

# ЗМІНИ РІВНЯ ЕКСПРЕСІЇ мРНК ГЕНІВ *AIRE*, *DEAF1*, *FOXP3*, *CTLA4* І *IL10* В БРИЖОВИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛАХ У НАЦДАДКІВ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГЕСТАЦІЙНИМ ДІАБЕТОМ І В УМОВАХ ФОРМУВАННЯ ОРАЛЬНОЇ ТОЛЕРАНТНОСТІ ДО ІНСУЛІНУ\*

Прозорова Т. М., Камишний О. М.

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя  
alexkamyshny@yandex.ru

Формування імунологічної толерантності до власних антигенів є важливим механізмом, що попереджує розвиток аутоімунних захворювань. В останні роки була знайдена екстратимічна експресія цілого ряду периферичних тканиноспецифічних антигенів (peripheral tissue-specific antigens, PTSAs), у тому числі таких панкреатичних антигенів як інсулін та проінсулін, регулятором ектопічної транскрипції яких є аутоімунний регулятор (*Aire*) [1]. 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) [2]. Клітини строми ЛВ, що включають фібробластні ретикулярні клітини, фолікулярні дендритні клітини і лімфатичні ендотеліальні клітини — експресують PTSAs [3], однак регулюється їх експресія не лише eTACs,

а й транскрипційним регулятором *Deaf1* (deformed autoregulatory factor 1) [4]. В свою чергу, *Aire* та *Deaf1* виступають важливими регуляторами диференціювання ще одного учасника негативного контролю розвитку АІЗ — індукцйбельних Т-регуляторних клітин (iTreg), експресуючих транскрипційний фактор *Foxp3* [5]. Дія iTreg реалізується через продукцію супресорних цитокінів — *IL10*, *IL13*, *IL35*, *TGF $\beta$*  [6], перфорин- та гранзим-залежний цитоліз ефекторних клітин та залежить від експресії негативних коstimуляторних молекул, таких як *CTLA-4* (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) [7]. Так, стромальні *Deaf1*-експресуючі клітини брижових лімфатичних вузлів (БЛВ) виробляють ретиноеву кислоту, яка сприяє розвитку *Foxp3*<sup>+</sup>-регуляторних Т-клітин [8], а Yang S. та ін. (2015) показав здатність *Aire* генерувати в перинатальний період (до 10 діб після народження включно) особливу популяцію *Foxp3*<sup>+</sup>Treg-

\*Робота є фрагментом планової наукової тематики кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології» (№ держреєстрації 0112U005642).

Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 6.06.2016.

клітин, яка стійко зберігається у дорослих мишей також [9].

В свою чергу, інтранатальна гіперглікемія, що розвивається при гестаційному діабеті (ГД), може впливати на морфогенез органів імунної системи і призводить до порушень формування ПІТ до панкреатичних АГ. Використання слизової оболонки є привабливим шляхом лікування для введення антигенів як толерогенів, особливо у молодих та здорових дітей. У тваринних моделях, оральне або інтраназальне введення ан-

тигену може індукувати ПІТ, а головним місцем для індукції ПІТ є брижові лімфатичні вузли (БЛВ), в яких відбувається інтенсивна активація наївних Т-лімфоцитів та їх диференціація в субпопуляцію ефекторних клітин [10]. Тому, метою роботи було з'ясувати рівень експресії мРНК генів *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* *Il10* в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджувані тварини були розподілені на 6 експериментальних груп по 20 особин: нащадки (самці) інтактних щурів лінії Wistar віком 1 місяць (група 1) і 6 місяців (група 2), яким на 15-у добу датованої вагітності одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН = 4,5); нащадки щурів лінії Wistar (самці) з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД) віком 1 місяць (група 3) і 6 місяців (група 4), яким на 15-у добу датованої вагітності одноразово внутрішньочеревно вводили стрептозотин в дозі 45 мг/кг; нащадки щурів з ЕГД віком 1 місяць (група 5), яким перорально за допомогою піпетки протягом перших 14 днів життя вводили людський інсулін короткої дії (*ACTRAPID® HM, NOVO NORDISK, Данія*) в дозі 30 МО (1050 мкг = 1,05 мг, 1 МО відповідає 35 мкг безводного людського інсуліну); нащадки щурів з ЕГД віком 6 місяців (група 6), яким перорально протягом перших 14 днів життя вводили інсулін в дозі 30 МО.

Об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) у експериментальних тварин були БЛВ, які поміщали в фіксатор Буена, проводили дегідратацію в висхідних концентраціях етанолу і укладали в парафінові блоки. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на архівному матеріалі віком 2 роки. РНК отримували з гістологічних зрізів завтовшки 15 мкм, для цього проводили їх депарафінізацію в кси-

лолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %). Виділення тотальної РНК проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» (Ізоген Lab., LTD, Росія), який містить *Trizol reagent* (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол с рН = 4.0) та *ExtraGene E* (суспензія суміші іонообмінників). РНК виділяли відповідно протоколу до набору.

Для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 фірми «Синтол» (Росія). Реакційна суміш загальним об'ємом 25 мкл містила 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальної РНК, 8,5 мкл деіонізованої H<sub>2</sub>O, очищеної від нуклеаз, 12,5 мкл 2,5× реакційної суміші та 1 мкл ревертази MMLV-RT. Зворотню транскрипцію проводили при 45 °С впродовж 45 хвилин з наступним нагріванням для інактивації MMLV-RT протягом 5 хв при 92 °С.

Для визначення рівня експресії мРНК досліджуваних генів *Aire* (NM\_001106379.1), *Deaf1* (NM\_031801.1), *Foxp3* (NM\_001108250.1), *IL10* (NM\_012854.2) та *Ctla4* (NM\_031674.1) використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК — полімеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфіч-

них праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загальноного об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої  $H_2O$ . Специфічні пари праймерів (5'-3') 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 фірмою Metabion (Німеччина) (табл. 1).

Після початкової денатурації протягом 10 хв при  $95^\circ C$  ампліфікація складалася з 45 циклів та проводилася за таких умов: денатурація —  $95^\circ C$ , 15 с, отжиг —  $59-61^\circ C$ , 30–60 с, елонгація —  $72^\circ C$ , 30 с. В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (*GAPDH*). Відносно нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом ддСт. 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 повторах.

Структуру популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів вивчали на підставі аналізу серійних гі-

стологічних зрізів БЛВ і даних їх морфометричних та денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротатійному мікромомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи БЛВ, які потім депарафінізували 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 Foxp3 (Santa Cruz Biotechnology, США, sc-1550-R) протягом 18 год у вологій камері при  $t = 4^\circ C$ . Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хв ( $t = 37^\circ C$ ) 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 розміщували в суміші гліцерину та фосфатного буфера (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми Image J (НИН, 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

Т а б л и ц я

## Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів

Ген	Праймер	Tm, °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>Aire</i>	F = GCCTAAAGCCAGTGATCCGA R = TCTCTACCCTGGGTTCCCTTT	59.82 59.85	43	850 851
<i>Deaf1</i>	F = GCAGAGAGGAAGGAGCAGTC R = GTGCACTCACTCATGGCCT	59.82 60.00	59	1605 1606
<i>Foxp3</i>	F = CGAGACTTGGAAGTCAGCCAC R = TCTGAGGCAGGCTGGATAACG	60.94 61.91	61	214 215
<i>IL10</i>	F = AGTGGAGCAGGTGAAGAATGA R = GACACCTTTGTCTTGGAGCTTATTA	59.02 59.06	49	445 446
<i>Ctla4</i>	F = TACAGTTTCCTGGTCACCGC R = AGGACTTCTTTTCTTTAGCGTCTT	59.97 59.96	57	567 568
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61.00 60.00	52	825 826

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 лімфоцитів, експресуючих Foxp3. Обчислювалися морфометричні та денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. Визначали абсолютну (кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup> площі зрізу) і відносну (%) щільність розподілу імунопозитивних клітин різних класів в до-

сліджених зонах БЛУ. Концентрацію транскрипційного фактору Foxp3 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 флюоресценцію фона).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження експресії гену *Aire* в БЛВ показало, 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 (рис. 1 А, В). Вміст мРНК транскрипційного регулятора *Deaf1* у 1-місячних тварин достовірно не змінювався, а у 6-місячних нащадків спостерігалася її зменшення в 9,2 рази ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 1 С, D). 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 (див. рис. 1 Е, F).

Групи тварин, нащадків 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 ( $p < 0,05$ ) (рис. 2 А, В). Транскрипційний регулятор *Deaf1* в першій віковій групі продемонстрував значне зростання — в 11,5 разів ( $p < 0,05$ ), а в наступній повертався до рівня ЕГД (див. рис. 2 С, D). Дослідження експресії транскрипційного фактору *Foxp3*

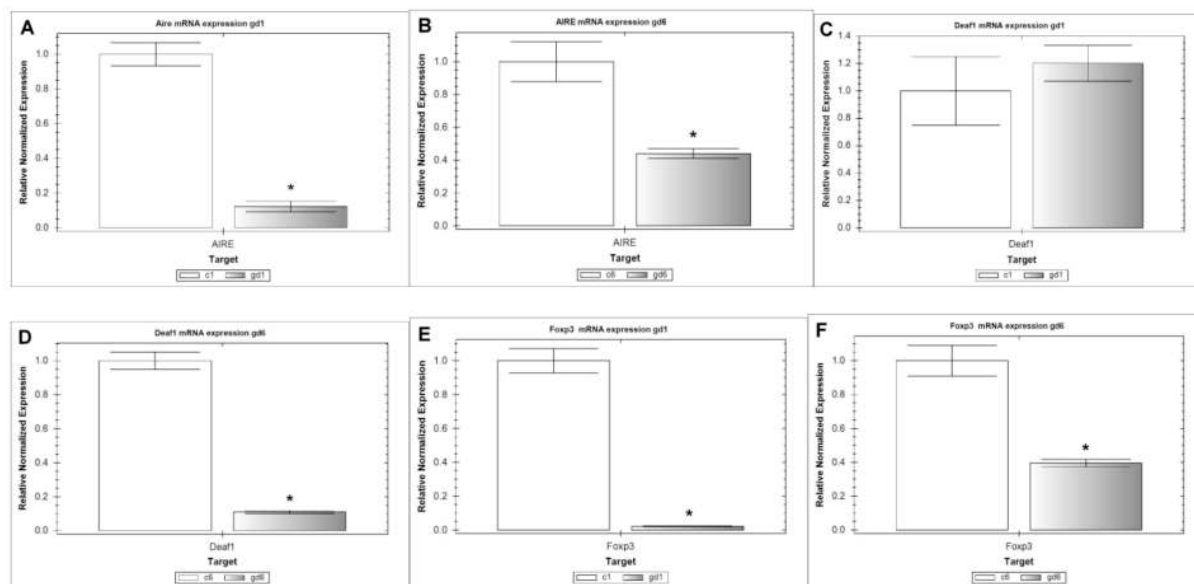


Рис. 1. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Aire* (А, В), *Deaf1* (С, D) та *Foxp3* (Е, F) в клітинах БЛВ. Нормалізація за методом ддСт з референс-геном *GAPDH*. c1, c6-контроль 1 і 6 міс.; gd1, gd6 — нащадки щурів з ЕГД.

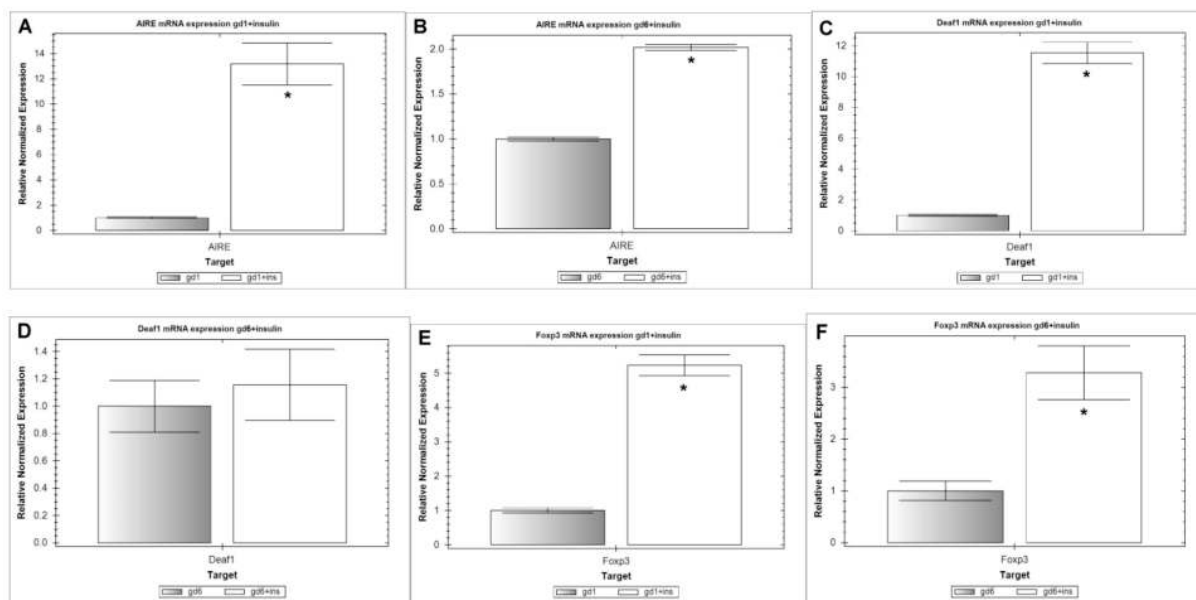


Рис. 2. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Aire* (A, B), *Deaf1* (C, D) та *Foxp3* (E, F) в клітинах БЛВ. Нормалізація за методом ДДСт з референс-геном *GAPDH*. gd1, gd6 — нащадки щурів з ЕГД; gd1 + ins, gd6 + ins — після введення інсуліну.

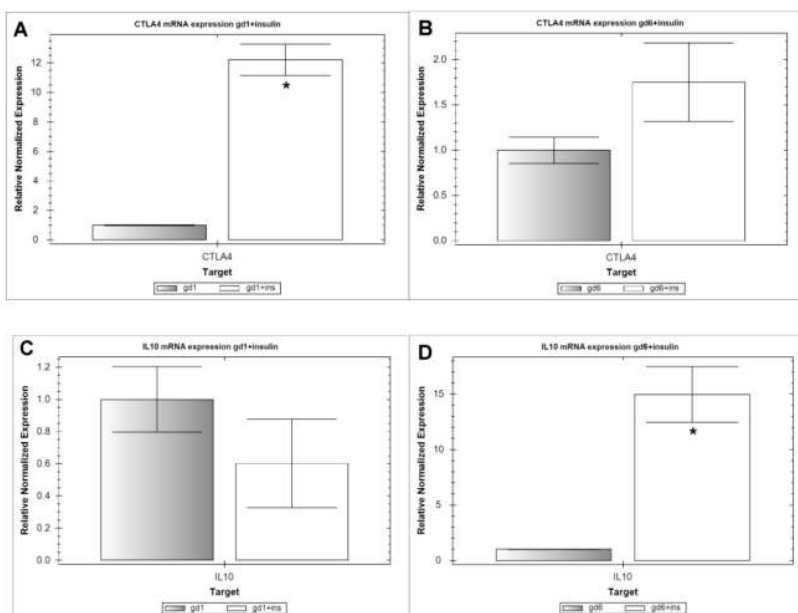


Рис. 3. Відносна нормалізована кількість мРНК генів *Ctla4* (A, B) та *IL10* (C, D) в клітинах БЛВ. Нормалізація за методом ДДСт з референс-геном *GAPDH*. gd1, gd6 — нащадки щурів з ЕГД; gd1+ins, gd6+ins — після введення інсуліну.

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 ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 2 E, F).

В експериментальних групах, що отримували перорально інсулін, також були досліджені експресія мРНК коstimуляторних молекул *Ctla4* та Treg-залежного супресор-

ного цитокіну ІЛ-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. 3 A, B). Вміст мРНК ІЛ-10, навпаки, у першій віковій групі не змінювався, проте в 6-місячних щурів він зріс у 15 раз ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 3 C, D).

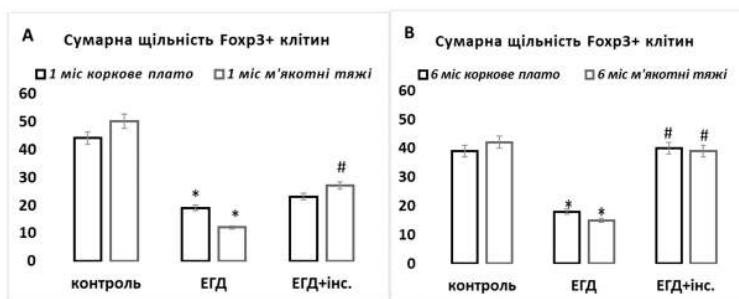


Рис. 4. Сумарна щільність (на 1 мм<sup>2</sup>) *Foxp3*<sup>+</sup> клітин в корковому плато і м'якотних тяжках БЛВ у 1-міс (А) і 6-міс (В) нащадків щурів з ЕГД та після введення інсуліну.

\* —  $p < 0.05$  у порівнянні з контролем, # —  $p < 0.05$  у порівнянні з ЕГД.

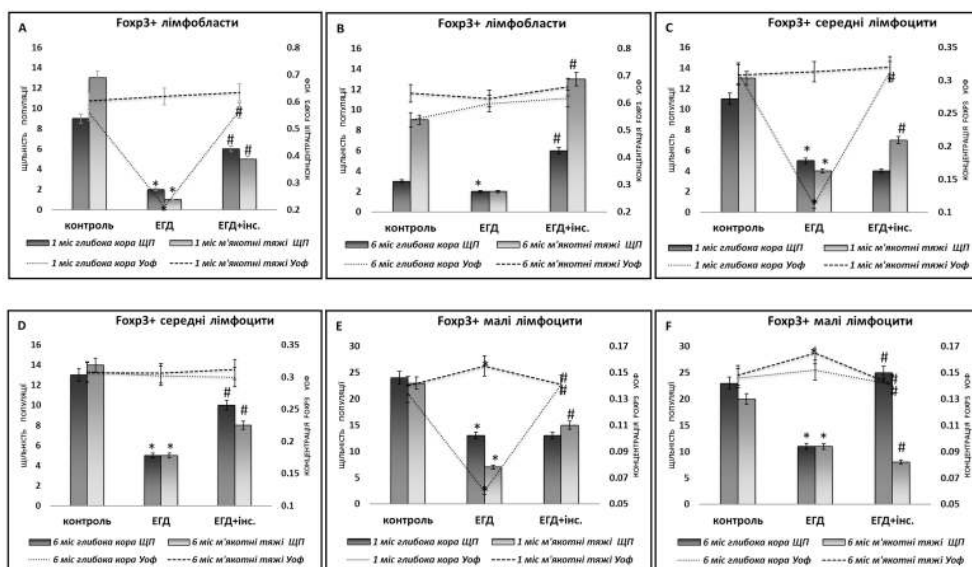


Рис. 5. Щільність популяції (на 1 мм<sup>2</sup>) *Foxp3*<sup>+</sup>-клітин окремих класів і концентрація в них *Foxp3* в корковому плато і м'якотних тяжках БЛВ у 1-міс (А, С, Е) і 6-міс (В, D, F) нащадків щурів з ЕГД та після введення інсуліну.

\* —  $p < 0.05$  у порівнянні з контролем, # —  $p < 0.05$  у порівнянні з ЕГД.

Аналіз серійних зрізів брижових лімфатичних вузлів нащадків контрольних щурів лінії Wistar та нащадків щурів з ЕГД, попередньо інкубованих з АТ до *Foxp3* показав наступне: сумарна щільність *Foxp3*<sup>+</sup>-лімфоцитів у корковому плато групи контролю становила  $44 \pm 4$  на 1 мм<sup>2</sup>, а у нащадків щурів з ЕГД —  $19 \pm 3$  на 1 мм<sup>2</sup>, що на 57% нижче (рис. 4 А).

Це зниження у віці одного місяця відбулося за рахунок усіх підкласів лімфоїдних клітин: найбільш значуще знизилась кількість лімфобластів — на 78%, середніх на 55% та малих лімфоцитів на 46% (рис. 5 А, С, Е). Що стосується концентрації

транскрипційного фактора, то вона достовірно знизилась в усіх підкласах лімфоцитів: лімфобласти — на 62%, середні лімфоцити — на 64% та малі лімфоцити — на 55%. У віці 6 місяців тенденція по зниженню сумарної щільності зберігалась: спостерігалось зниження її до  $18 \pm 2$  на 1 мм<sup>2</sup> проти  $39 \pm 3$  на 1 мм<sup>2</sup> (на 54%,  $p < 0,05$ , рис. 4 В), переважно за рахунок середніх та малих лімфоцитів. Але у 6-місячних щурят з ЕГД не зафіксовано достовірних відмінностей концентрації транскрипційного фактору *Foxp3* від контрольної групи (див. рис. 5 В, D, F). У мозкових тяжках сумарна щільність *Foxp3*<sup>+</sup>-лімфоцитів у на-

щадків щурів з ЕГД знижувалась на 76 % ( $p < 0,05$ ) у віці 1 місяця і на 64 % ( $p < 0,05$ ) у віці 6 місяців (див. рис. 4 А, В), це зниження спостерігалось в усіх підкласах лімфоцитів. Концентрація Foxp3 достовірно змінилась лише у категорії малих лімфоцитів – зросла в обох вікових групах (див. рис. 5 Е, F). У 1-місячних нащадків щурів з ЕГД, які отримували пероральний інсулін, сумарна щільність Foxp3<sup>+</sup>-клітин в корковому плато достовірно не змінилась, а у 6-місячних — спостерігалось її підвищення в 2,2 рази ( $p < 0,05$ ), в м'якотних тяжках цей показник зростав у 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) у 1-місячних і в 2,6 разів ( $p < 0,05$ ) у 6-місячних щурят (див. рис. 4 А, В) за рахунок підвищення ЩП всіх класів Т-регуляторних лимфоцитів (див. рис. 5 А–F).

Становлення ПІТ може відбуватися системно після надходження антигенів з їжею, але немає ніяких підстав сумніватися в тому, що це відбувається в основному в межах локальної імунної системи слизової оболонки. БЛВ — це основне місце для індукції оральної толерантності (ОТ) серед інших лімфоїдних тканин. Презентація харчових антигенів

відбувається саме в БЛВ, а не пейєрових бляшках (ПБ) та дрібних лімфоїдних структурах кишкової стінки [11]. ОТ не може бути індуквана у мишей, позбавлених БЛВ, але це не впливає на тварин, в яких було видалено ПБ [12]. Крім того, було показано, що дендритні клітини (ДК) стабільно мігрували з кишкового епітелію і ПБ в БЛВ, так що є чіткий механізм, згідно з яким антиген з поверхні епітелію шлунково-кишкового тракту доставляється в БЛВ, де відбувається Т-клітинне становлення імунної толерантності [13]. Найбільш показовим доказом є дослідження Worbs та ін. (2006), які демонструють, що у мишей БЛВ є обов'язковими і єдиними місцями індукції оральної толерантності [14]. Зокрема, проліферація Т-лімфоцитів з трансгенним Т-клітинним рецептором після орального введення антигену спостерігається вже через 2 дні в БЛВ, але не раніше 4-го дня в периферичних лімфатичних вузлах мишей. Використання препарату FTY720 (блокатор еміграції лімфоцитів з ЛВ) або хірургічне видалення БЛВ

порушувало цей процес. Автори використовували дві експериментальні системи, щоб показати, що антигеннавантажені ДК, мігруючи з кишкової стінки до БЛВ можуть викликати толерантність БЛВ-резидентних Т-клітин. Перша: тварина з пересадженим кишківником, в якому кровоносні судини анастомозовані з господарем, а лімфатична система відділена. Пероральне введення білка активувало Т-клітини тільки в господаря, а не в трансплантованих БЛВ, які необхідно було стимулювати. Друга: миші, дефіцитні по хемокіновим рецепторам CCR7, що порушувало міграцію ДК в БЛВ. У цієї групи були відсутні, як Т-клітинна стимуляція, так і функціональна оральна толерантність. Ці експерименти демонструють, що ОТ генерується виключно в БЛВ з антигенами, які транспортуються ДК з поверхні кишківника через аферентні лімфатичні судини.

З іншого боку, клінічним проявам ЦД1 передують поява аутоантитіл до різних острівцевих аутоантигенів, демонструючи втрату імунологічної толерантності до бета-клітин. Розвиток ЦД1 у осіб з множинними острівцевими аутоантитілами практично неминучий, це додатково збільшує інтерес до спроб втрутитися в процес хвороби до розвитку гіперглікемії. Більшість досліджень, в процесі яких були проведені спроби індукувати ОТ до інсуліну охоплювали пацієнтів з нещодавно виявленим ЦД1 (як правило, протягом 6 тижнів від постановки діагнозу), мали вельми обмежений успіх [15]. Цей результат можна частково пояснити стадією захворювання і прогресуючою втратою бета-клітин, на додаток до поганого контролю глікемії і метаболічного стресу бета-клітин під впливом запалення. На жаль, кілька спроб запобігти ЦД1 за допомогою імунотерапії у серопозитивних осіб, схильних до ризику захворювання не увінчалися успіхом [16]. На наш погляд, існують кілька пояснень цих невдач, в тому числі тип лікарського засобу або острівцевих аутоантигенів, дозування і спосіб введення. Але найбільш привабливим і простим рішенням імовірно може бути первинна профілактика — до виникнення сероконверсії, саме тому ми вибрали такий шлях. Правильність такого підходу підтверджується і попередні-

ми результатами дослідження E. Vonifacio et al. (2015), які провели подвійне сліпе, плацебо-контрольоване, дозозалежне, клінічне експериментальне дослідження з метою оцінки імунної відповіді і побічних ефектів, пов'язаних з перорально введеним інсуліном у здорових, аутоантитіл-негативних дітей, з генетичним ризиком розвитку ЦД1 [17]. Цей метод виявився безпечним, без будь-яких вагомих побічних ефектів, пов'язаних з лікуванням. Не було зафіксовано жодного епізоду гіпоглікемії (незважаючи на щоденну дозу інсуліну до 67,5 мг), алергічних реакцій або небажаної індукції аутоімунітету до острівців. Замість того, спостерігалися CD4<sup>+</sup>-Т-клітинні проліферативні реакції на інсулін Т-регуляторного типу, що під-

тверджувалося транскриптомним аналізом клонових CD4 Т-лімфоцитів, що реагують на інсулін або проінсулін і знаходженням Foxp3 [18]. Використання слизової оболонки є привабливим шляхом лікування для введення антигенів як толерогенів, особливо у молодих і здорових дітей. У тваринних моделях, оральне або інтраназальне введення антигену також може викликати специфічне імунне регулювання толерогенного напрямку [19]. Наші результати також підтверджуються даними про те, що зниження рівня експресії мРНК *Deaf1* в умовах стрептозотоцин-індукованого діабету інгібує диференціювання Foxp3<sup>+</sup>-регуляторних Т-клітин в панкреатичних лімфатичних вузлах щурів [20].

## ВИСНОВКИ

1. На нашу думку, можливо виділити декілька ключових механізмів порушень формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД (рис. 6).
2. Транскрипційна репресія гена *Aire*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, порушу-

ють ектопічну транскрипцію в БЛВ панкреатичних антигенів; зниження рівня мРНК *Foxp3* і кількості Т-регуляторних клітин призводить до дефіциту супресорної сигналізації, що підтверджується також пригніченням експресії генів супресорного цитокіну



Рис. 6. Можливі механізми порушень формування периферичної імунологічної толерантності до панкреатичних антигенів в БЛВ у нащадків щурів з ЕГД.



IL10 та негативної коstimуляторної молекули Cтla4.  
3. Пероральне введення інсуліну в перші 2 тижні нівелювало вищезначені зміни. Воно викликало транскрипцій-

ну активацію генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Cтla4* і *Il-10*, збільшувало кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин в БЛВ.

## ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Metzger T, Anderson M. *Immunol Rev* 2011; 241(1):89-103.
2. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:2458-2463.
3. Cohen J, Tewalt E, Rouhani S. *PLoS ONE* 2014; 9(2):doi: 10.1371/journal.pone.0087740.
4. Yip L, Su L, Sheng D, et al. *Nat Immunol* 2009; 10:1026-1033.
5. Shevach E, Thornton A. *Immunol Rev* 2014; 259(1):88-102.
6. Wang S, Gao X, Shen G, et al. *Sci Rep* 2016:doi:10.1038/srep24249.
7. Walker LS, Sansom DM. *Trends Immunol* 2015; 36(2):63-70.
8. Hammerschmidt S, Ahrendt M, Bode U, et al. *J Exp Med* 2008; 205:2483-2490.
9. Yang S, Fujikado N, Kolodin D, et al. *Science* 2015; 348(6234):589-594.
10. Macpherson A, Smith K. *J Exp Med* 2006; 203(3):497-500.
11. Kunkel D, Kirchoff D, Nishikawa S, et al. *Eur J Immunol* 2003; 33:1292-1301.
12. Spahn TW, Weiner HL, Rennert PD, et al. *Eur J Immunol* 2002; 32:1109-1113.
13. Huang FP, Platt N, Wykes M, et al. *J Exp Med* 2000; 191:435-444.
14. Worbs T, Boke U., Yan S, et al. *J Exp Med* 2006; 203:519-527.
15. Roep BO, Tree TI. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:229-242.
16. Gale EA, Emmett PJ, Collier CL, et al. *Lancet* 2004; 363:925-931.
17. Bonifacio E, Ziegler AG, Klingensmith G, et al. *JAMA* 2015; 313(15):1541-1549.
18. Roep BO. *Nat Rev Endocrinology* 2015; 11:451-452.
19. Zhang J, Davidson L, Eisenbarth G, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10252-10256.
20. Kamyshny A, Putilin D, Kamyshna V. *Mediterranean J Biosci* 2015; 1(1):20-26.

### 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

Прозорова Т. М., Камишний О. М.

Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя  
alexkamyshny@yandex.ru

За допомогою молекулярно-генетичних методів досліджували рівень експресії мРНК генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Cтla4* і *Il-10* у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом (ЕГД) і в умовах формування оральної толерантності до інсуліну. Для визначення рівня мРНК досліджуваних генів проводили ЗТ-ПЦР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). У нащадків щурів з ЕГД спостерігалися такі порушення імунотолерантності: репресія гена *AIRE*, зниження рівня мРНК *Deaf1*, транскрипційного фактору *Foxp3*. Знижувалося кількість Т-регуляторних клітин, що підтверджувалося пригніченням експресії генів супресорного цитокіну *Il-10* і негативної коstimуляторної молекули *Cтla4*. Пероральне введення інсуліну в перші 2 тижні нівелювало ці зміни. Воно викликало транскрипційну активацію генів *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Cтla4* і *Il-10*, збільшувало кількість Foxp3<sup>+</sup>-клітин в БЛВ.

К л ю ч о в і с л о в а: експериментальний гестаційний діабет, брижові лімфатичні вузли, *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*.

**ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК ГЕНОВ *AIRE*, *DEAF1*, *FOXP3*, *CTLA4* И *IL-10* В БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ У ПОТОМКОВ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ GESTАЦИОННЫМ ДИАБЕТОМ И В УСЛОВИЯХ ФОРМИРОВАНИЯ ОРАЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ**

Прозорова Т. М., Камышный А. М.

*Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье  
alekamyshny@yandex.ru*

С помощью молекулярно-генетических методов исследовали уровень экспрессии мРНК генов *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* и *Il-10* у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД) и в условиях формирования оральной толерантности к инсулину. Для определения уровня мРНК исследуемых генов проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). У потомков крыс с ЭГД наблюдались такие нарушения иммуноtolерантности: репрессия гена *AIRE*, снижение уровня мРНК *Deaf1*, транскрипционного фактора *Foxp3*. Снижалось количество Т-регуляторных клеток, что подтверждалось угнетением экспрессии генов супрессорного цитокина *Il-10* и негативной костимуляторной молекулы *Ctla4*. Пероральное введение инсулина в первые 2 недели нивелировало эти изменения. Оно вызывало транскрипционную активацию генов *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* и *Il-10*, увеличивало количество *Foxp3*<sup>+</sup>-клеток в БЛУ.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** экспериментальный гестационный диабет, брыжеечные лимфатические узлы, *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*.

**CHANGES OF mRNA GENE EXPRESSION LEVEL OF *AIRE*, *DEAF1*, *FOXP3*, *CTLA4* AND *IL-10* IN THE OFFSPRING OF RATS WITH EXPERIMENTAL GESTATIONAL DIABETES AND IN CONDITIONS OF INSULIN ORAL TOLERANCE FORMATION**

T. M. Prozorova, O. M. Kamyshnyy

*Zaporozhye state medical university, Zaporozhye  
alekamyshny@yandex.ru*

Using molecular genetic and immunofluorescence techniques it was investigated the mRNA gene expression level of *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* and *Il-10* in the offspring of rats with experimental gestational diabetes and in conditions of insulin oral tolerance formation. To determine the level of mRNA it was studied gene RT-PCR and was performed in real time thermocycler CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», USA). It was observed such violations of immunotolerance: *AIRE* gene repression, reduced mRNA levels of *Deaf1* and the transcription factor *Foxp3*. Numbers of T-regulatory cells were decreased, which was confirmed by inhibition of gene expression cytokine *Il-10* and the negative *Ctla4* costimulatory molecule. Oral injection of insulin during first 2 weeks compensated these changes. It caused transcriptional activation of the gene *AIRE*, *Deaf1*, *Foxp3*, *Ctla4* and *Il-10*, increased the number of *Foxp3*<sup>+</sup> cells in mesenteric lymph nodes.

**K e y w o r d s:** experimental gestational diabetes, mesenteric lymph nodes, *Aire*, *Deaf1*, *Foxp3*.