

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ІНДУЦИБЕЛЬНОГО КОСТИМУЛЯТОРУ ICOS ЛІМФОЦИТАМИ СЕЛЕЗІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ

Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)

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

Вступ. Одним з можливих механізмів участі селезінки в патогенезі цукрового діабету 1 типу (ЦД 1) є порушення диференціювання таких субпопуляцій Т-клітин, як Т-фолікулярні хелпери (Tfh), Т-хелпери 17 типу (Th17) і Т-регуляторні клітини (T_{reg}). Як відомо, розвиток ЦД 1 типу супроводжується синтезом аутоантитіл до β-клітинних антигенів. Для старту синтезу антитіл (АТ) з високим афінітетом В-лімфоцити мають отримати стимулюючий сигнал від CD4⁺Т-клітин в ході специфічних реакцій в гермінативних центрах (ГЦ). Такими клітинами є Тfh, які відіграють ключову роль у формуванні ефекторних В-лімфоцитів і В-клітин пам'яті [6]. Серед специфічних маркерів Тfh особлива роль належить індукційному костимулятору ICOS [7], який експресується тільки на активованих Т-лімфоцитах, причому Тfh містять найбільш високу його концентрацію в порівнянні з іншими Т-лімфоцитами [9]. Занадто велика експресія ICOS може бути одним із чинників, які сприяють розвитку аутоімунних захворювань (АІЗ), тому що різко збільшує утворення Тfh, і, відповідно, продукцію високоафінних АТ до власних антигенів [8].

Тому, **метою дослідження** було вивчити особливості розподілу ICOS⁺ -клітин в селезінці щурів з експериментальним стрептозотоциновим цукровим діабетом (ЕЦД).

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проведені на 36 самцях щурів лінії Wistar, які були розділені на 3 експериментальні групи: контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН=4,5) (група 1); щури з 28- і 38-денним експериментальним стрептозотоциновим діабетом (групи 2 та 3, відповідно). Стрептозотин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг, розчиненої в 0,5 мл 0,1 М цитратному буфері (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 «SUPER GLUCOCARD-II» (Arkray Factory, Японія) через 12 годин і на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 28 і 38 добу після ін'єкції стрептозотину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 3 добу після введення стрептозотину для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глікемії натще > 8,0 ммоль/л.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Для виявлення експресії ICOS використовували метод непрямой імунофлюоресценції з первинними кролячими МКАТ до ICOS щурів виробництва Santa Cruz Biotechnology (США). В якості вторинних антитіл використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кролика, кон'юговані з FITC (Santa Cruz Biotechnology, США). Оброблені гістологічні зрізи вивчали на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Серед ідентифікованих ICOS-імунопозитивних клітин (ICOS⁺) для подальшого аналізу відбирали тільки клітини з високою концентрацією індукційного костимулятора (більше 0.3 одиниць інтенсивності флюоресценції – O_ю), які з високим ступенем можливості є Т-фолікулярними хелперами. Досліджували 3 морфологічні зони селезінки – лімфоїдні фолікули, маргінальну зону і періартеріальні лімфоїдні муфти (ПАЛМ).

Всі одержані 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 вірогідності 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.

Нами встановлено, що розвиток діабету тривалістю як 28, так і 38 днів супроводжувався достовірним збільшенням щільності популяції (ЩП) ICOS⁺-клітин в маргінальній зоні (на 36-47%, $p < 0,05$) і періартеріальних лімфоїдних муфтах (ПАЛМ) селезінки (на 96% – в 2,6 рази, $p < 0,05$) в порівнянні з контролем, тоді як у лімфоїдних фолікулах їх кількість зростала тільки у щурів з 38-денним ЕЦД (в 3,7 рази, $p < 0,05$). При цьому щільність ICOS-рецепторів на клітинній мембрані у Tfh змінювалася різноспрямовано – достовірно знижувалася у експериментальних тварин з 28-денним ЕЦД в лімфоїдних фолікулах і ПАЛМ селезінки і зростала при збільшенні терміну розвитку діабету до 38 днів. Виявлені зміни супроводжувалися також формуванням дисбалансу ICOS⁺-лімфоцитів окремих класів.

Отримані нами дані збігаються з рядом інших досліджень. Так, відомо, що у ICOS-дефіцитних людей та експериментальних тварин порушується виробництво антитіл і переключення їх синтезу в бік продукції антитіл з високим афінитетом до антигенів, а також порушено формування ГЦ [5]. Дефіцит ICOS викликає порушення розвитку Tfh, тому ICOS вважають однією з найважливіших молекул, необхідних для виконання ефекторних функцій Tfh [2]. Найбільш високий рівень експресії ICOS спостерігається на Tfh ГЦ. Надмірна експресія ICOS може бути одним з факторів, що сприяють розвитку АІЗ, оскільки різко збільшує утворення Tfh, і, відповідно, продукцію високоафінних антитіл до власних антигенів [7].

Присутність ICOS необхідна для розвитку інсуліта і гіперглікемії у мишей лінії NOD (nonobese diabetic mice) [1]. Так, для визначення функції ICOS у розвитку діабету Hawiger D. et al. (2008) вивчили перебіг захворювання у ICOS-дефіцитних NOD мишей [3]. Встановлено, що у ICOS^{-/-} мишей інсуліт не розвивався, вони мали низькі титри аутоантитіл, а

нормоглікемія зберігалася протягом усього життя [3]. Видалення ICOS в T-лімфоцитах призвело до зменшеного виробництва цитокіну Th1-клітин IFN- γ , тоді як кількість регуляторних T-клітин залишалася незмінною. Автори роблять висновок, що ICOS критично важливий для індукції аутоімунного процесу, який призводить до діабету. Крім того, ICOS важливий для розвитку зародкових центрів у лімфоїдних тканинах, перемикання ізотипів імуноглобулінів і виробництві нормальних рівнів імуноглобулінів сироватки, особливо IgG1 і IgE [8]. Роль аутоантитіл у розвитку діабету багато в чому залишається спірною, однак присутність аутоАТ до інсуліну і глутаматдекарбоксілази GAD65 є важливим діагностичним критерієм в оцінці перебігу та тяжкості діабету. Вимірювання рівнів анти-GAD65 і анти-інсулінових аутоАТ в сироватці показало їх 3-5-кратне зменшення у ICOS^{-/-} мишей порівняно з ICOS^{+/+}-мишами [3]. Таким чином, зменшене виробництво аутоантитіл корелює з відсутністю діабету у ICOS^{-/-} NOD мишей. Nanji S. et al. (2006) показали, що комбінована блокада ICOS і CD40L за допомогою МКАТ значно продовжує приживання алотрансплантату панкреатичних острівців і запобігає розвитку аутоімунного діабету у NOD мишей [4].

Висновки.

1. Розвиток діабету супроводжується збільшенням кількості ICOS⁺-клітин у білій пульпі селезінки, різноспрямованими змінами щільності ICOS-рецепторів на клітинній мембрані Tfh і формуванням дисбалансу ICOS⁺-лімфоцитів окремих класів.

2. Надмірна експресія ICOS може бути одним з факторів, що сприяють розвитку АІЗ, а отримані в роботі дані дозволяють припускати важливу роль збільшення числа ICOS-експресуючих клітин в селезінці як одного з механізмів прогресування ЕЦД.

Перспективи подальших досліджень. Спираючись на отримані дані вважаємо доцільним і перспективним проведення молекулярно-генетичних досліджень з метою вивчення рівня мРНК ICOS при діабеті.

Література

- Anderson M. The NOD mouse: a model of immune dysregulation / M. Anderson, J. Bluestone // *Annu. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 447–485
- Bossaller L. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5⁺CD4 germinal center Th cells / L. Bossaller, J. Burger, R. Draeger [et al.] // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 4927–4932.
- Hawiger D. ICOS mediates the development of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice / D. Hawiger, E. Tran, W. Du [et al.] // *The J. of Immunology.* – 2008. – Vol. 180. – P. 3140–3147
- Nanji S. Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse / S. Nanji, W. Hancock, B. Luo [et al.] // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55. – P. 27–33.
- Odegard J. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity / J. Odegard, B. Marks, L. DiPlacido [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205. – P. 2873–2886.
- Poholek A. Competing for help: new insights into the function of follicular helper T cells / A. Poholek, J. Craft // *Immunol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 87. – P. 438–439.
- Tafuri A. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses / A. Tafuri, A. Shahinian, F. Bladt [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 409. – P. 105–107.
- Vinuesa C. RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity / C. Vinuesa, M. Cook, C. Angelucci [et al.] // *Nature.* – 2005. – Vol. 435. – P. 452–458.
- Watanabe M. Down-regulation of ICOS ligand by interaction with ICOS functions as a regulatory mechanism for immune responses / M. Watanabe, Y. Takagi, M. Kotani [et al.] // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 5222–5234.

УДК 616. 411-003. 96-008. 922. 1-018. 1

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ІНДУЦИБЕЛЬНОГО КОСТИМУЛЯТОРУ ICOS ЛІМФОЦИТАМИ СЕЛЕЗІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ

Камишний О. М.

Резюме. В експерименті досліджувались особливості розподілу ICOS⁺-клітин в селезінці щурів з експериментальним стрептозотоциновим цукровим діабетом. Для визначення експресії ICOS використовували метод непрямой імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл. Встановлено, що розвиток діабету супроводжується збільшенням кількості ICOS⁺-клітин у білій пульпі селезінки, різноспрямовано змінює щільності ICOS-рецепторів на клітинній мембрані Tfh і формує дисбаланс ICOS⁺-лімфоцитів окремих класів. Отримані дані дозволяють припускати важливу роль збільшення числа ICOS-експресуючих клітин в селезінці як одного з механізмів прогресування ЕЦД.

Ключові слова: селезінка, діабет, ICOS.

УДК 616. 411-003. 96-008. 922. 1-018. 1

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОГО КОСТИМУЛЯТОРА ICOS ЛИМФОЦИТОВ СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

Камышный А. М.

Резюме. В эксперименте исследовались особенности распределения ICOS⁺ клеток в селезенке крыс с экспериментальным стрептозотоциновым сахарным диабетом. Для определения экспрессии ICOS использовали метод непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител. Установлено, что развитие диабета сопровождается увеличением количества ICOS⁺ клеток в белой пульпе селезенки, разнонаправленно изменяет плотность ICOS-рецепторов на клеточной мембране Tfh и формирует дисбаланс ICOS⁺ лимфоцитов отдельных классов. Полученные данные позволяют предполагать важную роль увеличения числа ICOS-экспрессирующих клеток в селезенке как одного из механизмов прогрессирования ЭЦД.

Ключевые слова: селезенка, диабет, ICOS.

UDC 616. 411-003. 96-008. 922. 1-018. 1

The Expression of the Inducible Costimulant of ICOS by Splenic Lymphocytes in Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes

Kamyshnyi A. M.

Abstract. It has been known for a while that T-helper cells are involved in the regulation of B-cell responses. The characterization of a precise subset of these specialized cells, called follicular T-helper cells (Tfh). The T-cell costimulatory receptors, CD28 and the inducible costimulator (ICOS), are required for the generation of follicular B helper T cells (Tfh) and germinal center (GC) reaction. Beside canonical Th markers, the minimal Tfh signature requires expression of CXCR5, BCL6, and ICOS. Increased ICOS expression has been associated with disease in several animal and human studies. The ICOS is found on Ag-experienced T cells where it acts as a potent regulator of T cell responses. To determine the function of ICOS in diabetes, we followed the course of autoimmune disease and examined T cells in Wistar rats.

The aim of research. The aim of this study was to investigate features of the distribution of ICOS⁺ cells in the spleen of rats with streptozotocin-induced experimental diabetes.

Materials and methods. Male Wistar rats were housed in standard wire-mesh bottom cages at constant temperature of 25°C. The rats were given water and standard laboratory diet ad libitum with no restriction. Streptozotocin was administered by intraperitoneally injection in doses of 50 mg/kg body weight. The immunopositive cells were determined using an indirect immunofluorescence technique with using a monoclonal antibody. Images were taken by using a fluorescence microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) with a computer-assisted system VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany). The processed histological sections were studied with the help of computer program ImageJ (NIH, USA). Images obtained on the microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) in ultraviolet spectrum of stimulation 390 nm (FITC) with the help of highly sensitive chamber AxioCam 5c (ZEISS, Germany) and program package for obtaining, archiving and preparation of the images for publication AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Germany) were immediately introduced into computer. All statistical analyses were performed using EXCEL MS Office 2010 (Microsoft Corp., USA), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001) software. Results are expressed as mean values ± SEM. Differences were considered statistically significant if the p value was < 0.05.

Results. It has been established that streptozotocin-induced experimental diabetes development was accompanied with the increase in quantity of ICOS⁺-cells in spleen. Development of experimental diabetes mellitus duration as 28 and 38 days was accompanied by significant increase in population density ICOS⁺-cells in the marginal zone (at 36-47%, p < 0.05) and periarterial lymphoid sheaths (PALS) spleen (96% – 2.6-fold, p < 0.05) compared with controls, whereas lymphoid follicles, their number increased only in rats with 38-day experimental

diabetes mellitus (3.7-fold, $p < 0.05$). The density of ICOS-receptors on the cell membrane in Tfh varied in different directions – significantly decreased in experimental animals with 28-day experimental diabetes mellitus in lymphoid follicles and PALS spleen and increased with increasing duration of diabetes up to 38 days. Identified as changes were accompanied by the formation of an imbalance ICOS⁺-lymphocytes individual classes. At the same time experimental diabetes development resulted in multidirection action on the expression of receptors with Tfh-lymphocytes in spleen.

Conclusions. Overexpression of ICOS secondary to unknown triggers, such as inflammatory cytokines or distinct antigens, along with genetic susceptibility, leads to hyperactivation of autoreactive or pathogenic B cells and subsequent autoimmunity. We conclude that ICOS is critically important for the induction of the autoimmune process that leads to diabetes. Our results suggest a potential therapeutic benefit of blocking ICOS in autoimmune diabetes.

Keywords: spleen, diabetes mellitus, ICOS.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 20. 01. 2015 р.