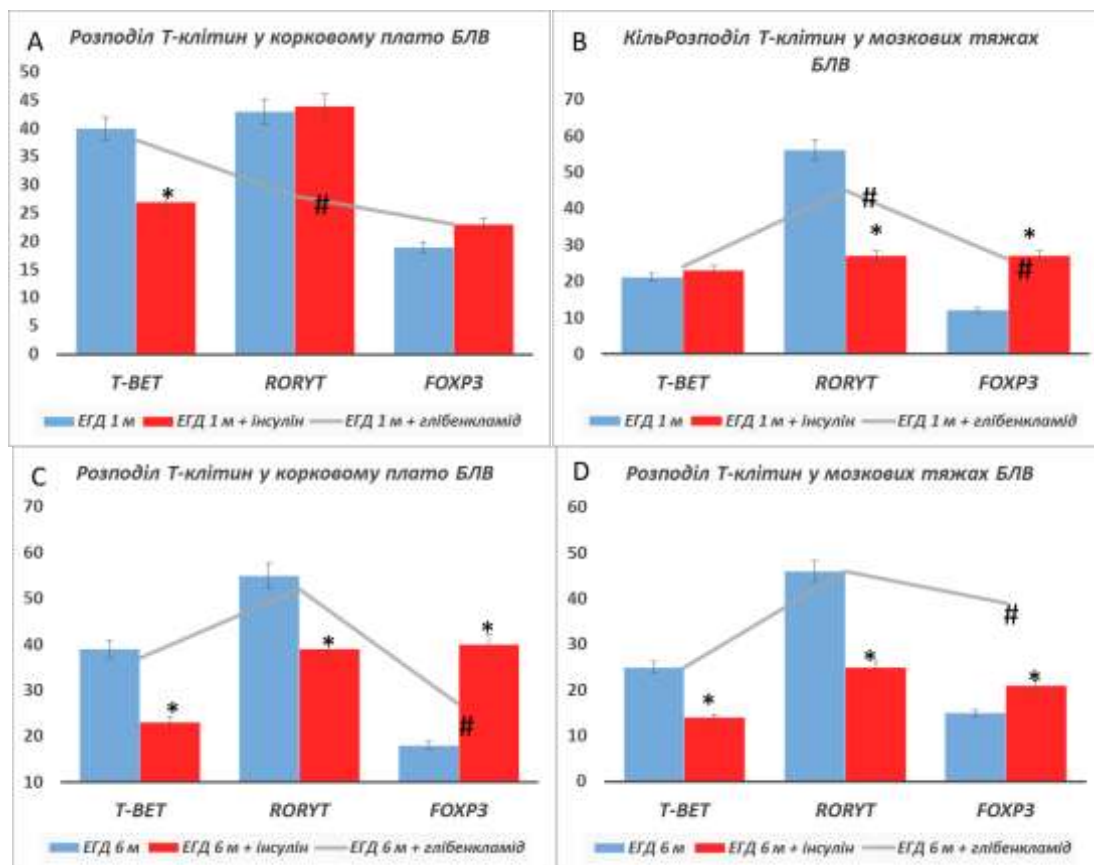
Наступний етап досліджень полягав у вивченні динаміки клітинного складу субпопуляцій Т-хелперів  $T\text{-bet}^+$  (Th1),  $ROR\gamma^+$  (Th17) і  $Foxp3^+$ -лімфоцитів (Treg) в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД. Визначено, що пренатальна гіперглікемія сприяє зростанню кількості  $T\text{-bet}^+$ - і  $ROR\gamma^+$ -лімфоцитів в БЛВ нащадків більш виразно на 1 місяці життя, призводить до зменшення кількості  $Foxp3^+$ -лімфоцитів та змінює щільність ПРР на імунних клітинах (рис. 5).



Примітка. (\*) – достовірність відмінностей при  $p < 0,05$ .

Рисунок 5 – Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (А, С) та мозкових тяжках (В, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків у нащадків самиць з нормальною вагітністю та після ЕГД

В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшувалась чисельність  $T\text{-bet}^+$ -лімфоцитів, в мозкових тяжках –  $ROR\gamma^+$ -клітин. У віці 6 місяців відбувалося значне зменшення сумарної щільності  $T\text{-bet}^+$ -,  $ROR\gamma^+$ - і  $Foxp3^+$ -клітин. Введення глібенкламіду вагітним самкам не змінювало сумарної кількості  $T\text{-bet}^+$ -лімфоцитів, призводило до зниження у БЛВ 1-місячних та 6-місячних нащадків кількості  $ROR\gamma^+$ -клітин але збільшення чисельності  $Foxp3^+$ -клітин (рис. 6).



Примітка. (#, \*) – достовірність відмінностей при  $p < 0,05$ .

Рисунок 6 – Щільність імунопозитивних лімфоцитів в корковому плато (А, С) та мозкових тяжках (В, D) брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів у нащадків самиць з нормальною вагітністю та після ЕГД, на фоні введення глібенкламід у вагітним самкам і перорального інсуліну нащадкам

Таким чином, у дисертаційній роботі виявлено цілий комплекс ключових патофізіологічних і функціональних змін в клітинах БЛВ у нащадків щурів з ЕГД: встановлені зміни експресії регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів; порушення формування периферичної імунологічної толерантності; доведено активацію ПРР вродженої імунної системи на лімфоцитах БЛВ; зміни розподілу ефекторних Т-клітин в БЛВ; посилення прозапальної сигналізації на тлі зменшення рівня мРНК *Foxp3* (рис. 7). Отримані результати доводять, що порушення функціонування клітин БЛВ грають важливу роль в імунопатогенетичних механізмах розвитку ЦД.



Рисунок 7 – Механізми порушень формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів



## ВИСНОВКИ

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

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

2. У нащадків щурів з ЕГД в БЛВ спостерігається значне збільшення вмісту мРНК *Ccr7*, *MAdCAM* та *Slpr1*, що супроводжується транскрипційною індукцією гена *Nlrp3*, рівень мРНК якого зростає в 5 разів у 1-місячних і в 3 рази у 6-місячних тварин; зростає щільність популяції NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів більш виразно на ранніх термінах спостереження. Введення глібенкламіду під час вагітності пригнічує транскрипцію гена *Nlrp3* у нащадків лише у віці 1 місяця і не змінює у старшій віковій групі. Кількість NLRP3<sup>+</sup>-лімфоцитів у віці 1 міс знижена, тоді як у 6-місячних нащадків їх чисельність у мозкових тяжках навіть зростає. Формування оральної толерантності до інсуліну супроводжується зниженням мРНК генів *Ccr7*, *Madcam1* і *Slpr1* в клітинах БЛВ.

3. Пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків більш виразно на 1 місяці життя, та змінює щільність PPP на імунних клітинах. Введення глібенкламіду вагітним самкам знижує у корковому плато БЛВ 1-місячних нащадків кількість TLR4<sup>+</sup>- та RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів, у 6-місячних – лише TLR2<sup>+</sup>-клітин, у мозкових тяжках БЛВ не впливає на їх чисельність, але зменшує щільність PPP на імунопозитивних лімфоцитах на ранніх термінах спостереження. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшується чисельність TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – TLR2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>- клітин. Динаміка зменшення кількості клітин, імунопозитивних до PPP у корковому плато БЛВ зберігається до 6-місячного віку, супроводжується переважним зменшенням щільності мембранних і концентрації цитоплазматичних РВІ в обох вікових групах, насамперед у лімфобластів.

4. Пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості T-bet<sup>+</sup> і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, більш виразно на 1 місяці життя, сприяє зменшенню кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та зміні щільність PPP на імунних

клітинах. Введення глібенкламіду вагітним самкам не змінює сумарної кількості T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, призводить до зниження у БЛВ 1-місячних та 6-місячних нащадків кількості RORγt<sup>+</sup>-клітин та збільшення Foxp3<sup>+</sup>-клітин. В умовах формування оральної толерантності до інсуліну у 1-місячних нащадків у корковому плато БЛВ зменшується чисельність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів, в мозкових тяжках – RORγt<sup>+</sup>-клітин. У віці 6 місяців значно зменшується сумарна щільності T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-клітин.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Камышный А.М., Прозорова Т.М., Камышная В.А. Влияние экспериментального гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК AIRE и характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup> клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства. *Морфология*. 2015. Т. 9, №2. С. 29 - 35. *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*.
2. Прозорова Т.М., Камишний О.М. Зміни рівня експресії мРНК генів AIRE, DEAF1, FOXP3, CTLA4 і IL10 в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. *Проблеми ендокринної патології*. 2016. № 3(57). С.50 - 59. *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*.
3. Prozorova T., Kamyshny A., Kamyshna V. Mechanisms of oral tolerance to insulin in offspring of rats with experimental gestational diabetes. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*. 2017. V.2 (2), P. 27 - 33. *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*.
4. Прозорова Т.М., Камишний О.М., Топол І.О. Транскрипційна індукція генів – регуляторів рециркуляції і хоумінгу лімфоцитів madcam1, slpr1, sxc4 і ccr7 в умовах експериментального гестаційного діабету, що впливає на розподіл Т-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2017. № 1. С. 23 - 33. *(Дисертантом самостійно отримано експериментальні дані та проведено їх статистичну обробку)*.
5. Камишний О.М., Прозорова Т.М., Камишна В.А. Вплив експериментального гестаційного діабету та введення глібенкламіду на рівень мРНК NLRP3-інфламасоми та розподіл NLRP3<sup>+</sup>-клітин у брижових лімфатичних вузлах у нащадків. *Патологія*. 2017. Т. 14, №2(40), С. 149 - 155. *(Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку)*.
6. Прозорова Т.М., Камишна В.А., Морозова О.В., Коваль Г.Д., Камишний О.М. Особливості експресії рецепторів вродженого імунітету лімфоцитами брижових лімфатичних вузлів у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2018. Т. 17, №2 (64). С. 63 - 69. *(Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку)*.
7. Прозорова Т.М., Крупей К.С., Камишний О.М. Ключові функціональні зміни у клітинах брижових лімфатичних вузлів нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом. *Вісник медичних і біологічних досліджень*. 2020. №1, С. 36-41. *(Дисертантом самостійно отримано дані та проведено їх статистичну обробку)*.

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

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

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

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

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

13. 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).

## АНОТАЦІЯ

**Прозорова Т.М. Функціональний стан лімфоцитів брижового лімфатичного вузла у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах індукції оральної толерантності до інсуліну. – 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, 2021.

Вперше виявлено, що у нащадків щурів з ЕГД спостерігаються порушення імунотолерантності: репресія гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*. Експериментально доведено активацію

компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЕГД і зростання кількості TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у БЛВ у нащадків. З'ясовано, що пренатальна гіперглікемія призводить до зростання кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів в БЛВ у нащадків, а також призводить до зменшення кількості Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів та змінює щільність PPP на імунних клітинах. Вперше продемонстрована здатність глібенкламиду впливати на транскрипційну активність гена *Nlrp3*, зменшувати чисельність лімфоцитів, експресуючих PPP, змінювати розподіл TLR4<sup>+</sup>- та RIG-I<sup>+</sup>-лімфоцитів а також кількості T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-клітин у у нащадків щурів з ЕГД.

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

## АННОТАЦИЯ

**Прозорова Т.М. Функциональное состояние лимфоцитов брыжеечного лимфатического узла у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом и в условиях индукции оральной толерантности к инсулину. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04. – патологическая физиология. Запорожский государственный медицинский университет МОЗ Украины, Запорожье, 2021.

Впервые обнаружено, что у потомков крыс с ЭГД наблюдаются нарушения иммунотолерантности: репрессия гена *AIRE*, снижение уровня мРНК *Deaf1*, транскрипционного фактора Foxp3. Экспериментально доказана активация компонентов врожденной иммунной системы при развитии ЭГД и увеличение количества TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- и RIGI<sup>+</sup>-лимфоцитов в БЛВ у потомков. Выяснено, что пренатальная гипергликемия приводит к увеличению числа T-bet<sup>+</sup>- и RORγt<sup>+</sup>-лимфоцитов в БЛВ у потомков, а также приводит к уменьшению количества Foxp3<sup>+</sup>-лимфоцитов и меняет плотность PPP на иммунных клетках. Впервые продемонстрирована способность глібенкламида влиять на транскрипционную активность гена *Nlrp3*, уменьшать численность лимфоцитов, экспрессирующих PPP, изменять распределение TLR4<sup>+</sup>- и RIG-I<sup>+</sup>-лимфоцитов а также количества T-bet<sup>+</sup>- и RORγt<sup>+</sup>- клеток в у потомков крыс с ЭГД.

**Ключевые слова:** экспериментальный гестационный диабет, лимфоциты, оральная толерантность, брыжеечные лимфатические узлы.

## SUMMARY

**Prozorova T.M. Functional state of the mesenteric lymph nodes' lymphocytes in the offspring of experimental rats with gestational diabetes and after induction of oral insulin tolerance. – As 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, 2021.

The thesis is devoted to the clarification of the peculiarities of changes in the functional state of the mesenteric lymph nodes in the rats with experimental gestational diabetes and in the induction of oral insulin tolerance.

As a result of the work, a complex of key pathophysiological and functional changes in MLN cells in the offspring of rats with EGD in an emerging of the formation of oral insulin tolerance was revealed: impaired formation of peripheral immunological tolerance, activation of the PRR of the innate immune system on MLN lymphocytes, changes in the distribution of effector T cells in MLN, increased pro-inflammatory signaling against the background with decreasing in Foxp3 mRNA level. It was found, for the first time, that the offspring of rats with EGD exhibit impaired immunotolerance: repression of the AIRE gene, a decrease of Deaf1 mRNA and the Foxp3 transcription factor. The activation of the components of the innate immune system during the development of EGD and increased value of TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- and RIGI<sup>+</sup>-lymphocytes in MLN in offspring have been experimentally proved. Prenatal hyperglycemia leads to increasing in the number of T-bet<sup>+</sup>- and ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-lymphocytes in MLN in offspring, and also leads to decrease in the number of Foxp3<sup>+</sup>-lymphocytes and changes the density of PRR on immune cells. There was demonstrated, for the first time, the ability of glibenclamide to influence the transcriptional activity of the Nlrp3 gene, decrease the number of lymphocytes expressing PRR, changes of the distribution of TLR4<sup>+</sup>- and RIG-I<sup>+</sup>-lymphocytes, as well as the number of T-bet<sup>+</sup>- and ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-cells in the offspring of rats with EGD.

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

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

ЦД	–	цукровий діабет
ГД	–	гестаційний діабет
ЕГД	–	експериментальний стрептозотоцин-індукований гестаційний діабет
ЛВ	–	лімфатичні вузли
Аг	–	антиген
ПІТ	–	периферична імунна толерантність
ПБ	–	пейєрові бляшки
АІЗ	–	аутоімунні захворювання
БЛВ	–	брижові лімфатичні вузли
ОТ	–	оральна толерантність
PPR	–	патерн - розпізнаючі рецептори
Th	–	T-хелпери
TLR	–	Toll-подібні рецептори
NLR	–	NOD-подібні рецептори
RLR	–	RIG-подібні рецептори
NOD2	–	рецептор групи NLR
RIGI	–	рецептор групи RLR, фермент хелікази
GLUT1	–	глюкозний транспортер 1 типу
Aire	–	аутоімунний регулятор
Deaf1	–	транскрипційний регулятор експресії периферичних антигенів
ПТА	–	периферичні тканиноспецифічні антигени
IL1 $\beta$	–	інтерлейкін 1 $\beta$
IL17A	–	інтерлейкін 17A
Th1	–	T-хелпери 1 типу
Th17	–	T-хелпери 17 типу
Treg	–	T-регуляторні клітини
Foxp3	–	фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання T-лімфоцитів у напрямку Treg
T-bet	–	фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання T-клітин у напрямку Th1
ROR $\gamma$ t	–	(ретиноїд-орфан рецептор $\gamma$ t) фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання T- клітин у напрямку Th17
eTACs	–	екстратимічні клітини, що експресують Aire
STZ	–	стрептозотоцин
ДК	–	дендритні клітини
АПК	–	антиген-презентуючі клітини
GAPDH	–	гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа
PBI	–	рецептори вродженого імунітету

Підписано до друку 24.03.2021 р. Гарнітура Times New Roman.  
Папір друкарський. Формат 60×90/16. Умовн. друк. арк. 0,9.  
Обл.-вид. арк. 0,9. Друк — ризограф.  
Наклад — 100 прим. Зам. № 9125.  
Надруковано з оригінал-макету в типографії  
Запорізького державного медичного університету  
м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26