

## ЕКСПРЕСІЯ РЕЦЕПТОРІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ЛІМФОЦИТАМИ ПАНКРЕАТИЧНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ\*

Путілін Д. А., Камишний О. М., Сухомлінова І. Є., Камишна В. А.

*Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, Україна  
des.doctor@mail.ru; alexkamyshny@yandex.ru*

В панкреатичних лімфатичних вузлах (ПЛВ), які дрениують підшлункову залозу, а також окремі сегменти кишківника, відбувається початкова активація діабетогенних CD8<sup>+</sup> та CD4<sup>+</sup> Т-клітин до їх міграції в панкреатичні островці [1]. Більшість публікацій, присвячених імунним механізмам розвитку цукрового діабету (ЦД) розкривають, головним чином, адаптивну ланку імунітету [2]. Тим не менш, останні дослідження свідчать, що в розвитку ЦД 1 типу критичну роль можуть грати зміни експресії цілої низки паттерн-розпізнаючих рецепторів (ПРР): мембранних та ендосомальних толл-подібних рецепторів (TLR), цитоплазматичних NOD-подібних рецепторів (NLR), сенсорів вірусних РНК RIG-подібних рецепторів (RLR) [3]. Експресію майже всіх відомих

ПРР на CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> Т-клітинах було ідентифіковано як на рівні мРНК, так і на рівні білка [4]. Тим не менш, дані про особливості експресії ПРР на лімфоцитах ПЛВ майже відсутні.

В свою чергу, однією із перспективних терапевтичних мішеней при ЦД є інгібітори mTOR (*mammalian target of rapamycin*), одного з центральних регуляторів метаболізму, росту, проліферації та виживання лімфоцитів та інших клітин [5]. В зв'язку з цим ми зупинили свій вибір на метформіні, що здатний знижувати концентрацію глюкози в крові через АМФ-активовану протеїнкіназу (АМФК). Метформін, як і рапаміцин, але більш м'яко, без розвитку імуносупресії, пригнічує активність mTOR [6]. Метформін здатен і безпосередньо, без уча-

\*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 МОЗ України.

Автори гарантують колективну 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 12.10.2016.

сті mTOR, впливати на метаболізм лімфоцитів. Тому метою роботи було з'ясувати характер розподілу TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ПЛВ щурів з експе-

риментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом (ЕСІЦД) і після введення метформіну.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведені на 100 самцях щурів лінії Вістар вагою 115–135 г, отриманих з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» (Київ). При проведенні маніпуляцій з тваринами дотримувалися вимог «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001). Тварини були розділені на 5 експериментальних груп по 20 щурів: контрольні щури, яким одноразово внутрішньочеревно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буферу (рН = 4,5) (група 1); щури з 3-тижневим експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом (ЕСІЦД) (група 2); щури з 5-тижневим експериментальним стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом (ЕСІЦД) (група 3); щури з 3 тижневим ЕСІЦД (група 4) та 5-тижневим ЕСІЦД (група 5), яким внутрішньощлунково (в/ш) щоденно протягом 3 та 5 тижнів вводили метформін в дозі 50 мг/кг маси тіла починаючи з 1 дня індукції діабету.

Для індукції ЕСІЦД стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг маси тіла, розчинений 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 викладенні матеріалу інтерпретували як тривалість перебігу діабету. Визначення концентрації глюкози в крові, яку брали з хвостової вени, проводили глюкозооксидазним методом із застосуванням приладу «BIONIMERigh test™ GM 110» (Швейцарія) через 12 годин та на 1, 3, 21 й 35 добу після ін'єкції стрептозотоцину. Вимірювання рівня глікемії здійснювали через 6 годин з моменту останнього прийому їжі. На 21 та 35 добу після введення STZ тварин виводили з експерименту декапітуванням під тіопенталовим наркозом. Вилучали ПЛВ, які на 20 годин занурювали

в фіксатор Буена і після промивки заливали в парапласт.

Для ідентифікації розподілу TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ПЛВ застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод з використанням моноклональних або поліклональних антитіл до відповідних ПРР (Santa Cruz Biotechnology, USA). Структуру популяції імунопозитивних клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів й даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для проведення цього аналізу використовували ротаційний мікроскоп MICROM HR-360 (Microm, Німеччина), мікроскоп Primo Star (ZEISS, Німеччина), високочутливу камеру AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина), пакет програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та комп'ютерну програму ImageJ (NIH, США). Щільність рецепторів визначали, враховуючи інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічну флюоресценцію препарату (так званий «фон»). На підставі цих показників обраховувалася коректована клітинна флюоресценція (в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції УОІФ). Це дозволило обчислити абсолютну (кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup> площі тканини) і відносну (%) щільність розподілу імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах ПЛВ. Вивчали імунопозитивні клітини, розташовані в паракортикальній зоні та м'якотних тяжках ПЛВ.

Всі одержані експериментальні дані обробляли на персональному комп'ютері пакетом STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії й помилки середньої (m). Для ви-

явлення достовірності різниць результатів досліджень в експериментальних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт Стьюдента ( $t$ ), після чого визначали можли-

вість різниці вибірок ( $p$ ) і довірчий інтервал середньої. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз серійних зрізів ПЛВ щурів лінії Вістар з ЕСІЦД, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2, показав, що розвиток 3-х та 5-тижневого ЕСІЦД супроводжувався збільшенням сумарної щільності TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів тільки у паракортикальній зоні ПЛВ — на 60% ( $p < 0,05$ ) та в 3,1 рази ( $p < 0,05$ ), відповідно. Після введення метформіну щурам з 5-тижневим ЕСІЦД сумарна щільність TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ зменшилась на 53% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з діабетичними тваринами (табл. 1). Вивчення щільності TLR2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток 3-х та 5-тижневого

ЕСІЦД супроводжувався зменшенням даного показника у м'якотних тяжках ПЛВ у лімфобластах на 8% ( $p < 0,05$ ). Ми також спостерігали вірогідне збільшення щільності TLR2 рецепторів на малих лімфоцитах при 3-тижневому ЕСІЦД у м'якотних тяжках і зменшення при 5-тижневому ЕСІЦД у паракортикальній зоні ПЛВ на малих та середніх лімфоцитах. Введення метформіну щурам з 5-тижневим ЕСІЦД супроводжувалося вірогідним збільшенням щільності TLR2 в малих лімфоцитах на 11% ( $p < 0,05$ ) та середніх лімфоцитах на 5% ( $p < 0,05$ ) тільки у паракортикальній зоні ПЛВ.

Вивчення розподілу TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів

Таблиця 1

Сумарна щільність (на 1 мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у панкреатичних лімфатичних вузлах щурів лінії Вістар, (M ± m)

Серія	Рецептор			
	TLR-2	TLR-4	NOD2	RIGI
<b>Паракортикальна зона</b>				
Контроль	32 ± 3	23 ± 2	39 ± 2	26 ± 2
ЕСІЦД 3-тижневий	51 ± 3 <sup>1</sup>	37 ± 5 <sup>1</sup>	54 ± 6 <sup>1</sup>	63 ± 10 <sup>1</sup>
ЕСІЦД 5-тижневий	103 ± 13 <sup>1</sup>	49 ± 6 <sup>1</sup>	80 ± 11 <sup>1</sup>	46 ± 3 <sup>1</sup>
ЕСІЦД 3-тижневий + метформін	52 ± 5	22 ± 1 <sup>2</sup>	39 ± 3	40 ± 2 <sup>2</sup>
ЕСІЦД 5-тижневий + метформін	48 ± 2 <sup>3</sup>	20 ± 2 <sup>3</sup>	67 ± 8	40 ± 2
<b>М'якотні тяжі</b>				
Контроль	55 ± 3	24 ± 2	40 ± 2	36 ± 2
ЕСІЦД 3-тижневий	53 ± 2	38 ± 6 <sup>1</sup>	47 ± 4	57 ± 1 <sup>1</sup>
ЕСІЦД 5-тижневий	68 ± 8	31 ± 3	43 ± 9	132 ± 1 <sup>1</sup>
ЕСІЦД 3-тижневий + метформін	48 ± 4	23 ± 1 <sup>2</sup>	37 ± 3	57 ± 2
ЕСІЦД 5-тижневий + метформін	50 ± 2	28 ± 1	40 ± 2	38 ± 2 <sup>3</sup>

Примітка. <sup>1</sup> — вірогідність відмінностей показників стосовно групи контроль ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> — вірогідність відмінностей показників стосовно 3-тижневого ЕСІЦД ( $p < 0,05$ ); <sup>3</sup> — вірогідність відмінностей показників стосовно 5-тижневого ЕСІЦД ( $p < 0,05$ ).



Рис. 1. Концентрація NOD2-рецепторів (інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях, УО) в NOD2<sup>+</sup> — лімфобластах (А), NOD2<sup>+</sup> — середніх лімфоцитах (В) та NOD2<sup>+</sup> — малих лімфоцитах (С).

\* — вірогідність відмінностей показників відносно групи контроль ( $p < 0,05$ );  
# — вірогідність відмінностей показників відносно тварин з ЕСЦД ( $p < 0,05$ ).

показало, що в умовах індукції 3-тижневого ЕСЦД спостерігається збільшення їх сумарної щільності на 60 % ( $p < 0,05$ ) як у паракортикальній зоні, так і м'якотних тяжях, тоді як при 5-тижневому ЕСЦД сумарна щільність TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів збільшилась в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ) тільки у паракортикальній зоні у порівнянні з групою контролю (див. табл. 1). Введення метформіну щурам з 3-тижневим ЕСЦД призвело до зменшення сумарної щільності TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів на 40 % ( $p < 0,05$ ) в обох досліджуваних морфофункціональних зонах. Введення метформіну щурам з 5-тижневим ЕСЦД призвело до зменшення сумарної щільності TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів лише у паракортикальній зоні ПЛВ на 59 % ( $p < 0,05$ ). Вивчення щільності TLR4 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток 3-тижневого ЕСЦД супроводжується збільшенням даного показника у лімфобластах на 12 % ( $p < 0,05$ ) тільки у м'якотних тяжях ПЛВ. При 5-тижневому ЕСЦД даний показник збільшився у лімфобластах м'якотних тяжів та паракортикальній зоні ПЛВ на 20 % та 25 %, відповідно ( $p < 0,05$ ).

Введення метформіну щурам з 3-тижневим ЕСЦД супроводжувалось вірогідним змінням щільності TLR4 в обох морфофункціональних зонах: в лімфобластах зменшенням на 13 % ( $p < 0,05$ ) та в малих лімфоцитах збільшенням на 7 % ( $p < 0,05$ ). Введення метформіну щурам з 5-тижневим ЕСЦД супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 у лімфобластах як

паракортикальній зоні так і м'якотних тяжів ПЛВ на 14 % ( $p < 0,05$ ), та збільшенням в малих лімфоцитах на 11 % ( $p < 0,05$ ) лише у паракортикальній зоні у порівнянні з групою тварин, які не отримували метформін.

Аналіз розподілу NOD2<sup>+</sup>-клітин показав, що розвиток 3-х та 5-тижневого ЕСЦД супроводжувався збільшенням сумарної щільності NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у паракортикальній зоні ПЛВ на 38 % ( $p < 0,05$ ) та в 2 рази ( $p < 0,05$ ), відповідно. У м'якотних тяжях вірогідних змін сумарної щільності NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів не відбулось (див. табл. 1). При цьому концентрація NOD2 зменшувалась у малих лімфоцитів паракортикальній зоні як на 3, так і на 5 тижнів розвитку діабету, а на середніх лімфоцитах лише при 5-тижневому ЕСЦД (рис. 1).

Введення метформіну щурам з 5-тижневим ЕСЦД зменшило концентрацію NOD2 на лімфобластах у паракортикальній зоні на 14 % ( $p < 0,05$ ), а у м'якотних тяжях на 11 % ( $p < 0,05$ ). Введення метформіну щурам з 3-х та 5-тижневим ЕСЦД супроводжувалось збільшенням щільності NOD2 рецепторів на малих лімфоцитах відповідно на 7 % та 15 % ( $p < 0,05$ ) у паракортикальній зоні (див. рис. 1).

Вивчення зрізів ПЛВ щурів лінії Вістар з ЕСЦД, попередньо інкубованих з МКАТ до RIGI, показав, що розвиток 3-х та 5-тижневого ЕСЦД призвів до збільшення сумарної щільності RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у паракортикальній зоні та м'якотних тяжях ПЛВ при 3-х та 5-тижневому ЕСЦД, а саме

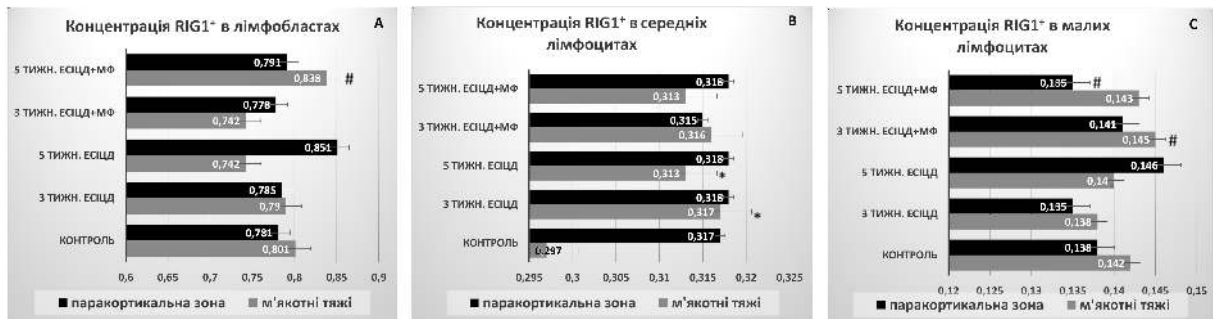


Рис. 2. Концентрація RIG1-рецепторів (інтенсивність флуоресценції в умовних одиницях, УО) в RIG1<sup>+</sup> — лімфобластах (А), RIG1<sup>+</sup> — середніх лімфоцитах (В) та RIG1<sup>+</sup> — малих лімфоцитах (С).

\* — вірогідність відмінностей показників відносно групи контроль ( $p < 0,05$ );  
# — вірогідність відмінностей показників відносно тварин з ЕСЦД ( $p < 0,05$ ).

в 2,4 рази та 77% ( $p < 0,05$ ), у м'якотних тяжках на 58% і в 3,7 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з групою контролю (див. табл. 1). Введення метформіну діабетичним щурам призвело до зростання концентрації RIG1 у лімфобластах та малих лімфоцитах м'якотних тяжків ПЛВ (рис. 2).

Отримані нами результати свідчать про активацію компонентів вродженої імунної системи при розвитку ЦД та співпадають з низкою інших досліджень. Передача сигналів через TLR2 відіграє важливу роль в розвитку ЦД. Так, Kim et al. (2007) показали, що розвиток аутоімунного діабету (як спонтанного, так і стрептозотоцин-індукованого) було помітно уповільнено у TLR2<sup>-/-</sup> мишей, а застосування в умовах стрептозотоцин-індукованого діабету у мишей лінії C57BL/6 агоністу TLR2-Pam3CSK4 — призводить до збільшення у ПЛВ кількості макрофагів, дендритних клітин, прозапальних CD4<sup>+</sup>TNFβ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> та CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> клітин, а також зменшує число регуляторних CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-лімфоцитів [7]. Цікаво, що нещодавнє дослідження, проведене Burrows et al. (2015) показало, що захворюваність діабетом достовірно не відрізнялось у звичайних і TLR2-дефіцитних мишей NOD, якщо вони утримувались в безмікробних умовах [8]. Це говорить про те, що коменсальні мікроорганізми регулюють продіабетичні ефекти TLR2. Тим не менш, інші дослідження показали, що сигналізація через TLR2 може запобігати розвитку ЦД [9]. Зимозан, компонент клітинної стін-

ки грибів, стимулює АПК мишей лінії NOD шляхом взаємодії з TLR2, що активує продукцію супресорних цитокінів IL-10, TGFβ, а також сприяє експансії популяції регуляторних Т-клітин (Treg). У мишей NOD, котрим вводили зимозан, спостерігався менш виражений інсуліт і затримка розвитку гіперглікемії [10]. Подальші дослідження показали, що при введенні зимозану мишам NOD у переддіабетичну або ранню гіперглікемічну стадію найбільш активна стимуляція Foxp3<sup>+</sup>Treg та продукція відмічається в панкреатичних лімфатичних вузлах [11].

Попередні дослідження продемонстрували збільшення мРНК TLR4 в моноцитах у діабетичних мишей лінії NOD і пацієнтів з ЦД1 типу, вказуючи, що сигнальний шлях через TLR4 також тісно пов'язаний з розвитком діабету [12]. Введення моноклональних антитіл до TLR4 блокує початок діабету у NOD мишей і сприяє експансії Treg. Цікаво, що у TLR4<sup>-/-</sup> мишей лінії NOD відмічається прискорений розвиток діабету в порівнянні з мишами NOD дикого типу [13]. Таким чином, TLR4 можуть також функціонувати і в якості толерогенного сигналу в розвитку ЦД. Це було підтверджено Burrows et al. з використанням безмікробних TLR4<sup>-/-</sup> мишей NOD, які не демонструють прискорений розвиток діабету [14]. Це дослідження показує, що захисна дія сигналізації через TLR4, знову ж, як і в випадку TLR2, модулюється коменсальною мікробіотою, LPS якої є лігандами для TLR4 [15].

Разом з TLR, значну роль у виникненні та прогресії аутоімунних захворювань можуть грати й NLR, які локалізовані в цитоплазмі та експресуються в декількох типах клітин — від макрофагів, дендритних клітин (ДК), лімфоцитів до епітеліоцитів [16]. Представник даної родини білок NOD2 є цитоплазматичним сенсором структурних компонентів бактеріального пептидоглікану (PGN) — мураміддипептидів (*muramyl dipeptide* (MDP) — N-acetylmuramyl-l-alanyl-d-isoglutamine), які присутні в PGN практично у всіх грам-позитивних та грам-негативних бактерій [17]. Недавні дослідження F. Costa et al. (2016) показали важливу роль NOD2 в розвитку стрептозотин-індукованого ЦД [18]. Автори показали, що у мишей дефіцитних по NOD2 стрептозотин-індукований ЦД не розвивається, а також порушена індукція Th1 і Th17-клітин в ПЛВ. Передбачається, що саме в ПЛВ NOD2-рецептори активуються лігандами мікрофлори, що транслокується з кишківника, з наступним підвищенням в них рівня IL-6- і IL-12-продукуючих ДК і макрофагів, а також IL-17- і IFN $\gamma$ -продукуючих CD4 $^{+}$  і CD8 $^{+}$  ефекторних Т-клітин.

Нарешті, ще одним важливим представником системи ППП, дизрегуляцію якого пов'язують з можливістю розвитку ЦД, є система RIG-подібних рецепторів (RLR). RLR це система цитоплазматичних сенсорів, які відповідають на вірусну РНК і включають декілька основних компонентів: RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiated-associated gene-5*) та LGP2 (*laboratory of genetic sand physiology-2*), що можуть ініціювати та регулювати вірус-обумовлену продукцію (INF) [19]. RIG-I і MDA5 експресуються як ефекторними, так і регуляторними Т-клітинами, а інфікування щурів лінії BBDR вірусом KRV (*Kilham rat virus*) збільшує рівень IL-12 і транскриптів мРНК IFN $\gamma$  в ПЛВ [20].

Таким чином, отримані результати експериментальних досліджень свідчать про те, що розвиток експериментального стрептозотин-індукованого цукрового діабету змінює характер розподілу TLR2 $^{+/-}$ , TLR4 $^{+/-}$ , NOD2 $^{+/-}$  і RIGI $^{+/-}$ -лімфоцитів у ПЛВ щурів, а введення метформіну здатне корегувати ці порушення.

## ВИСНОВКИ

1. Розвиток діабету супроводжується зростанням кількості TLR2 $^{+/-}$ , TLR4 $^{+/-}$ , NOD2 $^{+/-}$  і RIGI $^{+/-}$ -лімфоцитів у паракортикальній зоні і TLR4 $^{+/-}$  та RIGI $^{+/-}$ -лімфоцитів у м'якотних тяжках панкреатичних лімфатичних вузлів щурів, змінює щільність паттерн-розпізнаючих рецепторів на імунних клітинах.
2. Введення метформіну діабетичним щурам зменшує в ПЛВ чисельність лімфоцитів, експресуючих ППП, за винятком NOD2, впливає на щільність мембранних і концентрацію цитоплазматичних рецепторів вродженого імунітету.

## ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Calderon B, Unanue E. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(1):119-128.doi.org/10.1016/j.coi.2011.11.005
2. Ferretti C, La Cava A. *Autoimmun Rev* 2016; 15(3):236-241.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.11.008
3. Tai N, Wong FS, Wen L. *J Autoimmun* 2016; 71:26-34.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.03.006
4. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. *J Immunol* 2002; 168(9):4531-4537.doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4531
5. Pollizzi KN, Powell JD. *Trends Immunol* 2015; 36(1):13-20.doi.org/10.1016/j.it.2014.11.005
6. Putilin DA, Kamyshnyj OM. *Medychna imunologija* 2016; 18(4):349-356.
7. Kim HS, Han MS, Chung KW, et al. *Immunity* 2007; 27:321-333.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.06.010
8. Burrows MP, Volchkov P, Kobayashi KS, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015:9973-9977.doi.org/10.1073/pnas.1508740112
9. Filippi CM, Ehrhardt K, Estes EA, et al. *J Immunol* 2011; 41:1399-1409.
10. Karumuthil-Meethil S, Perez N, Li R, et al. *Immunol* 2008; 181:8323-8334.doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8323

11. Karumuthil-Melethil S, Sofi MH, Gudi R, et al. *Diabetes* 2015;1341-1357.doi.org/10.2337/db14-1145
12. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, et al. *Endocrinol Metab* 2008;578-583.doi.org/10.1210/jc.2007-2185
13. Bednar KJ, Tsukamoto H, Kachapati K, et al. *Diabetes* 2015;3614-3626.doi.org/10.2337/db14-1868
14. Burrows MP, Volchkov P, Kobayashi KS, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;9973-9977.doi.org/10.1073/pnas.1508740112
15. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, et al. *Nature* 2008; 455:1109-1113.doi.org/10.1038/nature07336
16. Kawai T, Akira S. *Int Immunol* 2009; 21:317-337.doi.org/10.1093/intimm/dxp017
17. Claes AK, Zhou JY, Philpott DJ. *Physiol (Bethesda)* 2015; 30:241-250.doi.org/10.1152/physiol.00025.2014
18. Costa FR, Franzo MC, de Oliveira GG, et al. *J Exp Med* 2016; 213(7):1223-39.doi.org/10.1084/jem.20150744
19. Wada J, Makino H. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(1):13-26.doi.org/10.1038/nrneph.2015.175
20. Needell JC, Zipris D. *Curr Diab Rep* 2016; 16(10):89-97.doi.org/10.1007/s11892-016-0781-z

## ЕКСПРЕСІЯ РЕЦЕПТОРІВ ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ЛІМФОЦИТАМИ ПАНКРЕАТИЧНИХ ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ПІСЛЯ ВВЕДЕНЬ МЕТФОРМІНУ

Путілін Д. А., Камишний О. М., Сухомлінова І. Є., Камишна В. А.

*Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, Україна  
des.doctor@mail.ru; alexkamyshny@yandex.ru*

В розвитку цукрового діабету (ЦД) 1 типу критичну роль можуть грати зміни експресії цілої низки паттерн-розпізнаючих рецепторів: мембранних та ендосомальних толл-подібних рецепторів, цитоплазматичних NOD-подібних рецепторів, сенсорів вірусних РНК RIG-подібних рецепторів. Метою роботи було з'ясувати характер розподілу TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup>, NOD2<sup>+</sup> і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у панкреатичних лімфатичних вузлах щурів з експериментальним стрептозоточин-індукованим цукровим діабетом і після введення метформіну. Для ідентифікації імунопозитивних лімфоцитів застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод з використанням моноклональних або поліклональних антитіл до відповідних паттерн-розпізнаючих рецепторів. Розвиток діабету супроводжується зміною кількості імунопозитивних лімфоцитів, а введення метформіну діабетичним щурам змінює чисельність лімфоцитів і впливає на щільність та концентрацію рецепторів вродженого імунітету.

**Ключові слова:** паттерн-розпізнаючі рецептори, панкреатичні лімфатичні вузли, вроджений імунітет, цукровий діабет.

## ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЛИМФОЦИТАМИ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ МЕТФОРМИНА

Путилин Д. А., Камышный А. М., Сухомлинова И. Е., Камышная В. А.

*Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина  
des.doctor@mail.ru; alexkamyshny@yandex.ru*

В развитии сахарного диабета (СД) 1 типа критическую роль могут играть изменения экспрессии целого ряда паттерн-распознающих рецепторов: мембранных и эндосомальных толл-подобных рецепторов, цитоплазматических NOD-like рецепторов, сенсоров вирусных РНК RIG-подобных рецепторов. Целью работы было выяснить характер распределения TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup>, NOD2<sup>+</sup> и RIGI<sup>+</sup>-лимфоцитов в панкреатических лимфатических узлах крыс с экспериментальным стрептозоточин-индуцированным сахарным диабетом и после введения метформина. Для идентификации иммунопозитивных лимфоцитов применяли непрямой иммунофлюоресцентный метод с использованием моноклональных или поликлональных антител к соответствующим паттерн-распознающим рецепторам. Развитие диабета сопровождается изменением количества иммунопозитивных лимфоцитов, а введение метформина диабетическим крысам изменяет количество лимфоцитов и влияет на плотность и концентрацию рецепторов врожденного иммунитета.

**Ключевые слова:** паттерн-распознающие рецепторы, панкреатические лимфатические узлы, врожденный иммунитет, сахарный диабет.

**EXPRESSION OF RECEPTORS OF INNATE IMMUNITY BY LYMPHOCYTES OF PANCREATIC LYMPH NODES AT EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES AND AFTER INTRODUCTION OF METFORMIN**

D. A. Putilin, O. M. Kamyshnyi, I. Ye. Sukhomlinova, V. A. Kamyshna

*Zaporizhzhia State Medical University, Zaporozhye, Ukraine  
des.doctor@mail.ru; alexkamyshny@yandex.ru*

The change of the expression of a variety of pattern-recognizing receptors: membrane and endosomal Toll-like receptors, cytoplasmic NOD-like receptors, viral RNA sensors such as the RIG-like receptors may play a critical role in the development of the type 1 diabetes mellitus (DM). The purpose of the thesis was to find out the pattern of distribution of TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- and RIGI<sup>+</sup>-lymphocytes in pancreatic lymph nodes of rats with experimental streptozotocin-induced diabetes after introduction of metformin. The indirect immunofluorescence method with the use of monoclonal or polyclonal antibodies to the respective pattern-recognizing receptors was used to identify the immunopositive lymphocytes. The development of diabetes is accompanied by the change in the number of immunopositive lymphocytes, and the introduction of metformin to diabetic rats changes the number of lymphocytes and affects the density and concentration of receptors of innate immunity.

**Key words:** pattern recognition receptor, pancreatic lymph nodes, innate immunity, diabetes mellitus.