

**ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА ЕКСПРЕСІЮ
ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ T-bet ТА GATA3 В ЛІМФОЇДНИХ
СТРУКТУРАХ КЛУБОВОЇ КИШКИ ЩУРІВ****Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)**

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

Вступ. Велика кількість досліджень пацієнтів з цукровим діабетом 1 типу (ЦД 1 типу) та тваринних моделей цієї патології показали тісний зв'язок розвитку ЦД 1 типу та змін у кишечнику, що передують прояву клінічних симптомів захворювання [20]. Функціональна поляризація розташованих в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині (КАЛТ) субпопуляцій T-хелперів (Th) відіграє важливу роль в індукції та розвитку ЦД 1 типу як у людини, так і у діабетичних тварин [19]. Основними регуляторами диференціювання Th1 і Th2-клітин є транскрипційні фактори T-bet та GATA-3 [8]. T-bet (T-box expressed in T cells), який кодується геном *Tbx21* є одним з найбільш значущих гравців, що керують транскрипційним контролем імунної відповіді слизових оболонок [16]. T-bet-дефіцитні миші резистентні до експериментальних моделей аутоімунних захворювань, таких як діабет, енцефаломієліт, системна червона вовчанка та коліт, з іншого ж боку – підвищується чутливість до інфекційних захворювань, в тому числі до мікобактеріозів, сальмонельозів, лейшманіозу, трипаносомозу та вірусних інфекцій [12]. В Th1-клітинах, T-bet здатен зв'язуватись з промоторами більше ніж 800 генів, включаючи гени цитокінів, цитокинових рецепторів, інших транскрипційних факторів та гени, що кодуєть протеїни необхідні для клітинного метаболізму та диференціювання. В свою чергу, GATA-3 є ключовим фактором диференціювання Th2-клітин [7]. При кондиціонованому нокауті гена GATA3 послаблено утворення Th2-клітин *in vivo* та *in vitro*, знижена концентрація сироваткових Th2-залежних імунoglobulinів (IgG4 та IgE) і підвищений рівень IgG1, який залежить від вмісту IFN γ (тобто від Th1-клітин).

Зважаючи на таку значущість T-bet та GATA-3 в регулюванні балансу Th1/Th2 метою нашої роботи було вивчити особливості експресії цих транскрипційних факторів в КАЛТ при експериментальному стрептозотоциновому цукровому діабеті (ЕЦД) та після введення пентоксифіліну.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на 80 самцях щурів лінії Wistar. Тварини отримані 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, 1985). Досліджувані тварини були розділені на 5 експериментальні групи: контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН = 4,5) (група 1); щури з 14-денним ЕЦД (група 2); щури з 28-денним ЕЦД (група 3); щури з 14-ти денним (група 4) та з 28-ти денним ЕЦД (група 5), яким в/ш щоденно на протязі відповідно 2 та 4 тижнів вводили пентоксифілін в дозі 9 мг/кг починаючи з 1 дня індукції діабету. Стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг, розчиненої в 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН 4,5) перед самим моментом введення. Час, що минув з дня введення препарату, в подальшому викладі матеріалу інтерпретувався як тривалість перебігу діабету. Визначення концентрації глюкози в крові, яку брали з хвостової вени, проводили глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу «BIONIME Rightest™ GM 110» (Швейцарія) через 12 годин і на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 і 28 добу після ін'єкції STZ. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 3 добу після введення стрептозотоцину для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії натще > 8,0 ммоль/л.

Структуру популяції T-bet⁺ та GATA3⁺-клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів й даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (рН = 7,4) і фарбували з первинними кролячими моноклональними антитілами (МКАТ) до транскрипційних факторів T-bet та GATA3 щура (Santa Cruz Biotechnology, США) протягом 18 годин у вологій камері при T = 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин (T = 37°C) з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), кон'югованими з FITC. Після інкубації зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і укладали в суміш гліцерину і фосфатного буфера

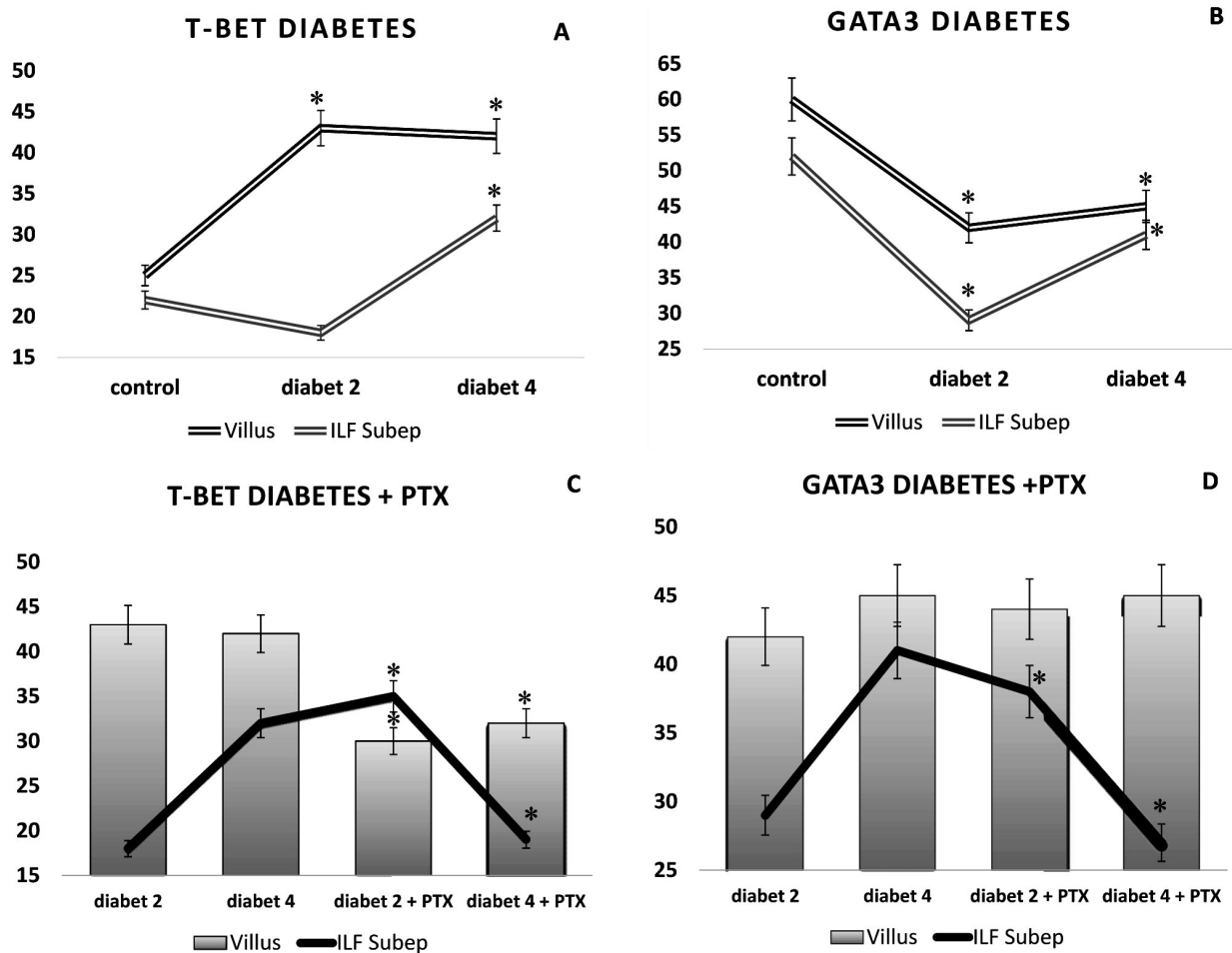


Рис. 1. Сумарна щільність T-bet⁺ та GATA3⁺-клітин у ВПСОВ (villus) та субепітеліальній зоні ІЛВ (ILF Subep) при розвитку діабету (2 і 4 тижня) та введенні пентоксифіліну (PTX) діабетичним тваринам.

(9:1) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали з допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Зображення, що отримується 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 вводилося в комп'ютер. При цьому в автоматичному режимі визначалися області зі статистично значущою флюоресценцією, характерною для клітин, які експресують T-bet та GATA3. Обчислювалися морфометричні і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. При фарбуванні МКАТ досліджували T-bet⁺ та GATA3⁺-клітини, розташовані у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) і в субепітеліальній зоні ізольованих лімфоїдних вузликів (ІЛВ), які є, відповідно, ефекторними та індуктивними зонами імунної відповіді в КАЛТ.

Всі отримані експериментальні дані обробляли на персональному комп'ютері пакетом прикладних і статистичних програм EXCEL з пакету MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6. 0 (Stat-Soft,

2001). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення достовірності різниць результатів досліджень в дослідних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт Стьюдента (t), після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. Розвиток діабету супроводжувався збільшенням сумарної щільності T-bet⁺-позитивних клітин у ВПСОВ (на 72%, p<0,05) на 14-й день розвитку патології зі збереженням динаміки на 28-й день, а в ІЛВ на 45% (p<0,05) тільки на 28 день в порівнянні з контролем (рис. 1 А). Сумарна щільність GATA3⁺-позитивних клітин при розвитку діабету, навпаки, односпрямовано зменшувалася у ВПСОВ на 25-30% (p<0,05) і в ІЛВ на 21-44% (p<0,05) в порівнянні з контролем за рахунок зниження кількості переважно GATA3⁺-лімфобластів та середніх лімфоцитів (рис. 1 В). Вимірювання інтенсивності флюоресценції T-bet⁺- та GATA3⁺-клітин, що відображує концентрацію відповідних транскрипційних факторів, показало достовірне зростання даного параметру у ВПСОВ на

2-й та 4-й тиждень розвитку ЕЦД тільки у T-bet⁺-середніх лімфоцитів в порівнянні з контролем при відсутності змін концентрації GATA3.

Введення РТХ діабетичним тваринам супроводжувалося зменшенням сумарної щільності популяції T-bet⁺-клітин у ВПСОВ як на 14-й, так і на 28-й день розвитку ЕЦД (на 30% та 24% відповідно, $p < 0,05$), проте в субепітеліальній зоні ІЛВ цей показник значно зростає на 14 день розвитку ЕЦД (на 94%, $p < 0,05$), але вже на 28 день – достовірно знижувався (на 41%, $p < 0,05$) у порівнянні з групами діабетичних щурів (рис. 1 С). В той же час, сумарна щільність GATA3⁺-клітин на фоні введення РТХ залишалася стабільною у ВПСОВ, а в ІЛВ також змінювалася різноспрямовано – збільшувалася на 14-й день розвитку патологічного процесу (на 31%, $p < 0,05$) і зменшувалася на 28 день (на 34%, $p < 0,05$) (рис. 1 D). Введення діабетичним тваринам РТХ знайшло відображення у достовірному зниженні концентрації T-bet у T-bet⁺-середніх та T-bet⁺-малих лімфоцитів на 4-й тиждень розвитку ЕЦД при відсутності змін концентрації транскрипційного фактора GATA3 в імунопозитивних клітинах.

Отримані нами результати співпадають з даними багатьох інших досліджень. T-bet є одним з ключових регуляторів утворення Th1 CD4⁺-клітин, тому його роль в розвитку аутоімунної патології вивчалася безпосередньо з моменту відкриття. Перші данні про зв'язок T-bet з розвитком ЦД були отримані у 2004 році Sasaki Y. et al. [17]. В їх дослідженні була запропонована перша ознака зв'язку ЦД 1 типу з поліморфізмом в гені T-bet у населення Японії, а також, що варіації в транскрипційній активності T-bet можуть грати роль в розвитку ЦД 1 типу, можливо через вплив на продукцію IFN γ Th1-клітинами. Проте, регіон 17 хромосоми, в якому локалізований Tbx21 не досліджувався як регіон ризику розвитку ЦД 1 типу [22]. Крім того, в мишиній моделі ЦД 1 типу, T-bet контролює диференціювання аутореактивних CD8⁺ T-клітин в ході розвитку патології. За відсутності T-bet важкість перебігу захворювання значно знижувалася, що корелювало зі зменшенням кількості аутоагресивних CD8⁺ T-клітин та зниженням продукції IFN γ [9]. Спираючись на роль Th1 та Th2 клітин в розвитку ЦД 1 типу, поляризація Th-клітин, які продукують цитокіни, була запропонована як тригер розвитку даної патології. В цьому аспекті було проведено декілька досліджень на людях з ЦД 1 типу на початку захворювання, які показали, що значне зниження функціональної активності Th2-клітин тісно пов'язане зі зниженням продукції IL-4 периферичними мононуклеарами у відповідь на поліклональні активатори, такі як фітогемаглютинін та anti-CD3 антитіла [19]. Здатність Th2-клітин, які інфільтрують панкреатичні островці у діабетичних пацієнтів, продукувати цитокіни значно погіршується, що доведено для IL-4 та IL-10. Відповідно до дослідів, що були проведені на предіабетичних пацієнтах, які мають близьких родичів з даною патологією, та пацієнтах з нещодавно діагностованим ЦД 1 типу, клітинні реакції на глутаматдекарбоксілазу (GAD65)

очевидно зміщені до фенотипу Th1 [10]. Також було повідомлено, що поляризація функцій Th корелює з розвитком захворювання і у схильних до розвитку діабету *NOD* мишей та *BioBreeding (BB)* щурів [6]. Було відмічено, що більш високі значення співвідношення IFN- γ /IL-4 корелюють з деструктивним інсулітом, тоді як нижчі значення – з не деструктивним інсулітом. Нещодавно було продемонстровано, що дисбаланс секреції цитокінів Th1 та Th2 фактично сприяє гендерним відмінностям в розвитку ЦД 1 типу у *NOD* мишей. T-клітини від чутливих до захворювання молодих самок мишей продукують більше IFN- γ (Th1), тоді як T-лімфоцити від резистентних самців демонструють більшу високу IL-4-секрецію [2]. Таким чином, не дивлячись на деяку суперечливість даних, можна зробити висновок, що зменшення експресії гену GATA3, яке супроводжується послабленням диференціювання Th2-клітин і посиленням диференціювання Th1-клітин, сприяє розвитку, принаймні, деяких Th1/Th17-залежних аутоімунних процесів, тоді як посилення його експресії може сприяти розвитку алергічних захворювань. У *NOD* мишей делеція *Irfng* або *Irf12b* (IL12p40) генів, які є критичними для цитокінів Th1, не зменшують вірогідність розвитку аутоімунного діабету. Ці результати припускають, що аутоімунний діабет у *NOD* мишей не є Th1-залежним захворюванням. Однак, Esensten J. et al. (2009) повідомляють, що дефіцит *Tbx21* у *NOD* мишей повністю блокує інсуліт та діабет через дефекти в ініціюванні імунної відповіді проти островців та функціонуванні CD4⁺ ефекторних T-клітин [4].

Одну з найголовніших ролей в імунопатогенезі ЦД 1 типу грають прозапальні цитокіни, перш за все TNF α , одним з основних джерел якого є клітини КАЛТ. Інгібітори TNF α знижують ризик розвитку цукрового діабету [1]. В серії робіт показано, що у хворих на цукровий діабет підвищений рівень TNF α в сироватці крові, при цьому концентрація його зростає на початкових етапах ЦД, а також при утворенні мікроангіопатій [24]. Попередні дослідження показали, що підвищення рівня TNF- α в неонатальний період у *NOD* мишей підвищує частоту та прискорює розвиток ЦД 1 типу. Введення нейтралізуючих anti-TNF α -антитіл новонародженим *NOD* мишам призводить до повного попередження розвитку патології. Так, Koulmanda M. et al. (2012) показали, що короткочасне лікування anti-TNF α відновлює еуглікемічний статус у діабетичних *NOD* мишей, ауто толерантність та нормальну передачу сигналу інсуліном [11]. Тем не менш, використання МКАТ до TNF α пов'язано з такою проблемою, як підвищення ризику розвитку тяжких інфекцій (пневмонія, сепсис), та вірогідністю реактивації латентної інфекції, в першу чергу туберкульозу. В цьому аспекті цікавою є більш «м'яка» блокада TNF α за допомогою інгібіторів фосфодіестераз (ІФДЕ), зокрема пентоксифіліном (РТХ), який підвищує рівень внутрішньоклітинного цАМФ та пригнічує активацію NF- κ B і транскрипції мРНК, що кодує TNF α . Ще одним важливим моментом такого підходу є позитивний вплив РТХ на мікроциркуляторне русло, що надзвичайно важливо, зважаючи

на кількість ангіогенних ускладнень у хворих на ЦД 1 типу. Зокрема, Han K. et al. (2010) показали, що тривалий прийом збільшує ренопротективний ефект *PTX* через протизапальну активність при стрептозотозин-індукованій діабетичній нефропатії. У діабетичних щурів, введення *PTX* протягом 4 тижнів (40 mg/kg, per oral) інгібує запалення в нирках, а при призначенні препарату протягом 8 тижнів – попередило протеїнурію [5]. Цілий ряд спостережень показав позитивні ефекти прийому *PTX* при діабетичній ретинопатії та нефропатії [3, 18]. Крім того, була відмічена пряма здатність *PTX* попереджувати розвиток діабету у експериментальних тварин. Так, у *NOD* мишей *PTX* знизив важкість інсуліту та попередив діабет як на фоні призначення циклофосфаміду, так і без нього. Цей протективний ефект зберігався через більш ніж 10 тижнів після відміни препарату [13]. Stosić-Grujić S. et al. (2001) продемонстрували, що *PTX* попереджує аутоімунно-опосередковане запалення, яке спричинене багаторазовим низькодозовим введенням стрептозотозину (MLD-STZ) генетично чутливим мишам лінії *CBA/H* (40 мг STZ на кг ваги протягом 5 днів) та щурам лінії *DA* (20 мг STZ на кг ваги протягом 5 днів). Призначення *PTX* (200 мг/кг/день протягом 10 днів) в комбінації з низькими дозами STZ зменшувало прояви інсуліту та попереджало розвиток гіперглікемії [21]. Mensah-Brown E. et al. (2002) проаналізували розвиток діабету та апоптозу β -клітин панкреатичних острівців у мишей лінії *CBA* після індукції MLD-STZ. Ефект *PTX* був оцінений по рівню індукції апоптозу в острівцях через різні інтервали часу після індукції діабету. *PTX* значно затримував апоптоз та пригнічував індукцію діабету. Отримані ними данні збігаються з інформацією, що $INF\gamma/TNF\alpha/NO$ -індукований апоптоз β -клітин у експериментальних тварин послаблюється пентоксифіліном [15]. Visser J. et al. (2002) показали, що захисний ефект від використання *PTX* у схильних до діабету *Diabetes-prone Bio Breeding (DP-BB)* і резистентних до діабету *Diabetes-resistant (DR-BB)*

щурів значною мірою залежить від термінів його введення. Якщо *DP-BB* отримували *PTX* протягом 60 днів, розвиток діабету був практично редукований. Інші протоколи лікування не мали ніякого ефекту. У *DR-BB* щурів лікування *PTX* викликало лише затримку розвитку діабету. В обох моделях *BB*-щурів, використання *PTX in vivo* значно затримувало продукцію $TNF\alpha$, але помірно впливало на продукцію $IL-10 in vitro$. Ці результати демонструють значення вибору часу використання *PTX* для запобігання розвитку діабету у *DP-BB* щурів. Збільшене *PTX*-індукованого співвідношення $IL-10/TNF\alpha$ можливо є одним з механізмів захисту або затримки розвитку діабету [23]. Крім того, за результатами іншого дослідження за участю 21 дитини з вперше діагностованим ЦД 1 типу було з'ясовано, що *PTX* здатен зменшити (але не ліквідувати) необхідність в інсуліні або подовжити період без використання інсуліну [14].

Висновки.

1. Розвиток діабету супроводжується переважно збільшенням кількості $T-bet^+$ -клітин в лімфоїдних структурах КАЛТ на 45-72% ($p < 0,05$), односпрямованим зниженням сумарної щільності $GATA3^+$ -лімфоцитів на 21-44% ($p < 0,05$), призводить до незначного зниження концентрації $T-bet$ і не впливає на концентрацію $GATA3$ в Т-хелперах. Виявлені зміни співвідношення $T-bet^+/GATA3^+$ -клітин можуть бути одними з тригерів розвитку і прогресії діабету.

2. Введення *PTX* діабетичним тваринам зменшує кількість $T-bet^+$ -клітин у ВПСОВ (на 24-30%, $p < 0,05$) на протязі всього періоду спостереження, в ІЛВ – тільки к 4 тижню діабета (на 41%, $p < 0,05$), не впливає на щільність $Th2$ у ворсинках, різноспрямовано змінює їх число в ІЛВ, дещо знижуючи концентрацію $T-bet$ на 4-й тиждень розвитку ЕЦД при відсутності змін концентрації $GATA3$ в імунопозитивних клітинах.

Перспективи подальших досліджень. Значний інтерес представляє подальше вивчення компонентів адаптивної та вродженої імунної системи КАЛТ при ЕЦД.

Література

1. Antohe J. Diabetes risk in rheumatoid arthritis: Reduced incidence with anti-tumor necrosis factor- α therapy / J. Antohe, A. Bili, J. Sartorius // *Arthritis Care & Research* – 2012. – Vol. 64(2). – P. 215-221.
2. Bao M. Molecular mechanisms for gender differences in susceptibility to T cell-mediated autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice / M. Bao, Y. Yang, H. Jun // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 5369–5375.
3. Baykara M. Pentoxifylline treatment for protecting diabetic retinopathy in children with type 1 diabetes / M. Baykara, M. Atabek, B. Ekioglu // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 26(1-2). – P. 19-24.
4. Esensten J. T-bet-deficient NOD mice are protected from diabetes due to defects in both T cell and innate immune system function / J. Esensten, M. Lee, H. Glimcher, J. Bluestone // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183(1). – P. 75–82.
5. Han K. Prolonged administration enhances the renoprotective effect of pentoxifylline via anti-inflammatory activity in streptozotocin-induced diabetic nephropathy / K. Han, S. Han, H. Kim // *Inflammation.* – 2010 – Vol. 33(3) – P. 137-143.
6. Hirai H. Analysis of cytokine mRNA expression in pancreatic islets of nonobese diabetic mice / H. Hirai, K. Kaino, T. Ito, K. Kida // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2000. – Vol. 13(1). – P. 91–98.
7. Ho C. GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation / C. Ho, T. Tai, S. Pai // *Na. t Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 9(2). – P. 125–135.
8. Hoyler T. T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells / T. Hoyler, C. Connor, E. Kiss // *Curr. Opin. Immunol.* – 2013. – Vol. 25(2). – P. 139-147.
9. Juedes A. T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in Type I diabetes / A. Juedes, E. Rodrigo, L. Togher // *J. Exp. Med.* – 2004. – Vol. 199. – P. 1153–1162.
10. Karlsson F. Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes / F. Karlsson, J. Ernertudh, J. Ludvigsson // *Scand. J. Immunol.* – 2004. – Vol. 59(5). – P. 517–526.

11. Koulmanda M. The Role of TNF- α in Mice with Type 1- and 2- Diabetes / M. Koulmanda, M. Bhasin, Z. Awdeh // PLoS One. – 2012. – Vol. 7(5). – P. 332-354.
12. Lazarevic V. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity / V. Lazarevic, L. Glimcher, G. M. Lord // Nat. Rev. Immunol. – 2013. – Vol. 11. – P. 777–789.
13. Liang L. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice / L. Liang, E. Beshay, G. J. Prud'homme // Diabetes. – 1998. – Vol. 47(4) – P. 570-575.
14. MacDonald M. Pentoxifylline in the treatment of children with new-onset 1 diabetes mellitus / M. MacDonald, N. Shahidi, D. Allen // JAMA. – 1994. – Vol. 271. – P. 27–28.
15. Mensah-Brown E. P. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes / E. P. Mensah-Brown, S. Stosic Grujicic, D. Maksimovic // Mol. Immunol. – 2002. – Vol. 38(12-13). – P. 941-946.
16. Powell N. Transcriptional regulation of the mucosal immune system mediated by T-bet / N. Powell, J. Canavan, T. MacDonald, G. M. Lord // Mucosal Immunology. – 2010. – Vol. 3. – P. 567–577.
17. Sasaki Y. Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet / Y. Sasaki, K. Ihara, N. Matsuura // Hum Genet. – 2004. – Vol. 115(3). – P. 177-184.
18. Shan D. Pentoxifylline for diabetic kidney disease / D. Shan, H. Wu, Q. Yuan // Cochrane Database Syst. Rev. – 2012. – Vol. 15. – P. 2-9.
19. Sia C. Imbalance in Th Cell Polarization and its Relevance in Type 1 Diabetes Mellitus / C. Sia // Rev Diabet Stud. – 2005. – Vol. 2(4). – P. 182–186.
20. Sorini C. Shaping the autoimmune response in the gut: the role of intestinal immune regulation in the prevention of type 1 diabetes / C. Sorini, M. Falcone // Am. J. Clin. Exp. Immunol. – 2013. – Vol. 2. – P. 156–171.
21. Stosić-Grujčić S. Pentoxifylline prevents autoimmune mediated inflammation in low dose streptozotocin induced diabetes / S. Stosić-Grujčić, D. Maksimović, M. Stojković // Dev. Immunol. – 2001. – Vol. 8(3-4). – P. 213-221.
22. Todd J. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes / J. Todd, N. Walker, J. Cooper // Nat. Genet. – 2007. – Vol. 39. – P. 857–864.
23. Visser J. Timing of pentoxifylline treatment determines its protective effect on diabetes development in the Bio Breeding rat / J. Visser, H. Groen, F. Klatter // Eur. J. Pharmacol. – 2002. – Vol. 445(1-2). – P. 133-140.
24. Zorena K. Threshold serum concentrations of tumour necrosis factor alpha (TNF α) as a potential marker of the presence of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM) / K. Zorena, M. Kula, E. Malinowska // Hum. Immunol. – 2013. – Vol. 74(1). – P. 75-81.

УДК 616.379-008.64-092.9]:577.214:616.344-018.98

ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА ЕКСПРЕСІЮ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ T-bet ТА GATA3 В ЛІМФОЇДНИХ СТРУКТУРАХ КЛУБОВОЇ КИШКИ ЩУРІВ

Деген А. С., Камишний О. М.

Резюме. В експерименті досліджувався вплив експериментального цукрового діабету на інтенсивність експресії транскрипційних факторів T-bet та GATA імунними клітинами клубової кишки. Для визначення T-bet⁺ та GATA⁺-клітин було застосовано метод непрямой імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл до T-bet та GATA щура. Встановлено, що розвиток діабету супроводжується збільшенням кількості T-bet⁺-клітин в лімфоїдних структурах КАЛТ на 45-72% (p<0,05), зниженням сумарної щільності GATA3⁺-лімфоцитів на 21-44% (p<0,05), незначного зниження концентрації T-bet і не впливає на концентрацію GATA3 в Т-хелперах. Введення РТХ діабетичним тваринам зменшує кількість T-bet⁺-клітин у ВПСОВ (на 24-30%, p<0,05), не впливає на щільність Th2 у ворсинках, різноспрямовано змінює їх число в ІЛВ, дещо знижуючи концентрацію T-bet на 4-й тиждень розвитку ЕЦД при відсутності змін концентрації GATA3 в імуні-позитивних клітинах.

Ключові слова: діабет, T-bet, GATA, кишково-асоційована лімфоїдна тканина.

УДК 616.379-008.64-092.9]:577.214:616.344-018.98

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА НА ЭКСПРЕССИЮ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ T-bet И GATA3 В ЛИМФОИДНЫХ СТРУКТУРАХ ПОДВЗДОШНОЙ КИШКИ КРЫС

Деген А. С., Камышный А. М.

Резюме. В эксперименте изучалось влияние экспериментального сахарного диабета на интенсивность экспрессии транскрипционных факторов T-bet и GATA иммунными клетками подвздошной кишки. Для определения T-bet⁺ та GATA⁺-клеток был использован метод непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител к T-bet и GATA крыс. Установлено, что развитие диабета сопровождается увеличением количества T-bet⁺-клеток в лимфоидных структурах КАЛТ на 45-72% (p<0,05), снижением суммарной плотности GATA3⁺-лимфоцитов на 21-44% (p<0,05), незначительного снижения концентрации T-bet и не влияет на концентрацию GATA3 в Т-хелперах. Введение РТХ диабетическим животным уменьшает количество T-bet⁺-клеток в СПСОВ (на 24-30%, p<0,05), не влияет на плотность Th2 в ворсинках, разнонаправленно изменяет их число в ИЛФ, несколько снижая концентрацию T-bet на 4-й неделе развития ЭСД при отсутствии изменений концентрации GATA3 в иммунопозитивных клетках.

Ключевые слова: диабет, T-bet, GATA, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань.

UDC 616. 379-008. 64-092. 9]:577. 214:616. 344-018. 98

Influence of Experimental Diabetes Mellitus on the T-Bet and Gata Transcriptions Factors Expression in Lymphoid Structures of Ileum in Rats

Degen A. S., Kamyshny A. M.

Abstract. A considerable quantity of researches of patients with a diabetes and its models at animals have shown a close connection of development type 1 diabetes mellitus and changes in an intestine which anticipate appearance of clinical symptoms of disease. Functional polarization of T-helpers in gut-associated lymphoid tissue plays an important role in an induction of development and progression of T1DM. The great interest represents studying of adaptive immune system, especially tight regulation of the type 1 inflammatory response, at the development of autoimmune disease, such as type 1 diabetes mellitus. Because reduction of an expression of gene GATA3 which is accompanied by weakening of a differentiation of Th2-cells and intensifying of a differentiation of Th1-cells, promotes the development of some Th1 / Th17-dependent autoimmune processes whereas intensifying of its expression can promote development of allergic diseases.

Proinflammatory cytokines, such as TNF α play one of the most important roles in pathogenesis of T1DM. Indirect inhibitors of their production (for example, pentoxifylline, PTX) reduce risk of development of this pathology.

The aim of research: To study the peculiarities of T-bet and GATA transcriptions factors expression in gut-associated lymphoid tissues (GULT) of rats with experimental STZ-induced diabetes mellitus and pentoxifylline administration.

Methods: Researches are made on Wistar rats. For an induction of diabetes streptozotocin was used in doses 50 mg/kg. Structure of population of T-bet⁺ and GATA⁺-cells has been studied by the analysis of serial histological sections using the method of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to T-bet and GATA of rat. T-bet⁺ and GATA⁺-cells, which were situated in lamina propria of villi and subepithelial zone of ILF has been studied by coloring of monoclonal antibodies to T-bet and GATA3. It demonstrates features of activation of effector and inductive immune response in GALT.

Results: It has been established that diabetes development was accompanied with 45-72% (p < 0,05) increase in quantity of T-bet⁺-cells in lymphoid structures of ileum, with 21-44% (p < 0,05) decrease in total density of GATA3⁺-lymphocyte, an insignificant decrease in concentration of T-bet and it had no influence on concentration of GATA3 in T-helpers. Pentoxifylline administration of diabetic animal reduces the quantity of T-bet⁺-cells in mucous membrane of villus (on 24-30%, p < 0,05), does not influence the density of Th2 in villus, changes their number in ILF, reduces concentration of T-bet by the 4th week of development of T1DM in the absence of concentration changes of GATA3 in immunopositive cell.

Conclusions: The expression augmentation with T-bet and GATA 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, T-bet, GATA, gut-associated lymphoid tissue.

Рецензент – проф. Рибаків С. Й.

Стаття надійшла 6. 11. 2013 р.