

Множественные иммунорегуляторные нарушения у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом

Д.м.н., проф. Ю.М. КОЛЕСНИК, д.м.н., с.н.с. доц. А.М. КАМЫШНЫЙ¹, д.м.н., проф. А.В. АБРАМОВ, к.м.н., доц. О.В. ГАНЧЕВА, к.м.н., асс. В.А. ЛЮБОМИРСКАЯ

Multiple immunoregulatory disturbances in the progeny of rats with experimental gestational diabetes

YU.M. KOLESNIK, A.M. KAMYSHNY, A.V. ABRAMOV, O.V. GANCHEVA, V.A. LYUBOMIRSKAYA

Кафедра патологической физиологии; ЦНИЛ Запорожского государственного медицинского университета

Исследовали морфофункциональное состояние экспрессирующих инсулин, антигенпредставляющих, клеток T_{reg} , эпителиоретикулоцитов, клеток тимуса c-Fos+ и Bcl-2+ у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД). Определение проводили иммуногистохимическими методами прямой и непрямой иммунофлюоресценции с применением моноклональных антител к инсулину, антигену МНС-II, антигену CD25, белкам цитокератинам, Bcl-2 и c-Fos крысы. У потомства крыс с ЭГД были выявлены множественные иммунорегуляторные нарушения тимуса: изменения процессов дифференцировки клеток T_{reg} , снижение экспрессии белков раннего ответа c-Fos, снижение числа эпителиоретикулоцитов, антигенпредставляющих и инсулин-иммунопозитивных клеток, а также гиперэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, что нарушает нормальное течение процессов апоптоза, селекции тимоцитов и формирования центральной толерантности к антигенам поджелудочной железы.

Ключевые слова: тимус, ЭГД, инсулин, клетки T_{reg} , АПК, Bcl-2, c-Fos.

The objective of the present work was to study the morphofunctional state of insulin-expressing, antigen-presenting, Treg cells, epithelioreticulocytes, thymic cells expressing c-Fos and Bcl-2+ in the progeny of rats with experimental gestational diabetes (EGD). The methods employed included immunohistochemical staining with direct and indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies against insulin, MHC-II antigen, CD25 antigen, cytokeratins, rat Bcl-2 and c-Fos proteins. The off-springs of rats with experimental gestational diabetes were shown to have multiple disturbances of immunoregulation in the thymus, such as abnormalities of Treg cell differentiation, impaired expression of early response proteins (c-Fos), reduced number of epithelioreticulocytes, antigen-presenting and insulin-immunopositive cells, hyperexpression of anti-apoptotic Bcl-2 protein. These changes interfere with the normal apoptotic process, selection of thymocytes, and development of central tolerance to pancreatic antigens.

Key words: thymus, experimental gestational diabetes, Treg cells, APC, Bcl-2, c-Fos.

За последние годы накоплено много данных, свидетельствующих о важной роли нарушения функционирования центрального органа иммуногенеза — тимуса в патогенезе сахарного диабета (СД) [1, 2]. Участие тимуса в иммунопатогенетических механизмах СД подтверждается возможностью препятствовать развитию СД или способствовать его ремиссии путем восстановления толерантности к антигенам β -клеток с помощью таких средств, как неонатальная тимэктомия, внутритимическая пересадка β -клеток, применение моноклональных антител против антигенов CD3 и CD8, введение популяций дендритных и Т-регуляторных клеток и др. [3]. Установлено, что одними из основных патогенетических факторов развития СД являются нарушение формирования центральной толерантности к антигенам поджелудочной железы (ПЖ) из-за изменения морфофункционального состояния антигенпредставляющих клеток (АПК) тимуса (их количества, экспрессии костимуляторных молекул CD80 и CD86 и др.), отсутствие достаточного представ-

ительства антигенов β -клеток в тимусе или нарушение продукции тимусом популяции естественных (натуральных) регуляторных Т-клеток CD4+CD25+ (T_{reg}) [4, 5].

В свою очередь одной из актуальных проблем современной диабетологии является гестационный диабет (ГД) — нарушение углеводного обмена, впервые выявленное или возникшее во время беременности и приводящее к гипергликемии разной степени выраженности. ГД является основной причиной макросомии плода (частота родов крупным плодом варьирует в пределах 8—18,5%) и одним из факторов риска развития в дальнейшем у потомства СД [6]. Внутритробная гипергликемия, развивающаяся при ГД, способна вызвать нарушения морфогенеза тимуса и дисфункцию его лимфоидного и эпителиального компонентов, что может привести к нарушению формирования центральной толерантности к инсулину как фактору риска развития СД у потомства. Тем не менее в настоящий момент практически отсутствуют данные об особенностях мор-

фофункционального состояния тимуса у потомства, рожденного от матерей, перенесших ГД. Поэтому целью настоящего исследования было изучение особенностей формирования центральной толерантности к антигенам ПЖ, выяснение функционального состояния АПК и клеток T_{reg} тимуса, а также определение особенностей течения процессов апоптоза тимоцитов у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

Материал и методы

ЭГД моделировали по методике, разработанной на кафедре патофизиологии ЗГМУ [7]. Самкам крыс линии Вистар на 15-е сутки беременности однократно внутривбрюшинно вводили стрептозотцин (SIGMA, США) в дозе 45 мг/кг, разведенного *ex tempore* в 1 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5). На 3-й день у самок измеряли уровень глюкозы в крови и в дальнейший эксперимент отбирали только тех крыс, уровень глюкозы у которых составлял не менее 8 ммоль/л. Новорожденных крысят от самок с ЭГД отсаживали через месяц после рождения, разделив по полу. Исследования проведены на месячных ($n=9$) и 3-месячных ($n=9$) самцах — потомках крыс с ЭГД, в качестве контрольной группы использовали самцов того же возраста, содержащихся в тех же условиях, рожденных от интактных крыс линии Вистар, которым на 15-е сутки беременности вводили внутривбрюшинно цитратный буфер. Животных декапитировали под наркозом и выделяли тимус, который фиксировали в растворе Буэна (18 ч) и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин.

Экспрессирующие инсулин клетки тимуса (Ins+) выявляли иммуногистохимическим методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител к инсулину («Peninsula Laboratories Inc.», США). АПК тимуса определяли иммуногистохимическим методом прямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител к антигену МНС-II крысы («Beckman Coulter», США). Для выявления эпителиоретикулоцитов тимуса использовали моноклональные антитела к белкам цитокератинам (monoclonal Anti-Pan Cytokeratin — МАРС,

клон РСК-26), являющимся специфическими маркерами эпителиальных клеток («Sigma Chemical», США). Клетки тимуса T_{reg} выявляли иммуногистохимическим методом прямой иммунофлуоресценции, используя моноклональные антитела к одному из основных маркеров регуляторных клеток — CD25 (антитела производства «Caltag Laboratories», США). Влияние ЭГД на интенсивность экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и белков раннего ответа c-Fos в тимусе исследовали с помощью иммуногистохимического метода непрямой иммунофлуоресценции и моноклональных антител к Bcl-2 и c-Fos крысы («Sigma Chemical», США). На флуоресцентном микроскопе Axioskop («Zeiss», Германия) исследовали корковое и мозговое вещество тимуса, с помощью видеокамеры СОНУ-4922 (США) изображения вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS-386 («Kontron Elektronik», Германия). Структуру тимуса анализировали с помощью оригинального программного обеспечения, разработанного на основе макроязыка программирования VIDAS [8]. При этом изучаемыми параметрами были плотность иммунопозитивных клеток соответствующего класса на 1 мм² тимуса. Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, концентрацию инсулина в плазме — иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы «Peninsula Laboratories Inc.» (США). Вероятность различий в группах определяли t-статистикой Стьюдента с помощью пакета Statistica 6.0 (Stat-Soft, 2001), критический уровень значимости принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

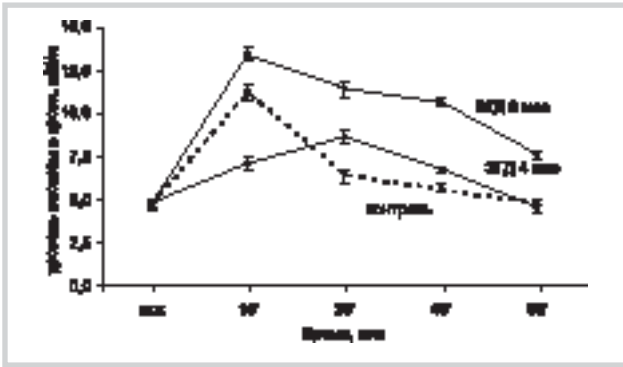
Установлено (табл. 1), что у потомства крыс с ЭГД на протяжении первых 6 мес постнатального периода уровень глюкозы в крови натощак характеризовался относительной стабильностью и был в пределах нормы. В то же время наблюдалось статистически значимое увеличение концентрации инсулина в плазме и увеличение индекса НОМА, что может свидетельствовать о развитии инсулинорезистентности.

У потомства крыс с ЭГД уже с 4-месячного возраста были отмечены изменения в тесте на то-

Таблица 1. Концентрация глюкозы и инсулина в периферической крови у самцов, потомков самок с экспериментальным гестационным диабетом ($M \pm m$)

Возраст животных, мес	Концентрация глюкозы, ммоль/л		Концентрация инсулина, мкЕД/мл		Индекс НОМА	
	контроль	потомки самок с ЭГД	контроль	потомки самок с ЭГД	контроль	потомки самок с ЭГД
2	4,45±0,1	4,11±0,22	1,25±0,05	2,17±0,05*	0,25	0,4
4	4,02±0,09	4,80±0,16*	2,21±0,20	7,91±0,28*	0,39	1,7
6	4,70±0,12	6,10±0,15*	1,44±0,15	5,57±0,53*	0,3	1,5

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: * — $p < 0,05$ при сравнении с контролем.



Результаты теста на толерантность к глюкозе у 4- и 6-месячных самцов, потомков самок с ЭГД ($M \pm t_{0,05} * m$).

лерантность к глюкозе — ТТГ (см. рисунок), что проявлялось отсроченностью появления пика гипергликемии в крови (не с 15-й, а с 30-й минуты); при этом пик концентрации глюкозы в крови был значимо ниже ($p < 0,05$), чем в контрольной группе, а эугликемический уровень достигался не к 30-й, а только к 90-й минуте теста.

У 6-месячных животных — потомков самок с ЭГД при проведении ТТГ наблюдался диабетический тип гликемической кривой (см. рисунок), для которого характерно нарушение ранней и поздней фаз секреции инсулина с развитием инсулинорезистентности, о чем свидетельствует высокая гликемия в постабсорбционный период теста (после 90-й минуты).

Длительное время считалось, что β -клетки панкреатических островков являются единственным местом продукции инсулина в организме. Однако в последнее десятилетие была обнаружена внепанкреатическая экспрессия инсулина в тимусе, головном мозге, печени, жировой ткани, костном мозге, селезенке у человека и экспериментальных животных (мышей, крыс) в норме и при СД 1-го и 2-го

типов, а также при искусственно поддерживаемой гипергликемии [9]. В 1998 г. были предприняты первые попытки установления клеточной принадлежности АПК тимуса, экспрессирующих инсулин [5]. Согласно полученным данным, такими являются дендритные клетки и макрофаги, имеющие костно-мозговое происхождение. Было выявлено клеточное распределение синтеза предшественников гормонов ПЖ: в дендритных клетках экспрессировался только препроинсулин, тогда как в макрофагах определяли экспрессию проглюкагона, просоматостатина и пропанкреатического полипептида, но не препроинсулина [5]. Строгими оказались последовательность и клеточная топография экспрессии генов семейства инсулина в строме тимуса: инсулиноподобный фактор роста 2-го типа — ИРФ-2 (эпителиальные клетки тимуса) — ИРФ-1 (тимические макрофаги) — инсулин (тимические эпителиальные клетки и/или дендритные клетки) [1]. С учетом того, что тимический инсулин наряду с другими островковыми антигенами (GAD, карбоксипептидаза Н, проглюкагон, просоматостатин, пропанкреатический полипептид и др.) обеспечивает формирование центральной толерантности к антигенам β -клеток панкреатических островков, а нарушение его презентации АПК тимуса может являться одним из пусковых механизмов развития СД, представляет исключительный интерес изучение уровня экспрессии инсулина в тимусе и у потомства крыс с ЭГД. Изучение плотности популяции Ins^+ клеток в корковом веществе тимуса у потомства крыс с ЭГД позволило выявить достоверное снижение их количества во все исследованные возрастные периоды по сравнению с таковыми у контрольных животных (табл. 2). Так, у месячного потомства крыс с ЭГД плотность популяции клеток Ins^+ снижалась на 48% ($p < 0,05$), у 3-месячного — на 53% ($p < 0,05$) по сравнению с таковой в контроле. Сходная динамика обнаруживалась и в мозговом веществе тимуса, где количество клеток Ins^+ также

Таблица 2. Количество (на 1 мм² площади среза тимуса) клеток Ins^+ , МНС-II+ и эпителиоретикулоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом ($M \pm m$)

Группа животных	Плотность популяции клеток Ins^+		Плотность популяции клеток МНС-II+		Плотность популяции эпителиоретикулоцитов	
	корковое вещество	мозговое вещество	корковое вещество	мозговое вещество	корковое вещество	мозговое вещество
Через 1 мес						
Контроль (n=9)	295±20	379±26	563±39	434±36	448±33	524±38
Потомство крыс с ЭГД (n=9)	155±10*	160±8*	356±37*	353±33*	242±16*	299±22*
Через 3 мес						
Контроль (n=9)	387±23	349±21	536±37	511±43	399±30	513±37
Потомство крыс с ЭГД (n=9)	182±10*	190±11*	286±29*	428±34	294±18*	348±21*

достоверно снижалось на 58% ($p<0,05$) у месячного потомства и на 46% ($p<0,05$) у 3-месячного потомства крыс с ЭГД по сравнению с аналогичным показателем у контрольных животных (см. табл. 2).

Для интегральной оценки функционального состояния и процессов дифференцировки клеточных элементов тимуса необходим учет АПК — весьма гетерогенной популяции клеток организма, которая в тимусе представлена главным образом В-лимфоцитами, макрофагами и дендритными (интердигитирующими) клетками [5]. Кроме того, молекулы МНС-II в тимусе могут экспрессировать и «непрофессиональные» АПК, к которым относятся прежде всего эпителиоретикулоциты коркового и мозгового вещества [10, 11]. В нормальных условиях на АПК тимуса осуществляется случайная презентация тканеспецифических аутоантигенов, уровень экспрессии которых контролируется аутоиммунным регулятором транскрипции AIRE [11]. Поэтому, возможно, что одним из механизмов, способствующих инициации СД, является нарушение презентации антигенов ПЖ в тимусе с помощью АПК и, как следствие этого — изменение негативной селекции и развития Т-клеточной толерантности к антигенам β -клеток панкреатических островков. При изучении плотности популяции АПК в корковом веществе тимуса у потомства крыс с ЭГД выявлено статистически значимое снижение их количества у месячного потомства крыс с ЭГД на 37% ($p<0,05$), у 3-месячного — на 47% ($p<0,05$) по сравнению с таковым в контроле, тогда как в мозговом веществе тимуса количество АПК статистически значимо уменьшалось (на 19%; $p<0,05$) только у месячного потомства крыс с ЭГД (см. табл. 2).

Значительная часть антигенов ПЖ презентуется эпителиоретикулоцитами коркового и мозгового вещества тимуса [1, 11]. Эпителиальный компонент тимуса отличается выраженной раз-

нородностью и полиморфизмом [10]. В настоящее время существует большое число различных классификаций субпопуляций клеток эпителия тимуса; классификации основаны главным образом на происхождении, ультраструктурных и иммуногистохимических признаках этих клеток [12]. У месячного потомства крыс с ЭГД наблюдалось снижение суммарной плотности эпителиоретикулоцитов в коре тимуса на 46% ($p<0,05$) и в мозговом веществе на 43% ($p<0,05$) по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе животных. Сходная динамика обнаружена и у 3-месячного потомства крыс с ЭГД, у которого по сравнению с контролем суммарная плотность эпителиоретикулоцитов была снижена в корковом веществе на 26% ($p<0,05$), а в мозговом — на 32% ($p<0,05$) (см. табл. 2).

Проблема исследования молекулярных механизмов апоптоза и его роли в развитии аутоиммунных заболеваний, в том числе СД, стала в последние годы одной из самых трудных и актуальных в медицине [13]. Одним из основных регуляторов апоптоза является семейство генов *bcl-2*, которых в настоящее время насчитывает около 15 [14]. Представители семейства могут оказывать прямо противоположные эффекты на апоптоз. Так, члены этого семейства *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *ced-9*, *BHRF1*, *LMW5-HL* оказывают антиапоптотические эффекты; *Bax*, *Bcl-xS*, *Bad*, *Bak* и *Bik* усиливают апоптоз, тогда как эффекты *NR-13*, *A1*, *Mcl-1* неизвестны [13, 15]. Продукт гена *bcl-2* — белок Bcl-2 — имеет молекулярную массу 26 кДа и является важнейшим репрессором апоптоза, который оказывает двойное действие: может функционировать и как ионный канал, и как адапторный белок [16]. Он экспрессируется на мембране митохондрий, в меньшей степени — на ядерной мембране и на поверхности клеток [13, 17]. Из клеток иммунной системы Bcl-2 экспрессируется на высоком уровне в незрелых предшественниках Т- и В-клеток, дубль-

Таблица 3. Количество (на 1 мм² площади среза тимуса) клеток CD25⁺, c-Fos⁺ и Bcl-2⁺ в корковом и мозговом веществе тимуса у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом ($M\pm m$)

Группа животных	Плотность популяции клеток CD25 ⁺		Плотность популяции клеток c-Fos ⁺		Плотность популяции клеток Bcl-2 ⁺	
	корковое вещество	мозговое вещество	корковое вещество	мозговое вещество	корковое вещество	мозговое вещество
Через 1 мес						
Контроль ($n=9$)	330±16	402±34	424±31	468±30	314±20	298±20
Потомство крыс с ЭГД ($n=9$)	113±10*	134±10*	252±28*	237±25*	970±37*	706±36*
Через 3 мес						
Контроль ($n=9$)	162±9	394±27	454±33	472±30	300±21	355±18
Потомство крыс с ЭГД ($n=9$)	279±20*	142±8*	385±35	246±29*	1021±31*	833±31*

отрицательных тимоцитах, зрелых долгоживущих Т- и В-лимфоцитах, клетках памяти; слабая экспрессия или ее полное отсутствие наблюдается в период реаранжировки генов антигенраспознающих рецепторов, а также на эффекторных клетках [17, 18]. Нами обнаружено, что у месячного потомства крыс с ЭГД по сравнению с контрольной группой животных значительно возрастала суммарная плотность клеток Vcl-2+: в 3 раза ($p < 0,05$) в корковом веществе и в 2,4 раза ($p < 0,05$) в мозговом веществе; данная тенденция сохранялась и у 3-месячных животных (табл. 3). Полученные результаты можно охарактеризовать как развитие гиперэкспрессии Vcl-2 в результате ЭСД, что не противоречит имеющимся литературным данным, свидетельствующим о связи повышения экспрессии Vcl-2 и развития аутоиммунных процессов [16, 19]. Так, моделирование ослабления апоптоза путем трансфекции мышам гена *bcl-2* в форме, предусматривающей его спонтанную экспрессию во всех или в определенных клетках, позволило выявить, что основным последствием гиперэкспрессии Vcl-2 является развитие системных аутоиммунных процессов (системная красная волчанка, ревматоидного артрита) [16].

Стимуляция покоящихся клеток ведет к переходу их к пролиферации, что сопровождается экспрессией генов «немедленного раннего ответа», среди которых особый интерес представляет протоонкоген *c-fos* [20]. Кратковременная активация экспрессии *c-fos* имеет большое значение для перехода клеток из фазы G0 в фазу G1 клеточного цикла [21]. Продукт гена *c-fos* (белок c-Fos) образует гетеродимер с белками семейства *c-jun*, формируя транскрипционный комплекс AP-1 [22]. Транскрипционный фактор AP-1 участвует в поддержании базального уровня экспрессии многих генов. Он является одной из главных мишеней для соединений, вызывающих пролиферацию или дифференцировку клеток [22]. Белок раннего ответа c-Fos является ядерным фосфопротеином с молекулярной массой 55 кДа и относится к семейству транскрипционных факторов, в которое кроме него входят Fos B, FRA-1 и FRA-2 [20]. c-Fos играет важную роль в процессах дифференцировки, пролиферации и гибели клеток. В последнее время выявлена тесная связь между интенсивностью экспрессии c-Fos и уровнем апоптотических процессов в тимусе. В частности, S. Okada (2003) показал возможность влияния c-Fos на NO-зависимый апоптоз, так как установлено, что он может выступать в роли негативного регулятора транскрипции индуцибельной NO-синтазы (iNOS) путем взаимодействия с ядерным фактором NF-IL6 (nuclear factor-IL6). [23]. Кроме того, была обнаружена возможность влияния c-Fos на апоптоз через систему рецепторов к α -фактору некроза опухоли (TNF α) [21]. Нами установлено, что у месячного потомства крыс с ЭГД по сравнению с контрольной

группой животных суммарная плотность клеток c-Fos+ была снижена в корковом веществе тимуса на 41% ($p < 0,05$) и в мозговом веществе — на 49% ($p < 0,05$), тогда как у 3-месячного потомства количество клеток c-Fos+ снижалось только в мозговом веществе и оставалось на уровне контрольных значений в корковом веществе (см. табл. 3).

Важную роль в обеспечении иммунологической аутоотолерантности и негативном контроле как патологических, так и физиологических иммунных реакций играет популяция естественных (натуральных) регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺ (T_{reg}) [24–27]. Элиминация или инактивация этих клеток вызывает развитие тяжелых аутоиммунных заболеваний, а также приводит к усилению иммунного ответа на аллоантигены и опухолевые клетки [28]. По нашим данным, у месячного потомства крыс с ЭГД по сравнению с контрольной группой животных происходило снижение суммарной плотности клеток T_{reg} в корковом веществе тимуса на 66% ($p < 0,05$) и в мозговом веществе на 67% ($p < 0,05$). У 3-месячного потомства крыс с ЭГД наблюдались разнонаправленные изменения: количество клеток T_{reg} в корковом веществе возрастало на 72% ($p < 0,05$), тогда как в мозговом веществе оставалось достоверно сниженным по сравнению с таковым в контроле (см. табл. 3).

Функциональная дефектность клеток CD4⁺CD25⁺ T_{reg} обнаружена при многих аутоиммунных заболеваниях человека и моделирующей их экспериментальной патологии, прежде всего при СД 1-го типа. Так, у мышей-самок линии NOD, у которых спонтанно развивается заболевание, моделирующее СД 1-го типа, клетки T_{reg} — продуценты TGF β определяются в островковой ткани, но их содержание и функциональная активность снижаются с возрастом [29]. Введение клеток CD4⁺CD25⁺T дозозависимо снижает частоту спонтанного развития СД у мышей линии NOD. Эти клетки отменяют индукцию СД при адаптивном переносе клеток CD4⁺CD25⁺ от мышей NOD [30]. Пересадка мышам линии NOD с экспериментальным СД 1-го типа островковой ткани с одновременным инфицированием их вирусным вектором, несущим ген TGF β , приводит к усилению инфильтрации. Пересадка островковой ткани с клетками CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ — к повышению приживаемости пересаженной ткани [4]. Дефект супрессорных функций клеток T_{reg} был обнаружен и у пациентов с СД 1-го типа, что проявлялось снижением выработки интерлейкина-10 и изменением содержания внутриклеточного CTLA (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) [2].

Выводы

1. У потомства крыс с ЭГД обнаруживаются множественные иммунорегуляторные нарушения в тимусе: изменения процессов дифференциров-

ки натуральных клеток T_{reg} , снижение экспрессии белков раннего ответа c-Fos, снижение числа эпителиоретикулоцитов, антигенпредставляющих и инсулин-иммунопозитивных клеток, а также гиперэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2.

2. Обнаруженные изменения морфогенеза тимуса нарушают нормальное течение апоптоза, селек-

ции тимоцитов и формирования центральной толерантности к антигенам ПЖ, что является одним из важнейших факторов риска, способствующих развитию аутоиммунной патологии, в том числе СД, у потомства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Geenen V., Brilot F., Louis C. et al.* Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes. *Rev Med Liege* 2005; 60: 5–6: 291–296.
2. *Lindley S., Dayan C.* Defective suppressor function in CD4+CD25+T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: 92–99.
3. *Bach J.* Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis Res* 2002; 4: 3–15.
4. *Piccirillo C., Tritt M., Sgouroudis E. et al.* Control of type I autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 72–87.
5. *Throsby M., Homo-Delarche F., Chevenne D. et al.* Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages. *Endocrinology* 1998; 139: 2399–2406.
6. *Assche F., Holemans K., Aerts L.* Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull* 2001; 60: 173–182.
7. *Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Беленічев І.Ф. и др.* Спосіб моделювання гестаційного діабету у щурів лінії Вістар для вивчення його наслідків для нащадків. Декларативний патент на корисну модель — 15.09.2006. Бюл. №9 — №17281.
8. *Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Любомирська В.А., Камишний О.М.* Алгоритм автоматичного аналізу лімфоїдної популяції Тимура. *Вісник морфології* 2002; 2: 261–262.
9. *Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K. et al.* Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2458–2463.
10. *Колесник Ю.М., Камышний А.М., Абрамов А.В., Калиниченко Н.А.* Морфофункциональная характеристика эпителиоретикулоцитов тимуса у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом. *Патологія* 2006; 2: 32–37.
11. *Derbinski J., Gabler J., Kyewski B.* Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 2005; 202: 33–45.
12. *Торбек В.Э., Юрина Н.А.* Ультраструктура эпителиоцитов тимуса — *Вестн РУДН, серия Медицина* 2000; 2: 45–49.
13. *Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В.* Иммунологические проблемы апоптоза. М: Эдиториал УРСС 2002; 320.
14. *Kroemer G.* The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997; 3: 614–620.
15. *Williams O., Norton T., Halligey M.* The action of Bax and Bcl-2 on T cell selection. *J Exp Med* 1998; 188: 6: 1125–1133.
16. *Ярилин А.А.* Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. В кн.: *Актуальные проблемы патофизиологии*. М: Медицина 2001: 13–56.
17. *Zhang N., Hartig H., Dzhagalov I. et al.* The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* 2005; 10: 749–769.
18. *Opferman J., Korsmeyer S.* Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 2003; 4: 410–415.
19. *Rietz C., Screpanti V., Brenden N.* Overexpression of bcl-2 in T cells affects insulinitis in the nonobese diabetic mouse. *Scand J Immunol* 2003; 57: 4: 342–349.
20. *Ghee J., Taniura H., Yoneda Y.* A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* 2004; 27: 606–612.
21. *Wagner E., Eferl R.* Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev* 2005; 208: 126–140.
22. *Ameyar M., Wisniewska M., Weitzman J.* A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *J Biochimie* 2003; 85: 747–752.
23. *Okada S., Obata S., Hatano M., Tokuhisa T.* Dominant-negative effect of the c-fos family gene products on inducible NO synthase expression in macrophages. *Int Immunol* 2003; 15: 1275–1282.
24. *Фрейдлин И.С.* Регуляторные Т-клетки: происхождение и функция. *Мед иммунол* 2005; 4: 347–354.
25. *Jordan M., Boesteanu A., Reed A. et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001; 2: 301–306.
26. *Picca C., Caton A.* The role of self-peptides in the development of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 131–136.
27. *Sakaguchi S.* Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2004; 22: 531–562.
28. *Ярилин А.А., Донецкова А.Д.* Регуляторные Foxp3+ Т-клетки и их роль при аллергии. *Рос аллергол журн* 2005; 2: 22–26.
29. *Luo X., Yang H., Kim I. et al.* Systemic transforming growth factor-beta 1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 2005; 79: 1091–1096.
30. *Pop S., Wong C., Culton D. et al.* Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGF beta 1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2005; 201: 1333–1346.