

Розподіл FOXP3⁺- та RORγt⁺-лімфоцитів у кишковоасоційованій лімфоїдній тканині щурів при цукровому діабеті та введенні неселективних блокаторів фактора некрозу пухлин α

А.С. Деген, О.М. Камишний

Запорізький державний медичний університет; e-mail: annadegenjena@gmail.com

Досліджували вплив експериментального цукрового діабету на інтенсивність експресії транскрипційних факторів FOXP3 та RORγt імунними клітинами клубової кишки. Для визначення FOXP3⁺-та RORγt⁺-клітин було застосовано метод непрямої імуофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл (МКАТ) до FOXP3 та RORγt щура. Встановлено, що розвиток діабету супроводжувався збільшенням кількості RORγt⁺-клітин у лімфоїдних структурах кишковоасоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) на 46–75% та зменшенням кількості FOXP3⁺-лімфоцитів на 22–46%, а також призводив переважно до зростання концентрації RORγt та зниження FOXP3 в імунопозитивних клітинах. Введення пентоксифіліну тваринам з діабетом призводило до зниження кількості RORγt⁺-клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) на 18–32% та в 1,5 – 2,0 раза в субепітеліальній зоні ізольованих лімфоїдних вузликів (ІЛВ), кількість Т-регуляторних лімфоцитів (Treg) в обох морфофункціональних зонах зростала на 47–74% тільки до 4-го тижня розвитку патології. Концентрація Foxp3 збільшувалася на 2-й тиждень розвитку діабету, а RORγt переважно демонструвала динаміку до зниження. Співвідношення кількості клітин Treg/Th17 при розвитку діабету мало тенденцію до зниження в обох морфофункціональних зонах протягом усього періоду досліджень (у ВПСОВ та ІЛВ на 21–43 і 68% відповідно), введення пентоксифіліну призводило до односпрямованої його зміни в напрямку зростання у ВПСОВ в 2,4 раза на 4-й тиждень, а в ІЛВ в 1,5–2,1 раза протягом усього періоду спостереження. Ключові слова: діабет; FOXP3; RORγt; кишковоасоційована лімфоїдна тканина.

ВСТУП

Нині особливу увагу в прогресуванні аутоімунних захворювань приділяють адаптивній імунній відповіді. Важливе значення в розвитку цукрового діабету 1-го типу (ЦД 1-го типу) у людини та його експериментальних моделей [1] має баланс між про- (Th17 або Т-хелперами 17-го типу) та протизапальними (Treg або Т-регуляторними клітинами) субпопуляціями Т-лімфоцитів, що є необхідним для підтримання імунологічної толерантності та запобігання старту аутоімунної патології, зокрема ЦД 1-го типу.

Центральна роль у диференціюванні Treg відведена гену Foxp3, що кодує відпо-

© А.С. Деген, О.М. Камишний

відний транскрипційний фактор (білок скурфін). Досить активно вивчалась їх критична значущість у розвитку та прогресії аутоімунних захворювань [2]. У мишей лінії NOD виснаження субпопуляції Treg прискорює розвиток ЦД 1-го типу [3, 4]. Більш пізні дослідження свідчать, що прогресування останнього в цій моделі діабету пов'язане зі зниженням кількості та функціональної активності Treg та дефектної продукції інтерлейкіну-2 (ІЛ-2) ефекторними Т-клітинами [57]. Прозапальні Th17 у процесі диференціювання залежать від стабільної продукції транскрипційного фактора RORγt.

Відомо, що Т-клітини, ізольовані від

мишей з нокаутом RORγt^{-/-}, мають значно знижену здатність до диференціювання в напрямку Th17. Екзогенна експресія RORγt в Th-клітинах значно підсилює продукцію цитокінів IL-17 та IL-23R за відсутності стабільного індукуючого сигналу [8]. Також важливе значення в розвитку інсуліту має гіперпродукція прозапальних цитокінів і передусім фактора некрозу пухлин (ФНП α), одним з головних джерел якого є клітини кишковоасоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) – макрофаги та активовані Т-лімфоцити [9]. ФНП α бере участь в ініціації та стабілізації запалення і пов'язаний з такими аутоімунними патологіями, як хвороба Крона, ЦД 1-го типу та ревматоїдний артрит. У пацієнтів з ревматоїдним артритом він інгібує регуляторну функцію CD4⁺CD25^{hi} Treg за рахунок здатності впливати на експресію Foxp3 [10]. Анти-ФНП α -терапія збільшує кількість та функціональну активність Treg у пацієнтів з ЦД 1-го типу, хворобою Крона та ревматоїдним артритом, а також у тварин з експериментальними моделями цих захворювань [10, 11].

Метою нашої роботи було вивчення особливостей експресії FOXP3 та RORγt лімфоцитами КАЛТ при експериментальному стрептозотиніндукованому ЦД та після введення неселективного блокатора ФНП α пентоксифіліну.

МЕТОДИКА

Дослідження виконали на 80 самцях щурів лінії Вістар, яких поділили на 5 груп: контрольну і 4 дослідні. До 1-ї контрольної групи ввійшли тварини, яким одноразово внутрішньоочеревинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5). Щурам дослідних груп моделювали стрептозотиніндукований діабет у продовж 14 і 28 діб (3-тя і 4-та групи). Тваринам з діабетом (14 і 28 діб), яким внутрішньошлунково щоденно протягом 2 і 4 тиж відповідно вводили пентоксифілін у дозі 9 мг/кг, починаючи з 1-го дня індукції

діабету склали 4-ту і 5-ту групи відповідно. Ін'єкцію стрептозотину («Sigma Chemical», США) робили щурам внутрішньоочеревинно в дозі 50 мг/кг, розчиненої в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5) безпосередньо перед введенням. Час, що минув з дня індукції діабету, надалі інтерпретували як тривалість перебігу хвороби. Тварин отримали з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (Київ). Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Рівень глікемії вимірювали через 6 год з моменту останнього прийому їжі глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу «BIONIME Rightest™ GM 110» (Швейцарія) через 12 год і на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 і 28-му добу після ін'єкції стрептозотину. На 3-тю добу після введення стрептозотину для наступних досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії натще >8,0 ммоль/л.

Структуру популяції FOXP3⁺- та RORγt⁺-клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і результатів їх морфо- і денситометричних характеристик. Для дослідження на ротаційному мікротомі Microm HR-360 («Microm», Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, які потім депарафінували в ксилолі, регідували в низхідних концентраціях етанолу (100, 96, 70%), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) і фарбували з первинними кролячими моноклональними антитілами (МКАТ) до транскрипційного фактора RORγt і мишачими МКАТ до FOXP3 щура («Santa Cruz Biotechnology», США) протягом 18 год у вологій камері при 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хв (37°C) з вторинними антитілами до повної молекули імуноглобуліну G (IgG) кролика чи миші відповідно («Santa Cruz Biotechnology», США),

кон'югованими з FITC. Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і поміщали в суміш гліцерину і фосфатного буфера (9:1) для люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми ImageJ («NIH», США). Зображення, отримане на мікроскопі PrimoStar («Zeiss», Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (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), негайно вводили в комп'ютер. В автоматичному режимі визначали ділянки зі статистично значущою флуоресценцією, характерною для клітин, які експресують ROR γ t та FOXP3. Обчислювали морфо- і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. При фарбуванні МКАТ досліджували ROR γ t⁺ та FOXP3⁺-клітини, розташовані у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) і в субепітеліальній зоні ізольованих лімфоїдних вузликів (ІЛВ), які є ефекторними та індуктивними зонами імунної відповіді в КАЛТ відповідно.

Всі отримані експериментальні результати обробляли на персональному комп'ютері за допомогою прикладних і статистичних програм EXCEL пакета MS Office 2010 («Microsoft Corp.», США), Statistica 13 («StatSoft», JPZ8041382130ARCN10-J). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення достовірності різниць результатів досліджень у дослідних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт t Стьюдента. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали на рівні P < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток діабету супроводжувався зниженням сумарної щільності популяції FOXP3⁺-клітин

у ВПСОВ на 22% (P < 0,05) та на 42–46% (P < 0,05) у субепітеліальній зоні ІЛВ переважно за рахунок зменшення кількості FOXP3⁺-лімфобластів. Сумарна щільність ROR γ t⁺-клітин односпрямовано збільшувалась у ВПСОВ (на 13%; P < 0,05) уже на 14-ту добу розвитку патології, а на 28-му добу цей процес був ще більш інтенсивним (на 46 %; P < 0,05). Така сама динаміка спостерігалась і в субепітеліальній зоні ІЛВ. На 14-ту і на 28-му добу розвитку діабету цей показник збільшився на 75 і 66% (P < 0,05) відповідно. Ці зміни були спричинені переважним збільшенням кількості ROR γ t⁺-лімфобластів (рис. 1).

Вимірювання інтенсивності флуоресценції ROR γ t⁺- та FOXP3⁺-клітин показало вірогідне зниження концентрації FOXP3⁺ у лімфобластах в ІЛВ та FOXP3⁺-середніх лімфоцитів у ВПСОВ на 2-му тижні розвитку патології. Зміни концентрації транскрипційного фактора ROR γ t були різноспрямованими: достовірне зниження у ROR γ t⁺-середніх лімфоцитах та збільшення у ROR γ t⁺-малих лімфоцитах у ВПСОВ, а в субепітеліальній зоні ІЛВ збільшення стосувалося лише ROR γ t⁺-лімфобластів порівняно з контролем.

Сумарна щільність популяції FOXP3⁺-клітин на фоні введення пентоксифіліну збільшувалась на 28-му добу розвитку патології в обох морфофункціональних зонах – на 74 і на 47% (P < 0,05) у ВПСОВ та в субепітеліальній зоні ІЛВ відповідно (див. рис. 1, г). Ці зміни зумовлені збільшенням кількості всіх морфологічних груп FOXP3⁺-клітин у ВПСОВ, а в субепітеліальній зоні ІЛВ – переважно за рахунок FOXP3⁺-лімфобластів. Введення тваринам з діабетом пентоксифіліну спричинювало зниження сумарної щільності популяції ROR γ t⁺-клітин у ВПСОВ як на 14-ту, так і на 28-му добу розвитку ЦД (на 18 і 32% відповідно, P < 0,05). Ця динаміка зберігалась у субепітеліальній зоні ІЛВ (на 36% та в 2,1 раза відповідно, P < 0,05) щодо значень у тварин з діабетом,

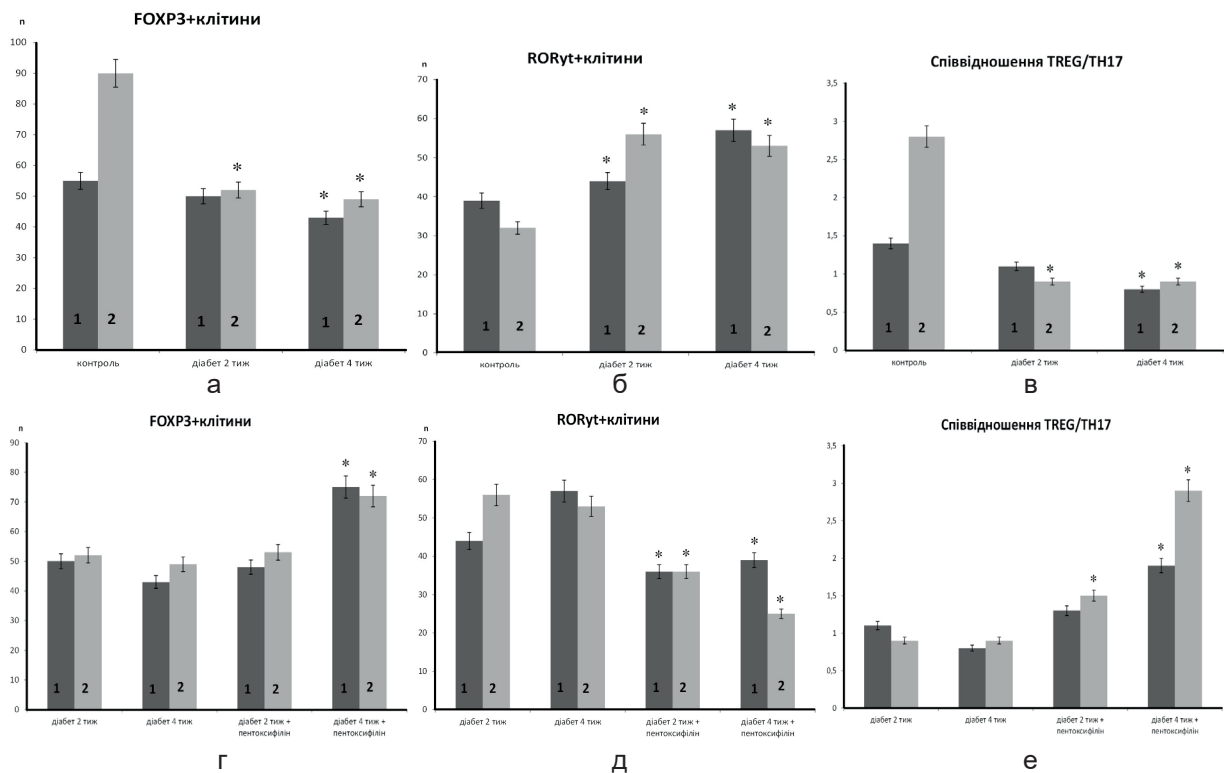


Рис. 1. Сумарна щільність (на 1 мм²) FOXP3⁺- та RORγt⁺-клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (1) та субепітеліальній зоні ізованих лімфоїдних вузликів (2) при розвитку діабету та введення пентоксифіліну тваринам з діабетом. *P < 0,05

яким пентоксифілін не вводили (див. рис. 1, д). Зазначені зміни супроводжувались пропорційним зниженням кількості всіх морфологічних форм RORγt⁺-клітин. Введення пентоксифіліну відобразилося і на змінах концентрації FOXP3: зниження у FOXP3⁺-лімфоцитах на 28-му добу у ВПСОВ, збільшення у FOXP3⁺-лімфоцитах та FOXP3⁺-середніх лімфоцитах на 14-ту добу порівняно зі значеннями у тварин з діабетом, яким не вводили цей блокатор. Концентрація RORγt знижувалася у RORγt⁺-лімфоцитах на 28-му добу розвитку патології у ВПСОВ та на 14-ту добу в ІЛВ, збільшувалася у RORγt⁺-середніх лімфоцитах у ВПСОВ на 28-му добу (див. рис. 2).

Співвідношення кількості клітин Treg/Th17 на 4-му тижні розвитку ЦД у ВПСОВ знижувалося на 46% (P < 0,05), а в субепітеліальній зоні ІЛВ протягом всього періоду

досліджень також демонструвало динаміку до зниження (на 68%, P < 0,05) порівняно з контрольною групою тварин (рис. 1; в). Введення пентоксифіліну призводило до зростання співвідношення цього показника в усіх морфофункціональних зонах – у ВПСОВ на 15% (P < 0,05) на 14-ту добу та в 2,4 раза (P < 0,05) на 28-му добу розвитку патології, а в субепітеліальній зоні ІЛВ на 67% (P < 0,05) на 2-му тижні та в 2,1 раза (P < 0,05) на 4-му тижні розвитку ЦД порівняно з тваринами з діабетом (див. рис. 1, е).

Отримані результати збігаються з відомостями фахової літератури. Деякі дослідники зауважували, що у мишей, дефіцитних за RORγt, спостерігалися дефекти в розвитку пейєрових бляшок і лімфатичних вузлів. Пізніше Ivanov і співавт. [12] доповіли про необхідність RORγt для диференціювання наївних CD4⁺ Т-клітин у прозапальні Th17.

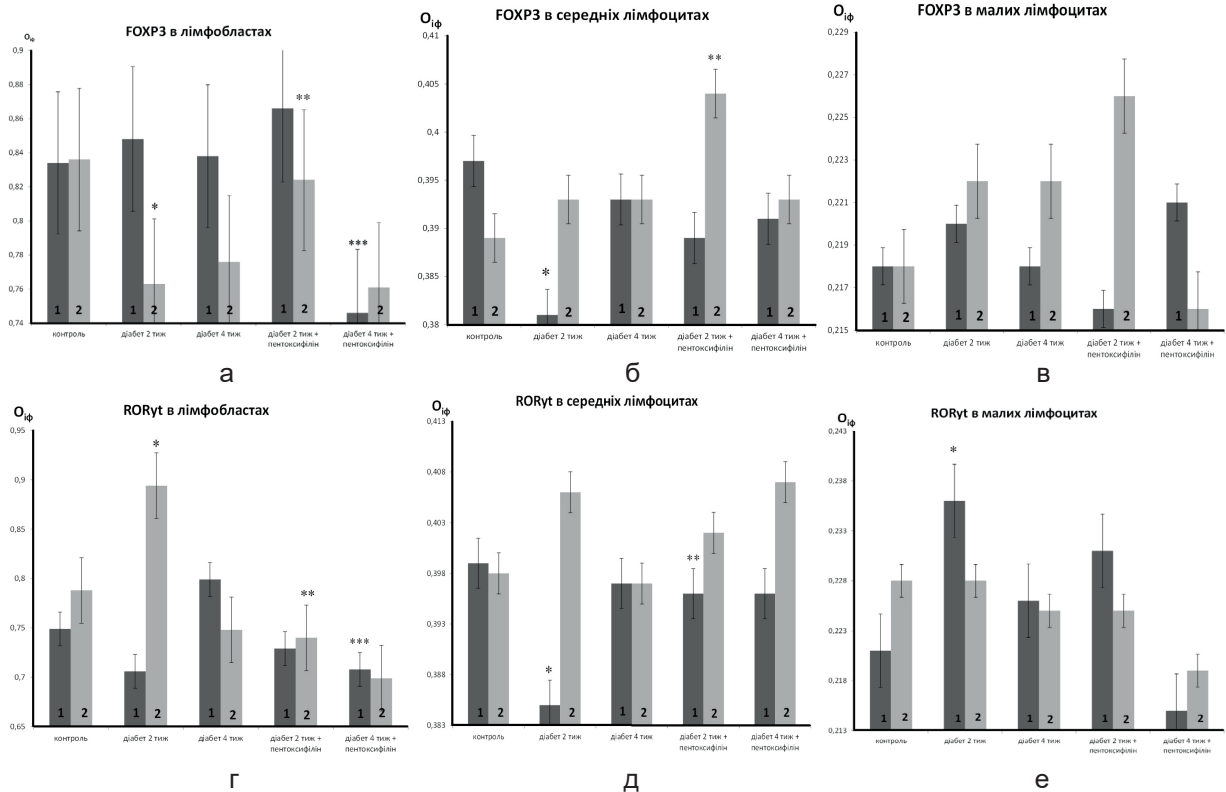


Рис. 2. Концентрація білків FOXP3 та RORγt (O_{if}). * $P < 0,05$ щодо контролю, ** $P < 0,05$ щодо значень у тварин з діабетом на 14-ту добу, *** $P < 0,05$ щодо значень у тварин з діабетом на 28-му добу

У лімфоїдних вузлах кишечника тварин, дефіцитних за RORγt, кількість Th17-лімфоцитів знижена майже в 10 разів порівняно з мишами дикого типу. Shao і співавт. [13] продемонстрували, що ІЛ-17 надмірно експресується в підшлунковій залозі мишей лінії NOD, а їх нейтралізація запобігала розвитку діабету навіть за умов ініціалізації інсуліту. В свою чергу інгібування Th17 призводило до зниження інфільтрації острівців Т-клітинами і пропорційно збільшувало кількість FOXP3⁺-клітин навколо панкреатичних острівців. В іншій моделі аутоімунного діабету у мишей лінії BDC2.5 Th17, які експресують трансгенний специфічний до клітин острівців Т-клітинний рецептор (TCR), індукували діабет у реципієнтів NOD/SCID. У цій моделі Th17, перетворені в Th1-подібні клітини, секретують інтерферон γ (ІНФγ), а анти-ІЛ-17

МКАТ не запобігали розвитку патології. Це свідчить, що зміщення диференціювання Th17 в Th1 перетворює ІЛ-17-продукуючі клітини в патогенні за умов розвитку аутоімунного захворювання [14]. Посилення регуляції ІЛ-17, як виявилось, пов'язано з посиленою експресією транскрипційного фактора RORC2/RORγt та ІЛ-22, а також зниженою експресією FOXP3, що передбачає дисрегуляцію балансу між Th17 та Treg [14]. Ryba-Stanislawowska і співавт. [15] відмічали, що зниження кількості Treg та/або збільшення Th17 може призвести до розвитку місцевого запалення, а отже прискорити появу ускладнень при діабеті.

Спостереження, проведені на експериментальних моделях показали, що CD4⁺ CD25⁺ Treg відіграють ключову роль у підтриманні імунного гомеостазу, регулюючи запальні реакції проти інфекційних агентів

та запобігаючи аутоімунній деструкції. Один із яскравих прикладів розвиток діабету у NOD-мишей протягом декількох днів на фоні елімінації Treg. У мишей зі стрептозотоциніндукованим діабетом функціональна активність CD4⁺CD25⁺ Treg була безпосередньо зміненою, а не чутливість ефекторних клітин до регуляції Treg, що зумовлює імунні порушення при діабеті. Пул FOXP3⁺ Treg включає як природні nTreg, що розвиваються в тимусі, так і адаптивні (індуцибельні) aTreg (iTreg), диференційовані на периферії, головним чином у КАЛТ [16]. При цьому в деяких працях було повідомлено про функціонально дефектні nTreg-клітини [17], а ефекторні Т-клітини при ЦД 1-го типу також демонстрували стійкість до супресії nTreg [18]. Отже, неефективні nTreg і більш потужні ефекторні Т-лімфоцити можуть зумовлювати втрату контролю за аутоімунними реакціями ЦД 1-го типу. В основі проблеми дефектності функцій nTreg при ЦД 1-го типу лежить те, що nTreg властива залежність їх гомеостазу та функцій від ІЛ-2 [19]. Крім того, nTreg можуть бути перетворені в діабетогенні ефекторні клітини, що ймовірно стане вирішальним фактором на останніх етапах запального процесу, яке призводить до старту діабету. Це пояснює, чому невелика кількість nTreg виявляється в панкреатичних острівцях при діабеті 1-го типу, що розпочався нещодавно [20]. aTreg були менш досліджені як можлива ланка в розвитку аутоімунних захворювань, тим не менш зміна їх числа та функціональної активності може керувати аутоімунними реакціями при діабеті, що знайшло підтвердження і в наших результатах.

Важливе значення в розвитку діабету має виявлений дисбаланс кількості Th17 та Treg у КАЛТ. Ці субпопуляції Т-клітин здатні взаєморегулюватися за участю декількох позитивних та негативних механізмів. Баланс між експресією ключових транскрипційних факторів RORγt та FOXP3 відіграє критичну роль у визначенні напрямку диференціювання наївних CD4⁺ Т-лімфоцитів. Регуляція експресії

FOXP3, яка відбувається через трансформуючий ростовий фактор β (TGFβ) та ІЛ-6, має вкрай важливе значення у виборі напрямку TregTh17 [21]. Під дією ІЛ-6 та TGFβ Th диференціюються в бік Th17, при цьому активуються гени, що кодують ІЛ-21, RORα і RORγt, ІЛ-17, ІЛ-22 і ІЛ23R. У разі впливу тільки TGFβ відбувається індукція FOXP3 та диференціювання в напрямку Treg і так зрушується баланс RORγt/ FOXP3 у бік FOXP3 та диференціювання Treg [22]. Додавання ІЛ-6 та ІЛ-21 здатне викликати інгібування FOXP3 та активацію експресії RORα та RORγt, зрушуючи баланс RORγt/ FOXP3 у бік диференціювання Th17.

Не викликає сумнівів факт, що одну з ключових ролей у загибелі β-клітин при ЦД 1-го типу відіграють прозапальні цитокіни, і передусім ФНПа [9]. Низка досліджень показали, що миші лінії NOD, дефіцитні за TNFR1, були стійкими до розвитку діабету та відрізнялись інсуліном, який має найлегший перебіг, а також у них було виявлено збільшення кількості CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg з посиленою супресорною активністю. На підставі цих досліджень висунуто гіпотезу, що блокада ФНП-сигналіну може бути причиною активізації функцій Treg та супресії ЦД 1-го типу [14].

Одним із перспективних напрямків терапії діабету є використання інгібіторів ФНПа. Було показано, що введення мишам лінії NOD інгібіторів ФНПа в неонатальний період призводить до абсолютного запобігання розвитку патології, а системне призначення нетоксичних доз ФНПа внутрішньоочеревинно від моменту народження до 21–24 дня самицям мишей цієї ж самої лінії призводило до збільшення кількості випадків ЦД 1-го типу з раннім початком. Цікаво, що введення ФНПа в більш пізньому віці призводило до зниження захворюваності на діабет та значної затримки старту захворювання. Ці результати вказують, що ФНПа може здійснювати як позитивне, так і негативне регулювання толерантності пери-

феричних Т-лімфоцитів до антигенів β -клітин острівців залежно від віку мишей лінії NOD, однак механізм, що лежить в основі цих парадоксальних ефектів, залишається невідомим. Разом з цим в деяких працях вказано, що використання МКАТ до ФНПа (Infliximab) призводить до пригнічення експресії ІЛ-21, ІЛ-17А та RORC/ROR γ t в КАЛТ у пацієнтів з хворобою Крона, а полегшення симптомів можливе через регулювання експресії ІЛ-21 та інфільтрації слизової оболонки Th17. У моделей з ревматоїдним артритом на фоні призначення МКАТ до ФНПа спостерігали зниження кількості Th1, Th17, ІНФ γ -продукуючих CD8⁺ Т-клітин, а вміст Treg та ІНФ γ -продукуючих натуральних кілерів (НК-клітин) зростав. Однак, незважаючи на позитивні ефекти, використання МКАТ до ФНПа може призвести до розвитку інфекційної патології (передусім сепсису та пневмонії) та реактивації латентної інфекції (туберкульозу), а також порушувати морфогенез лімфоїдної тканини КАЛТ. Тому інтерес становлять більш «м'які» методи блокади ФНПа за допомогою пентоксифіліну. Цей препарат є інгібітором фосфодіестераз (ІФДЕ), який збільшує вміст цАМФ, пригнічує активацію NF- κ B та транскрипцію гена ФНПа. Одним з позитивних «побічних» ефектів пентоксифіліну є позитивний вплив на мікроциркуляторне русло, що надзвичайно важливо, беручи до уваги кількість супутніх ангіогенних ускладнень у пацієнтів з ЦД 1-го типу. В експерименті продемонстрована здатність пентоксифіліну запобігати розвитку діабету у мишей лінії NOD та знижувати важкість перебігу інсуліту, а ефект зберігався ще протягом 10 тиж після відміни препарату [22].

Отримані нами результати збігаються з літературними даними: ІНФ γ /ФНПа/NO-індукований апоптоз β -клітин послаблюється на фоні використання пентоксифіліну. Visser і співавт. [23] показали, що ефект від введення пентоксифіліну схильним до розвитку діабету Diabetes-prone Bio Breeding

(DP-BB) та резистентним до нього Diabetes-resistant (DR-BB) щурам залежить від строків використання препарату. Так, якщо щури лінії DP-BB отримували препарат протягом 2 міс, то розвиток патології було майже нівельовано, а у щурів лінії DR-BB це викликало лише затримку старту патології. В обох моделях використання пентоксифіліну призводило до інгібування продукції ФНПа та помірного впливу на продукцію ІЛ-10, що свідчить про баланс ІЛ-10/ ФНПа як один з механізмів затримки старту патологічного процесу при ЦД 1-го типу. Дія пентоксифіліну призводила до зниження потреби в інсуліні та пролонгуванні періоду між його введеннями [24].

ВИСНОВКИ

1. Розвиток діабету супроводжувався збільшенням кількості ROR γ t⁺-клітин у лімфоїдних структурах КАЛТ на 46–75% та зменшенням кількості FOXP3⁺-лімфоцитів на 22–46%, а також призводив переважно до збільшення концентрації ROR γ t та зниження концентрації Foxp3 в імунопозитивних клітинах.

2. Введення пентоксифіліну тваринам з діабетом призводило до зниження кількості ROR γ t⁺-клітин у ВПСОВ на 18–32% та в 1,52,0 раза в субепітеліальній зоні ІЛВ, кількість Treg в обох морфофункціональних зонах зростала на 47–74% тільки до 4-го тижня розвитку патології. Концентрація FOXP3 збільшувалася на 2-й тиждень розвитку діабету, а концентрація ROR γ t переважно демонструвала динаміку до зниження.

3. Співвідношення кількості Treg/Th17 при розвитку ЦД демонструвало динаміку до зниження в обох морфофункціональних зонах протягом усього періоду досліджень (у ВПСОВ та в ІЛВ на 21–43 і на 68% відповідно), введення пентоксифіліну призводило до односпрямованої зміни коефіцієнта в напрямку зростання у ВПСОВ в 2,4 раза на 4-му тижні, а в ІЛВ в 1,5–2,1 раза протягом усього періоду спостереження.

Робота є фрагментом НДР «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології», державний реєстраційний номер 0112U005642.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

А.С. Деген, А.М. Камышный

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ FOXP3⁺- И RORγt⁺-ЛИМФОЦИТОВ В КИШЕЧНОАССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ВВЕДЕНИИ НЕСЕЛЕКТИВНЫХ БЛОКАТОРОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ α

Исследовали влияние экспериментального сахарного диабета на интенсивность экспрессии транскрипционных факторов FOXP3 и RORγt иммунными клетками подвздошной кишки. Для определения FOXP3⁺- и RORγt⁺-клеток был использован метод непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (МКАТ) к FOXP3 и RORγt крыс. Установлено, что развитие диабета сопровождается увеличением количества RORγt⁺-клеток в лимфоидных структурах кишечноассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) на 46–75% и уменьшением количества Foxp3⁺-лимфоцитов на 22–46%, а также приводит преимущественно к росту концентрации RORγt и снижению FOXP3 в иммунопозитивных клетках. Введение пентоксифиллина животным с диабетом снижало количество RORγt⁺-клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) на 18–32% и в 1,5 – 2,0 раза в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ), количество Treg в обеих морфофункциональных зонах возрастало на 47–74% только к 4-й неделе развития патологии. При этом концентрация FOXP3 увеличивалась на 2-й неделе развития диабета, а RORγt преимущественно демонстрировала динамику к снижению. Соотношение количества Treg/Th17 при развитии диабета демонстрировало динамику к снижению в обеих морфофункциональных зонах в течение всего периода исследования (в СПСОВ и ИЛФ на 21–43 и 68% соответственно), а введение

пентоксифиллина приводило к однонаправленному его изменению в направлении возрастания в СПСОВ в 2,4 раза на 4-й неделе, а в ИЛФ в 1,5–2,1 раза в течение всего периода наблюдения.

Ключевые слова: диабет; FOXP3; RORγt; кишечноассоциированная лимфоидная ткань.

A.S. Degen, A.M. Kamyshny

STUDING OF DISTRIBUTION OF FOXP3⁺ AND RORγt⁺ LYMPHOCYTES IN GUT-ASSOCIATED LIMPHOID TISSUE OF RATS AT AN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND ADMINISTRATION OF INDIRECT INHIBITORS OF TUMOR NECROSIS FACTOR α

A lot of researches concerning T1DM and its animal models have shown a close connection of autoimmune diabetes development and changes in the intestinal tract, which anticipate appearance of clinical symptoms of the disease. Functional polarization of T-helpers in gut-associated lymphoid tissue plays an important role in an induction of development and progression of T1DM. Of great interest is studying of adaptive immune system, especially a tight regulation of Treg/Th17 ratio, role in diabetes progression. The balance between Treg and Th17 controls inflammation and is responsible for the proper functioning of the immune system. A decrease of Tregs and/or increase of Th17 may induce local inflammation, which in turn may hasten the development of diabetic complications. Pro-inflammatory cytokines, such as TNFα, play one of the most important roles in pathogenesis of T1DM. Indirect inhibitors of their production (for example, pentoxifylline) reduce risk of development of this pathology. The aim of our work was to study the peculiarities of FOXP3 and RORγt transcription factors in gut-associated lymphoid tissues (GULT) in rats with experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus and under pentoxifylline administration. The researchers were made on Wistar rats. For an induction of diabetes streptozotocin was used in a dose of 50 mg/kg. Structure of population of FOXP3⁺ and RORγt⁺-cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to FOXP3 and RORγt of rat. It has been established that diabetes development was accompanied with 46–75 % increase in quantity of RORγt⁺-cells and with 22–46% decrease in quantity of FOXP3⁺-cells, and also leads mainly to growth of RORγt concentration and decrease of FOXP3 concentration in immunopositive cells. Pentoxifylline administration of diabetic animal reduces the quantity of RORγt⁺-cells in mucous membrane of villus by 18–32 % and in subepithelial zone of isolated lymphoid follicle's (ILF) in 1.5–2.0 times. Quantity of Treg in both regions increased on 47–74 % by 4th week of the pathology development only. Thus, concentration of FOXP3 increased on 2nd week of diabetes development, and concentration of RORγt mainly showed dynamics to decrease. Treg/Th17 ratio at the experimental T1DM showed dynamics to decrease in both

morpho-functional regions throughout the research period (in mucous membrane of villus by 21–43 % and in ILF by 68 %). Pentoxifylline administration led to change of the ratio in an increase direction in mucous membrane of villus 2.4 times ($P < 0,05$) on 4th week and in ILF 1.5–2.1 times ($P < 0,05$) throughout the research period. The expression augmentation with FOXP3 and ROR γ t in ileum immunopositive cells can influence the differentiation of subsets of T-helpers and their proinflammatory cytokines production, thus acting as one of triggers of diabetes development and progression.

Key words: diabetes; FOXP3; ROR γ t; gut-associated lymphoid tissue.

Zaporizhzhya State Medical University;
e-mail: annadegenjena@gmail.com

REFERENCES

- Kolesnik Yu.M, Kamyshny AM, Abramov AV. Search for ways to correct thymic dysfunction in rats with experimental diabetes mellitus. *Fiziol Zh.* 2008;54(3): 28-35 [Ukrainian].
- Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:131-61.
- Yadav M, Stephan S, Bluestone JA. Peripherally induced Tregs - role in immune homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol.* 2013;4:232-39.
- Kornete M, Mason E, Piccirillo A. Immune regulation in T1D and T2D: prospective role of Foxp3⁺ Treg cells in disease pathogenesis and treatment. *Front Endocrinol.* 2013;4:76-83.
- Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008;9(3):239-44.
- Tritt M, Sgouroudis E, d'Hennezel E, Albanese A, Piccirillo CA. Functional waning of naturally occurring CD4⁺ regulatory T-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes.* 2008;57(1):113-23.
- Kornete M, Sgouroudis E, Piccirillo CA. ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2012;188(3):1064-74.
- Xuexian OY, Bhanu P, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, et al. Th17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ t. *Immunity.* 2008;28(1):29-39.
- Chee J, Angstedra E, Mariana L. TNF receptor 1 deficiency increases regulatory T cell function in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2011;187(4):1702-12.
- Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach ME, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood.* 2006;108(1):253-61.
- Zhang Q, Cui F, Fang L. TNF- α impairs differentiation and function of TGF- β -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J Mol Cell Biol.* 2013;5(2):85-98.
- Ivanov I, Zhou L, Littman D. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol.* 2007;19(6):409-17.
- Shao S, He F, Yang Y, Yuan G, Zhang M, Yu X. Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell Immunol.* 2012;280(1):16-21.
- Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010;185(3):1959-67.
- Ryba-Stanisławowska M, Skrzypkowska M, Myśliwiec M, Myśliwska J. Loss of the balance between CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells and CD4(+)IL17A(+) Th17 cells in patients with type 1 diabetes. *Hum Immunol.* 2013;74(6):701-7.
- Zhen Y, Sun L, Liu H, Zhao Y. Alterations of peripheral CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T regulatory cells in mice with STZ-induced diabetes. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(1):75-85.
- Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(5):1407-14.
- Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RD, Peakman M, Tree TI. Increased resistance to CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(3):353-9.
- Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* 2009;30(5):616-25.
- Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(2):173-81.
- Weaver C, Harrington L, Mangan P, Gavrieli M, Murphy K. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006;24(6):677-88.
- Liang L, Beshay E, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 1998;47(4):570-5.
- Visser J, Groen H, Klatter F. Timing of pentoxifylline treatment determines its protective effect on diabetes development in the Bio Breeding rat. *Eur J Pharmacol.* 2002;445(1-2):133-40.
- Malekifard F, Delirez N, Hobbenaghi R, Malekinejad H. Immunotherapeutic effects of pentoxifylline in type 1 diabetic mice and its role in the response of T-helper lymphocytes. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(3):247-52.

*Матеріал надійшов
до редакції 11.02.2019*