

АНАЛИЗ ЦИТОАРХИТЕКТониКИ TLR2⁺ И TLR4⁺ ЛИМФОЦИТОВ И ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-REL*, *TNFα* И *TNFr* В КАЛТ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЙ ПЕНТОКСИФИЛЛИНА

Деген А.С.¹, Коваль Г.Д.², Сухомлинова И.Е.¹, Морозова О.В.¹, Камышный А.М.¹

¹ Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

² Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

Резюме. Критически важными в развитии СД 1 типа являются изменения состояния кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) и состава микробиома кишечника как в условиях экспериментального STZ-индуцированного диабета, так и при развитии СД 1 типа у людей и хронического воспаления за счет стимуляции врожденного звена иммунитета. Одним из наиболее важных посредников во взаимодействии между кишечным микробиомом и КАЛТ являются специализированные М-клетки фолликул-ассоциированного эпителия, обеспечивающие трансцитотическую доставку антигенов подлежащим лимфоидным структурам. Вспомогательную роль в образовании М-клеток играет и TNFα-сигнализация. Поэтому целью нашей работы было изучение особенностей экспрессии TLRs и транскрипционной активности генов *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* и *TNFr* в КАЛТ при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) и после введения пентоксифиллина. Для идентификации TLR2⁺ клеток и TLR4⁺ клеток применяли иммунофлюоресцентный метод с использованием моноклональных антител к соответствующим паттерн-распознающим рецепторам. Для изучения транскрипционной активности генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР). В ходе развития экспериментальной патологии длительностью 2 и 4 недели наблюдалось снижение суммарной плотности TLR2⁺ и TLR4⁺ лимфоцитов в СПСОВ и ИЛФ подвздошной кишки крыс. При этом плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток увеличивалась у малых, а TLR4 – у средних и малых лимфоцитов. Введение пентоксифиллина диабетическим крысам приводило к снижению суммарной плотности TLR2⁺ клеток на 2-й неделе развития патологии и к увеличению данного показателя на 4-й неделе. Суммарная плотность TLR4⁺ клеток демонстрировала динамику к росту только в СПСОВ на 2-й неделе развития ЭСД на фоне введения пентоксифиллина. Изменения плотности TLR2 и TLR4 на поверхности лимфоцитов носили разнонаправленный характер. Развитие диабета нашло свое отражение и в транскрипционной индукции генов ключевых транскрипционных факторов NF-κB1 и c-Rel в клетках КАЛТ как на 2-й, так и на 4-й неделе развития ЭСД. Тогда как введение пентоксифиллина достоверно снижало уровень нормализованной экспрессии мРНК NF-κB1 в течение всего срока наблюдений и увеличивало данный показатель для мРНК c-Rel на 2-й неделе. Отмечен рост нормализованной

Адрес для переписки:

Деген Анна Сергеевна
Запорожский государственный медицинский университет
69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26.
Тел.: +38 (067) 935-45-83, (099) 069-52-28.
E-mail: annadegenjena@gmail.com

Address for correspondence:

Degen Anna S.
Zaporozhye State Medical University
69035, Ukraine, Zaporozhye, Mayakovsky ave., 26.
Phone: +38 (067) 935-45-83, (099) 069-52-28.
E-mail: annadegenjena@gmail.com

Образец цитирования:

А.С. Деген, Г.Д. Коваль, И.Е. Сухомлинова, О.В. Морозова, А.М. Камышный «Анализ цитоархитектоники TLR2⁺ и TLR4⁺ лимфоцитов и транскрипционной активности генов *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* и *TNFr* в КАЛТ крыс при экспериментальном сахарном диабете и после введений пентоксифиллина» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 5. С. 821-834. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-821-834

© Деген А.С. и соавт., 2019

For citation:

A.S. Degen, G.D. Koval, I.E. Sukhomlinova, O.V. Morozova, A.M. Kamyshnyi "Analysis of cytoarchitectonics of TLR2⁺ and TLR4⁺ lymphocytes and transcriptional activity of the genes *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* and *TNFr* in GALT of rats in experimental diabetes mellitus and after pentoxifylline administration", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2019, Vol. 21, no. 5, pp. 821-834. doi: 10.15789/1563-0625-2019-5-821-834

DOI: 10.15789/1563-0625-2019-5-821-834

экспрессии маркеров М-клеток Gp2 и Spi-B как на 2-й, так и на 4-й неделе развития экспериментальной патологии. Введение пентоксифиллина диабетическим животным в большей степени нашло свое отражение в изменении интенсивности экспрессии мРНК маркера зрелых М-клеток Gp2 – данный показатель увеличивался на 2-й неделе развития патологии, а на 4-й демонстрировал динамику к снижению. Развитие ЭСД приводило к достоверному повышению уровня нормализованной экспрессии провоспалительного цитокина TNF α и его рецептора TNFr и демонстрировало динамику к снижению на фоне введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, TLR2, TLR4, М-клетки, пентоксифиллин

ANALYSIS OF CYTOARCHITECTONICS OF TLR2⁺ AND TLR4⁺ LYMPHOCYTES AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE GENES *Gp2*, *Spi-B*, *Nf- κ B1*, *c-REL*, *TNF α* AND *TNFr* IN GALT OF RATS IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS AND AFTER PENTOXIFYLLINE ADMINISTRATION

Degen A.S.^a, Koval G.D.^b, Sukhomlinova I.E.^a, Morozova O.V.^a, Kamyshnyi A.M.^a

^a Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

^b Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

Abstract. Changes in the state of gut-associated lymphoid tissue (GALT) and the composition of the intestinal microbiome, both in experimental STZ-induced diabetes and in development of type 1 diabetes in humans as well as chronic inflammation due to stimulation of innate immunity are crucially important in the development of type 1 diabetes mellitus. One of the most important mediators for interactions between the intestinal microbiome and GALT are specialized M cells of the follicle-associated epithelium, providing transcytotic delivery of antigens to the underlying lymphoid structures. TNF α -signaling also plays a supporting role in the formation of M cells. Therefore, the aim of our work was to study some features of TLRs expression and transcriptional activity of the *Gp2*, *Spi-B*, *Nf- κ B1*, *c-Rel*, *TNF α* and *TNFr* genes in GALT in experimental diabetes mellitus (EDM), and after pentoxifylline administration. To identify TLR2⁺ cells and TLR4⁺ cells, an immunofluorescence method was used with monoclonal antibodies to corresponding pattern-recognizing receptors. To study the transcriptional activity of genes, the method of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used. In the course of developing experimental pathology, at the terms of 2 and 4 weeks, a decrease in the total density of TLR2⁺ and TLR4⁺ lymphocytes was observed in lamina propria of villus (villus) and subepithelial zone isolated lymphoid follicles (ILF) of rat ileum. At the same time, the density of TLR2 on the membrane of immunopositive cells was increased for small lymphocytes, and TLR4 density has become higher in medium and small lymphocytes. The pentoxifylline administration to diabetic rats resulted in a decrease in the total density of TLR2⁺ cells at the 2nd week of development of the pathology, and an increase in this index at the 4th week. The total density of TLR4⁺ cells showed changing growth rates only in villus at the 2nd week of EDM development in the presence of pentoxifylline. Changes in the density of TLR2 and TLR4 on the surface of lymphocytes were multidirectional. The development of diabetes is also reflected in the transcriptional induction of genes of the key transcription factors NF- κ B1 and c-Rel in GALT cells at both the 2nd and 4th week of the development of EDM. Meanwhile, administration of pentoxifylline resulted in a significantly reduced level of normalized expression of NF- κ B1 mRNA during the entire observation period and increased this indicator for c-Rel mRNA at the 2nd week. The growth of normalized expression of markers of M cells Gp2 and Spi-B was observed both on the 2nd and on the 4th week of the development of experimental pathology. Administration of pentoxifylline to diabetic animals was largely reflected in the change in the intensity of mRNA expression of the mature M cell Gp2 marker. This parameter was increased during the 2nd week of developing pathology, and on the 4th week, a downward trend was shown. The development of EDM led to a significantly increased level of near-normalized expression of proinflammatory TNF α cytokine and its receptor TNFr, and demonstrated a trend towards their decrease following pentoxifylline administration in diabetic animals.

Keywords: experimental diabetes mellitus, gut-associated lymphoid tissue, TLR2, TLR4, M cells, pentoxifylline

Введение

Помимо генетической предрасположенности, триггерами развития СД 1 типа являются изменения состояния кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ) и состава микробиома кишечника как индуктора развития феномена «подтекания» (“leaky gut”) слизистой ЖКТ и хронического воспаления за счет стимуляции врожденного звена иммунитета [4]. Ряд исследователей указывает на изменения состава кишечного микробиота как в условиях экспериментального STZ-индуцированного диабета, так и при развитии СД 1 типа у людей [20, 22, 27], что приводит к закономерному изменению уровня микроб-ассоциированных молекулярных паттернов (МAMP) для рецепторов врожденного иммунитета (РВИ).

Ранее мы показали изменения экспрессии NOD-подобных рецепторов (NLR), являющихся сенсорами структурных компонентов бактериального пептидогликана – мурамилдипептидов [1], а также сенсоров вирусной РНК RIG-I-рецепторов в КАЛТ крыс при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) [5]. Кроме того, еще одним критическим триггером старта и прогрессии СД 1 типа является изменение интенсивности экспрессии мембранных Toll-подобных рецепторов (TLRs). В последние годы описана конститутивная экспрессия TLR-клетками адаптивного звена иммунного ответа, а именно Т-лимфоцитами [9]. При этом TLR2 и TLR4, распознающие лиганды практически всего микробного мира, передают активационный сигнал через адапторные молекулы MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, что приводит к формированию активных димеров ядерного фактора NF-κB – RelA (p65), c-Rel, RelB и белков-предшественников NF-κB1 (p105) и NF-κB2 (p100). Димеры NF-κB далее транспортируются в ядро и индуцируют транскрипцию генов провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNFα, IL-1β, IL-18, IL-12, IL-6, CXCL8), костимулирующих молекул (CD40, CD80 и CD86) [10].

Среди таких NF-κB-индуцируемых цитокинов важную роль в старте и прогрессии СД 1 типа играет TNFα, основным источником которого являются макрофаги и активированные Т-лимфоциты КАЛТ [23]. У NOD-мышей, дефицитных по TNFR1, наблюдается устойчивость к старту СД 1 типа, а инсулит протекает в более легкой форме. Вместе с тем у данных животных отмечалось увеличение количества Treg и усиление их супрессорной активности. Возможно, что блокада TNF-сигналинга – это один из механизмов активизации функций Treg и супрессии СД 1 типа [8]. Одним из неселективных блокаторов TNFα является пентоксифиллин.

Критически важным посредником во взаимодействии между кишечным микробиомом и КАЛТ являются специализированные М-клетки фолликул-ассоциированного эпителия [19], способные фагоцитировать макромолекулы и микроорганизмы, доставляя их подлежащим лимфоидным структурам для индукции иммунных реакций. На апикальной мембране М-клеток экспрессируется гликопротеин Gp2 [21], а их дифференцировку регулирует транскрипционный фактор Spi-B [25]. Важную вспомогательную роль в образовании М-клеток играет и TNFα-сигнализация [29]. Поэтому **целью нашей работы** было изучение особенностей экспрессии TLRs и транскрипционной активности генов *Gp2*, *Spi-B*, *Nf-κB1*, *c-Rel*, *TNFα* и *TNFR* в КАЛТ при экспериментальном сахарном диабете (ЭСД) и после введения пентоксифиллина.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 80 самцах крыс линии Wistar. Животные были получены из питомника ООО «Биомодельсервис» (Киев). Экспериментальные животные были разделены на 5 экспериментальных групп: контрольные крысы, которым однократно внутривентрально вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH = 4,5) (группа 1); крысы с 14-дневным ЭСД (группа 2); крысы с 28-дневным ЭСД (группа 3); крысы с 14-дневным (группа 4) и с 28-дневным ЭСД (группа 5), которым перорально ежедневно в течение, соответственно, 2 и 4 недель вводили пентоксифиллин в дозе 9 мг/кг, начиная с 1 дня индукции диабета. Стрептозотоцин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили крысам внутривентрально в дозе 50 мг/кг, разведенным в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 4,5) перед моментом введения. Определение концентрации глюкозы в крови, которую брали из хвостовой вены, проводили глюкозооксидазным методом с использованием прибора BIONIME Rightest GM 110 (Швейцария) через 12 часов и на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 и 28 суток после инъекции STZ. Измерение уровня гликемии проводили через 6 часов с момента последнего приема пищи. На 3 сутки после введения стрептозотоцина для дальнейших исследований отбирали животных с уровнем гликемии натощак > 8,0 ммоль/л.

Структуру популяции TLR2- и TLR4-клеток изучали на основе анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы подвздошной кишки, которые потом депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию

в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (рН = 7,4) и инкубировали с первичными кроличьими моноклональными антителами (МКАТ) к TLR2- и TLR4-рецепторам крысы, конъюгированными с FITC (Santa Cruz Biotechnology, США) в течение 18 часов во влажной камере при $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (9:1) для дальнейшего изучения при помощи люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали при помощи компьютерной программы ImageJ (НИН, США). Изображение, полученное на микроскопе PrimoStar (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) при помощи высокочувствительной камеры AxioCam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивации и подготовки изображений к публикации AxioVision 4.7.2 (ZEISS Германия), немедленно вводилось в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись зоны со статистически значимой флюоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих TLR2 и TLR4. Определялись морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток, абсолютная (количество клеток на 1 мм² площади среза) и относительная (%) плотность распределения TLR2- и TLR4-лимфоцитов. Плотность TLR2- и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов определяли, учитывая интенсивность флюоресценции идентифицированных клеток и неспецифическую флюоресценцию препарата (так называемый фон). На основании этих показателей вычислялась скорректированная клеточная флюоресценция (в условных единицах интенсивности флюоресценции УЕИФ): Integrated Density (интегрированная плотность) – (площадь выделенных клеток × среднюю флюоресценцию фона). При окрашивании МКАТ определяли TLR2- и TLR4-клетки, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) и в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ), которые являются, соответственно, эффекторными и индуктивными зонами иммунного ответа в КАЛТ.

Для анализа экспрессии генов использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР). В ходе этого исследования кусочки ткани, залитые в парафин, нарезали на микротоме (толщина среза 15 мкм) и помещали в пробирки Эппендорфа (Eppendorf AG, Германия) депарафинировали путем инкубации последовательно, дважды в ксилоле, по 5 минут каждый, затем последовательно, дважды в 100% этаноле, в течение 5 минут каждый.

Выделение тотальной РНК из тканей крыс проводили согласно протоколу с использованием набора Trizol RNA Prep 100 («ИЗОГЕН», РФ), который содержит следующие реагенты: Trizol reagent и ExtraGene E. Концентрацию и качество выделенной тотальной РНК определяли на спектрофотометре Libra S32PC (Biochrom Ltd., Великобритания). Для последующей процедуры обратной транскрипции отбирали образцы РНК со следующими показателями (по соотношениям оптической плотности A260 / A280): 260 нм/280 нм = 2, 260 нм/230 нм = 1,8-2,2.

Для обратной транскрипции (синтез кДНК) использовали «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ)» («СИНТОЛ», РФ). RT-PCR проводили на конечном объеме 25 мкл, содержащем 10 мкл готовой реакционной смеси 2,5X, 11 мкл деионизированной H₂O, 1 мкл праймеров Random-6, 1 мкл обратной транскриптазы и 2 мкг РНК. Обратную транскрипцию проводили при 45 °С в течение 45 минут с последующим нагреванием в течение 5 мин при 92 °С. Амплификацию проводили на приборе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с мастер-миксом Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК-полимеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H₂O. Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследованных и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой Metabion (Германия) (см. табл. 1).

После начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °С амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при таких условиях: денатурация – 95 °С, 15 с, отжиг – 59-61 °С, 30-60 с, элонгация – 72 °С, 30 с. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследованных генов был использован ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли по методу Ct. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент были включены негативные контроли: без добавления кДНК-матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК-матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в син-

ТАБЛИЦА 1. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

TABLE 1. SPECIFIC PRIMERS WHICH WERE USED IN REAL-TIME RT-PCR

Ген Gen	Нуклеотидная последовательность праймера Nucleotide sequence of the primer	T_{m1} , °C T_{m2} , °C	Длина продукта ПЦР, п. н. PCR product length, n. p.	Экзон-экзонный стык Exon-exon joint
<i>Gp2</i>	F = ACTCCCCGAAGTACAGGGTT R = AGACAGGCAGGAAGAACGTG	60 60	55	1633/1634
<i>SpiB</i>	F = GAACCACCATGCTTGCTCTG R = TCTGGGTACTGCAAACAGCTT	59 60	70	59/60
<i>Nfkb1</i>	F = ATATGCACCGTGACAGCAGG R = GTTTGCAAAGCCAACCACCA	60 60	51	752/753
<i>cRel</i>	F = GTCAAGGGAAGGAGCTGTCTG R = GGATTATATCCGCCGAGCCC	60 60	41	64/65
<i>Tnf</i> (<i>TNFA</i>)	F = CTCGAGTGACAAGCCCGTAG R = GCTTGGTGGTTTGCTACGAC	60 60	45	433/434
<i>Tnfrsf1a</i> (<i>TNFR</i>)	F = AACGGCTTGACACTGCAGAC R = CACAGCATACAGCATCGCAG	61 60	41	1315/1316
<i>GAPDH</i> (NM_017008.4)	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/826

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; T_m – температура плавления.

Note. F, direct primer; R, reverse primer; T_m , melting point.

тезе кДНК. Все реакции амплификации проводили на индивидуальных образцах в трех повторах.

Все полученные экспериментальные данные обрабатывались на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ Excel из пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), Statistica 13 (TIBCO Software Inc., 2018). Для всех показателей рассчитывали значения средней арифметической выборки (M), ее дисперсии и ошибки средней (m). Для определения достоверности отличий результатов исследования в экспериментальных и контрольных группах животных определяли коэффициент Стьюдента (t), потом определяли вероятность разницы выборок (p) и доверительный интервал средней. Критичный уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

Введение экспериментальным животным STZ приводило к развитию ЭСД. Таким образом, на второй неделе развития патологического процесса концентрация глюкозы в крови у крыс линии Wistar увеличивалась в 3,1 раза ($9,78 \pm 0,71$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($3,13 \pm 0,12$ ммоль/л), на 28-й день увеличивалась в 2,1 раза ($6,48 \pm 0,84$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($3,13 \pm 0,12$ ммоль/л). А также появлялись все основные симптомы, характерные для сахарного диабета 1 типа (полидипсия, гиперфагия и полиурия). Изучение

серийных срезов подвздошной кишки контрольных крыс линии Wistar, предварительно инкубированных с МКАТ к TLR2 рецепторам крысы показало, что суммарная плотность TLR2⁺ клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) составляла 70 ± 1 на 1 мм², что приблизительно совпадает с их количеством и в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ) (рис. 1А).

Развитие диабета сопровождалось снижением суммарной плотности TLR2⁺ клеток в СПСОВ на 37% ($p < 0,05$) на 14-й день и в 2,3 раза ($p < 0,05$) на 28-й день экспериментального сахарного диабета, а в ИЛФ на 26% ($p < 0,05$) на 14-й день и в 2,1 раза ($p < 0,05$) на 28-й день экспериментального сахарного диабета по сравнению с контролем (рис. 1А).

Введение диабетическим животным пентоксифиллина сопровождалось достоверным снижением суммарной плотности популяции TLR2⁺ клеток в СПСОВ на 41% ($p < 0,05$) на 14-й и увеличением этого показателя на 81% ($p < 0,05$) на 28-й день развития ЭСД (рис. 1Б). На фоне введения пентоксифиллина наблюдались изменения и в субэпителиальной зоне ИЛФ. Так, суммарная плотность популяции TLR2⁺ клеток на 2-й неделе развития патологии снижалась на 14% ($p < 0,05$), но уже на 4 неделе возрастала на 84% ($p < 0,05$) по сравнению с группами диабетических животных, которым препарат не вводили (рис. 1Б).

Измерение интенсивности флюоресценции TLR2⁺ клеток, что отображает плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток, показало достоверное снижение данного параметра в ходе развития диабета у TLR2⁺ лимфобластов в СПСОВ (на 11-12%, $p < 0,05$) на 2-й и на 4-й неделе (рис. 2А) и у TLR2⁺ средних лимфоцитов (на 4%, $p < 0,05$) на 4-й неделе развития ЭСД (рис. 2Б) по сравнению с контролем, а у TLR2⁺ малых лимфоцитов этот показатель увеличивался на 4% ($p < 0,05$) на 14-й день развития экспериментальной патологии (рис. 2В). Введение диабетическим животным пентоксифиллина нашло отображение в незначительном увеличении интенсивности флюоресценции TLR2⁺ средних лимфоцитов на 2-3% ($p < 0,05$) на 2-й и 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (рис. 2Б).

В субэпителиальной зоне ИЛФ наблюдались схожие изменения при развитии экспериментальной патологии по сравнению с контролем: снижалась интенсивность флюоресценции у TLR2⁺ лимфобластов и TLR2⁺ средних лимфоцитов на 28-й день развития ЭСД (на 10% и 4%, $p < 0,05$ соответственно) (рис. 2А, Б), однако этот показатель увеличивался у TLR2⁺ малых лимфоцитов на 2% ($p < 0,05$) на 14-й день развития ЭСД (рис. 2В). Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к разнонаправленным изменениям интенсивности флюоресценции TLR2⁺ клеток: снижалась у TLR2⁺ лимфобластов на 4% ($p < 0,05$) на 14-й день развития ЭСД (рис. 2А), увеличивалась у TLR2⁺ средних лимфоцитов (на 2-6%, $p < 0,05$) на 2-й и 4-й неде-

ле (рис. 2Б) и у TLR2⁺ малых лимфоцитов (на 6%, $p < 0,05$) на 4-й неделе (рис. 2В) развития патологии по сравнению с аналогичными показателями у интактных диабетических животных.

Изучение серийных срезов подвздошной кишки контрольных крыс линии Wistar, предварительно инкубированных с МКАТ к рецептору TLR4, показало, что суммарная плотность TLR4⁺ клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (СПСОВ) составляла 60 ± 1 на 1 мм^2 , что приблизительно совпадает с их количеством и в субэпителиальной зоне изолированных лимфоидных фолликулов (ИЛФ) – 54 ± 3 на 1 мм^2 (рис. 3А).

Развитие диабета сопровождается снижением суммарной плотности TLR4⁺ клеток в СПСОВ на 27% ($p < 0,05$) на 14-й день и на 25% ($p < 0,05$) на 28-й день экспериментального сахарного диабета, а в ИЛФ на 24% ($p < 0,05$) на 28-й день экспериментального сахарного диабета по сравнению с контролем (рис. 3А).

Введение диабетическим крысам линии Wistar пентоксифиллина сопровождалось достоверным увеличением плотности популяции TLR4⁺ клеток в СПСОВ на 14-й день развития ЭСД на 30% ($p < 0,05$) по сравнению с интактными диабетическими животными (рис. 3Б).

Измерение интенсивности флюоресценции TLR4⁺ клеток, что отражает плотность TLR4 на мембране иммунопозитивных клеток, показало следующие изменения. В СПСОВ достоверно увеличивался этот показатель у TLR4⁺ средних лимфоцитов на 1,4% ($p < 0,05$) и на 4% ($p < 0,05$) на 14-й и 28-й день развития ЭСД соответственно

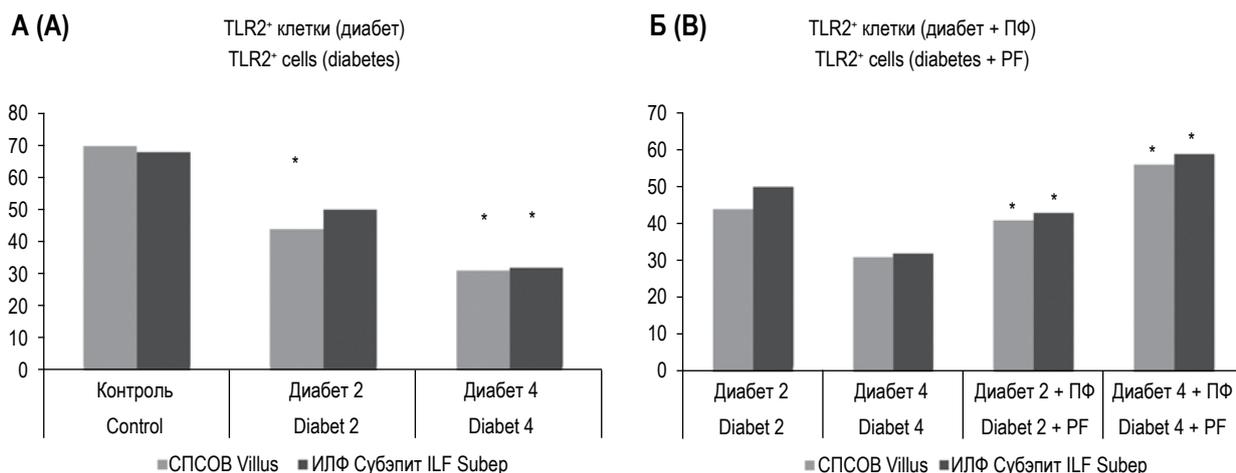


Рисунок 1. Суммарная плотность (на 1 мм^2) TLR2⁺ клеток в СПСОВ (villus) и субэпителиальной зоне ИЛФ (ILF Subep) при развитии диабета (2 и 4 недели) и введения пентоксифиллина (PF) диабетическим животным
Примечание. * – $p < 0,05$.

Figure 1. Total density (per 1 мм^2) of TLR2⁺ cells in lamina propria of villus mucous layer (Villus) and in subepithelial zone of the ILF (ILF Subep) during the development of diabetes (2 and 4 weeks) and the administration of pentoxifylline (PF) to diabetic animals
Note. *, $p < 0,05$.

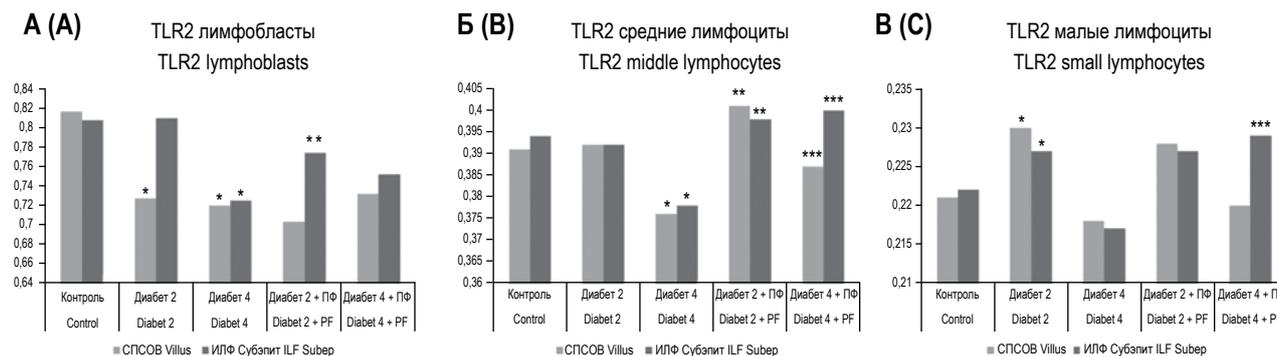


Рисунок 2. Плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток ($E_{\text{иф}}$)

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – $p < 0,05$ по отношению к диабету 2; *** – $p < 0,05$ по отношению к диабету 4.

Figure 2. Density of TLR2 on the membrane of immunopositive cells (fluorescence intensity in arbitrary units, AU)

Note. *, $p < 0.05$ relative to the control; **, $p < 0.05$ relative to the diabetes 2; ***, $p < 0.05$ relative to the diabetes 4.

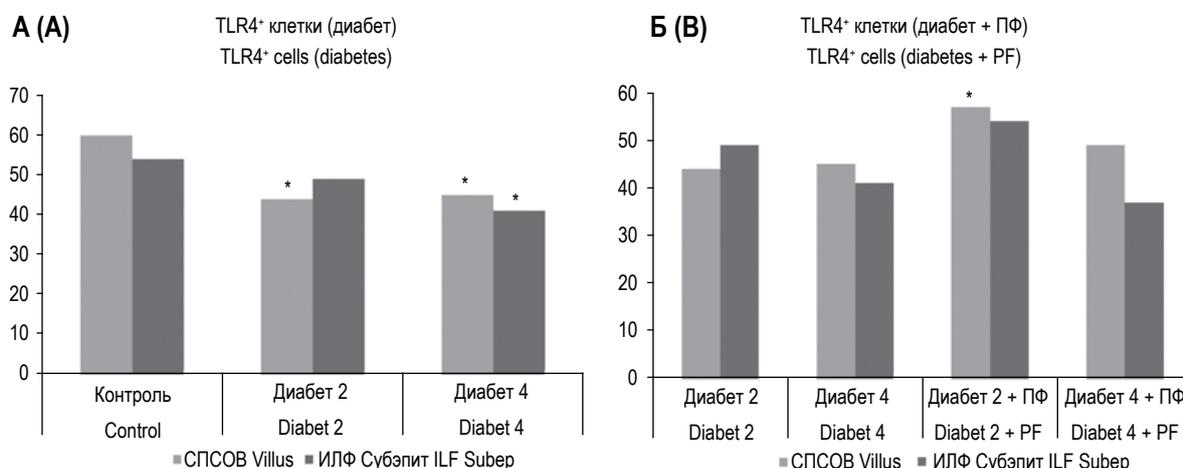


Рисунок 3. Суммарная плотность (на 1 мм²) TLR4⁺ клеток в СПСОВ (Villus) и субэпителиальной зоне ИЛФ (ILF Subep) при развитии диабета (2 и 4 недели) и введения пентоксифиллина (PF) диабетическим животным

Примечание. * – $p < 0,05$.

Figure 3. Total density (per 1 mm²) of TLR4⁺ cells in lamina propria of villus mucous layer (Villus) and in subepithelial zone of the ILF (ILF Subep) during the development of diabetes (2 and 4 weeks) and the administration of pentoxifylline (PF) to diabetic animals

Note. *, $p < 0.05$.

(рис. 4Б), а у TLR4⁺ малых лимфоцитов на 4,2% ($p < 0,05$) и на 5,2% ($p < 0,05$) в этих же группах экспериментальных животных (рис. 4В). Аналогичные изменения наблюдались и в ИЛФ: на 4-й неделе развития экспериментального СД увеличивалась интенсивность флюоресценции TLR4⁺ средних лимфоцитов и TLR4⁺ малых лимфоцитов на 4% ($p < 0,05$) (рис. 4Б, В). Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к достоверным изменениям интенсивности флюоресценции только у TLR4⁺ средних лимфоцитов в СПСОВ (рис. 4Б). Этот показатель увеличивался на 2,6% ($p < 0,05$) на 14-й день и снижался на 2,5% ($p < 0,05$) на 28-й день развития патологии по сравнению с диабетическими животными, которые препарат не получали.

Изучение транскрипционной активности гена *Gp2* в клетках подвздошной кишки крыс на 2-й неделе развития диабета показало увеличение концентрации mRNA в 3,2 раза, а на 4-й неделе – в 2,2 раза по сравнению с контрольной группой животных (рис. 5А). Уровень нормализованной экспрессии mRNA *Sp1-B* также демонстрировал динамику к увеличению на фоне развития экспериментального диабета у животных. Так, на 14-й день развития патологии этот показатель увеличивался в 2,1 раза, а на 28-й день – в 2 раза по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 5Г).

Введение экспериментальным животным пентоксифиллина приводило к росту уровня экспрессии *Gp2* в 6,8 раза на 2-й неделе развития ЭСД по сравнению с диабетическими интактными

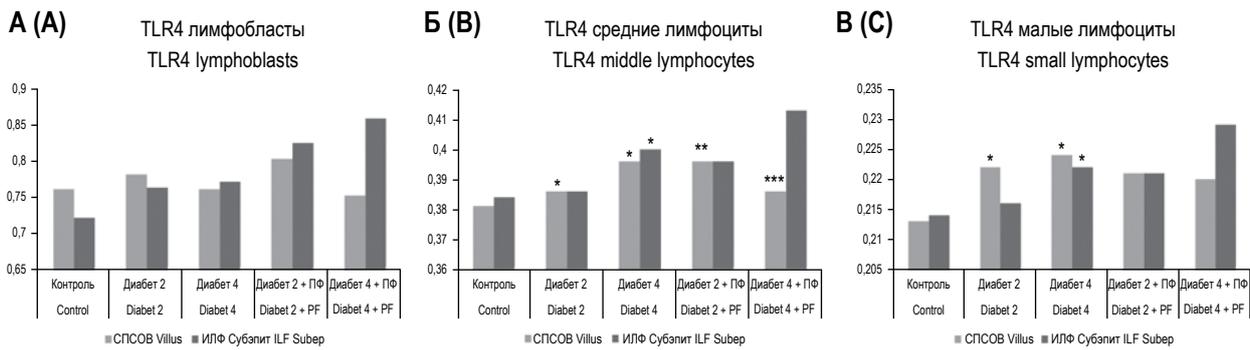


Рисунок 4. Плотность TLR4 на мембране иммунопозитивных клеток ($E_{иф}$)

Примечание. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** – $p < 0,05$ по отношению к диабету 2; *** – $p < 0,05$ по отношению к диабету 4.

Figure 4. Density of TLR4 on the membrane of immunopositive cells (fluorescence intensity in arbitrary units, AU)

Note. *, $p < 0.05$ relative to the control; **, $p < 0.05$ relative to the diabetes 2; ***, $p < 0.05$ relative to the diabetes 4.

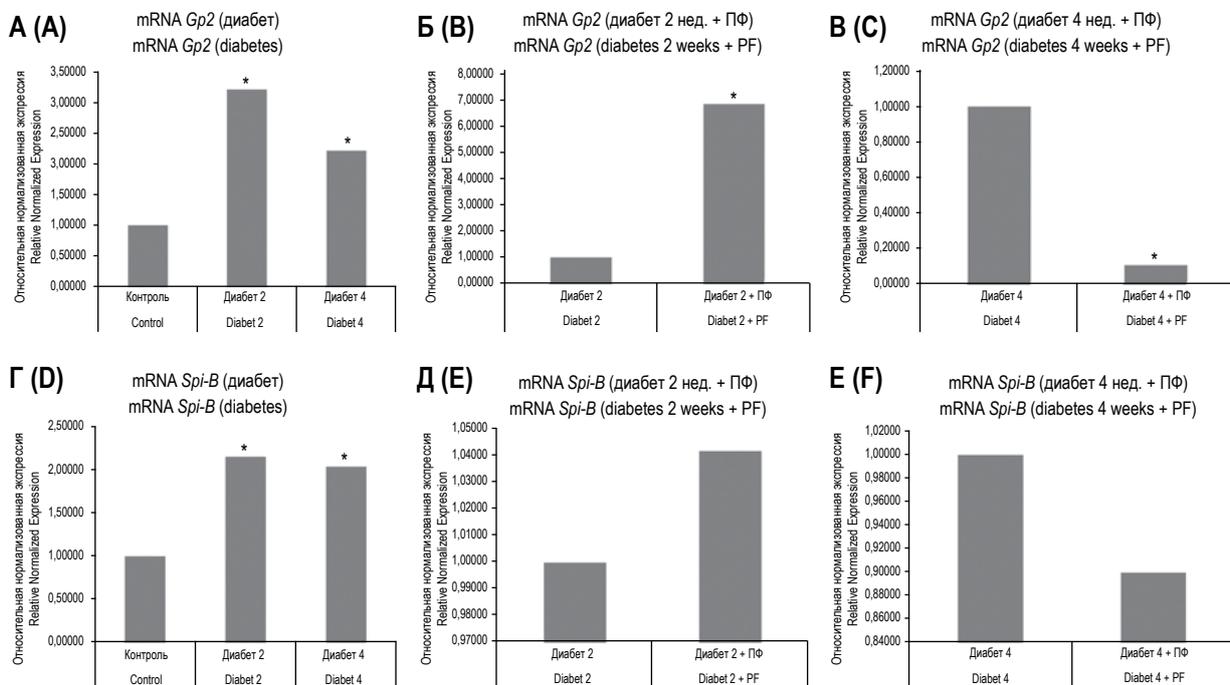


Рисунок 5. Относительное нормализованное количество мРНК генов Grp2 и Spi-B в клетках подвздошной кишки крыс

Примечание. Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном GAPDH. Диабет 2, диабет 4 – 2- и 4-недельный ЭСД соответственно; диабет 2 + ПФ, диабет 4 + ПФ – после введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Figure 5. Relative normalized expression of mRNA of Grp2 and Spi-B genes in rat ileum cells

Note. Normalization by the $\Delta\Delta Ct$ method with the GAPDH reference gene. Diabetes 2, diabetes 4 – 2 and 4 week experimental diabetes mellitus, respectively; diabetes 2 + PF, diabetes 4 + PF – after the administration of pentoxifylline to a diabetic animal.

ми животными (продолжительность ЭСД 2 недели) (рис. 5Б) и достоверному снижению уровня mRNA Grp2 в 10 раз на 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (продолжительность ЭСД 4 недели) (рис. 5В).

Введение экспериментальным животным пентоксифиллина не показало достоверного

влияния на уровень экспрессии mRNA Spi-B (рис. 5Д, Е).

Изучение относительной нормализованной экспрессии гена *Nf-κB1* в клетках подвздошной кишки крыс на 2-й неделе развития диабета показало увеличение концентрации mRNA в 10,7 раза, а на 4-й неделе – в 5,2 раза по сравнению с контрольной группой животных (рис. 6А).

Транскрипционная активность гена *c-Rel* также демонстрировала тенденцию к росту на фоне развития ЭСД. Так, на 14-й день развития диабета этот показатель увеличивался в 3,6 раза, а на 28-й день – в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой экспериментальных животных (рис. 6Г).

Введение экспериментальным животным пентоксифиллина приводило к снижению уровня экспрессии NF-κB1 в 3,2 раза на 2-й неделе развития ЭСД по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 6Б), а также к достоверному снижению уровня mRNA NF-κB1 в 5 раз на 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 4 недели) (рис. 6В).

Уровень нормализованной экспрессии *c-Rel* на фоне введения диабетическим животным пентоксифиллина показал достоверные изменения только на 14-й день развития патологического процесса – показатель увеличивался в 7,8 раза по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 6Д).

Уровень относительной нормализованной экспрессии mRNA TNFα в клетках подвздошной

кишки крыс на фоне развития ЭСД по сравнению с контрольной группой демонстрировал тенденцию к росту – в 31 раз на 2-й неделе развития патологического процесса и в 13,7 раза на 4-й неделе (рис. 7А). Уровень экспрессии mRNA TNFα, в свою очередь, показал достоверные изменения лишь на 14-й день развития экспериментальной патологии. Этот показатель увеличивался в 2,9 раза по сравнению с контрольными животными (рис. 7Г).

Введение диабетическим животным пентоксифиллина приводило к снижению транскрипционной активности гена *TNFα* в 9 раз на 2-й неделе развития ЭСД по сравнению с диабетическими интактными крысами (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 7Б), а также к достоверному снижению уровня mRNA TNFα в 3,8 раза на 4-й неделе развития патологии по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 4 недели) (рис. 7В).

Транскрипционная активность гена *TNFr* на фоне введения диабетическим животным пентоксифиллина показала достоверные изменения на 14-й день развития патологического процесса – снижение в 2,9 раза по сравнению с диабетическими

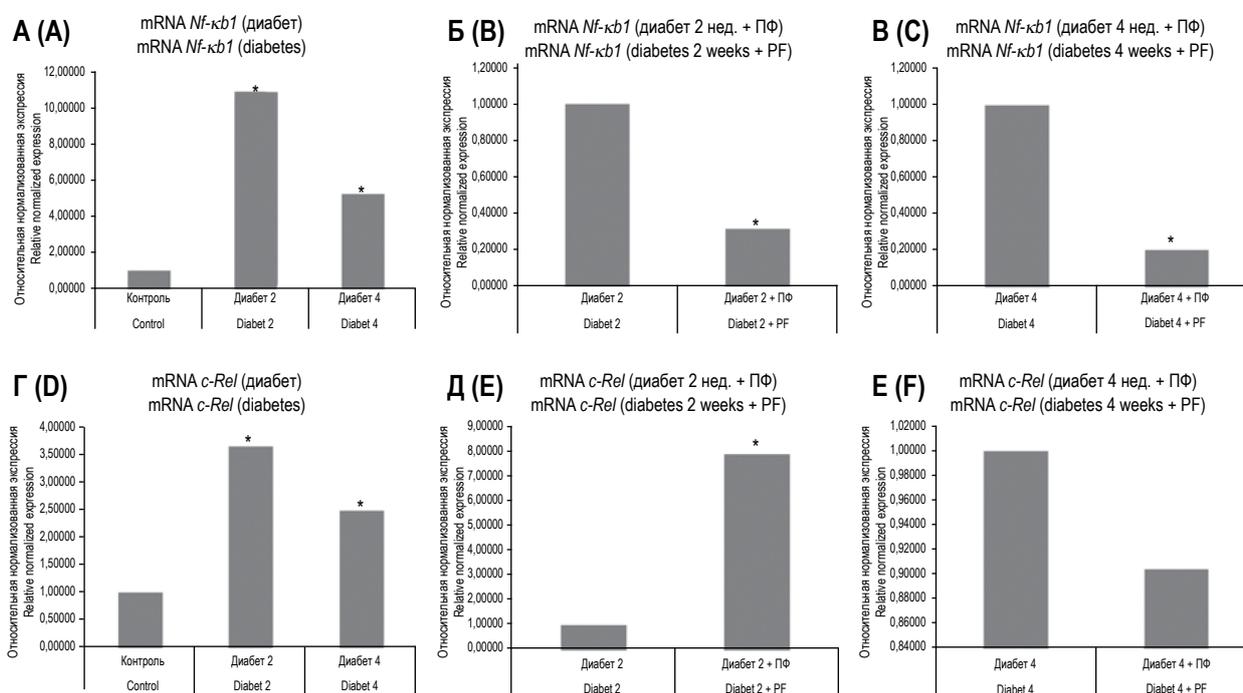


Рисунок 6. Относительное нормализованное количество мРНК генов *Nf-κB1* и *c-Rel* в клетках ИЛФ подвздошной кишки крыс

Примечание. Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном *GAPDH*. Диабет 2, диабет 4 – 2- и 4-недельный ЭСД соответственно; диабет 2 + ПФ, диабет 4 + ПФ – после введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Figure 6. Relative normalized expression of mRNA of *Nf-κB1* and *c-Rel* genes in rat ileum ILF cells

Note. Normalization by the $\Delta\Delta Ct$ method with the *GAPDH* reference gene. Diabetes 2, diabetes 4 – 2 and 4 week experimental diabetes mellitus, respectively; diabetes 2 + PF, diabetes 4 + PF – after the administration of pentoxifylline to a diabetic animal.

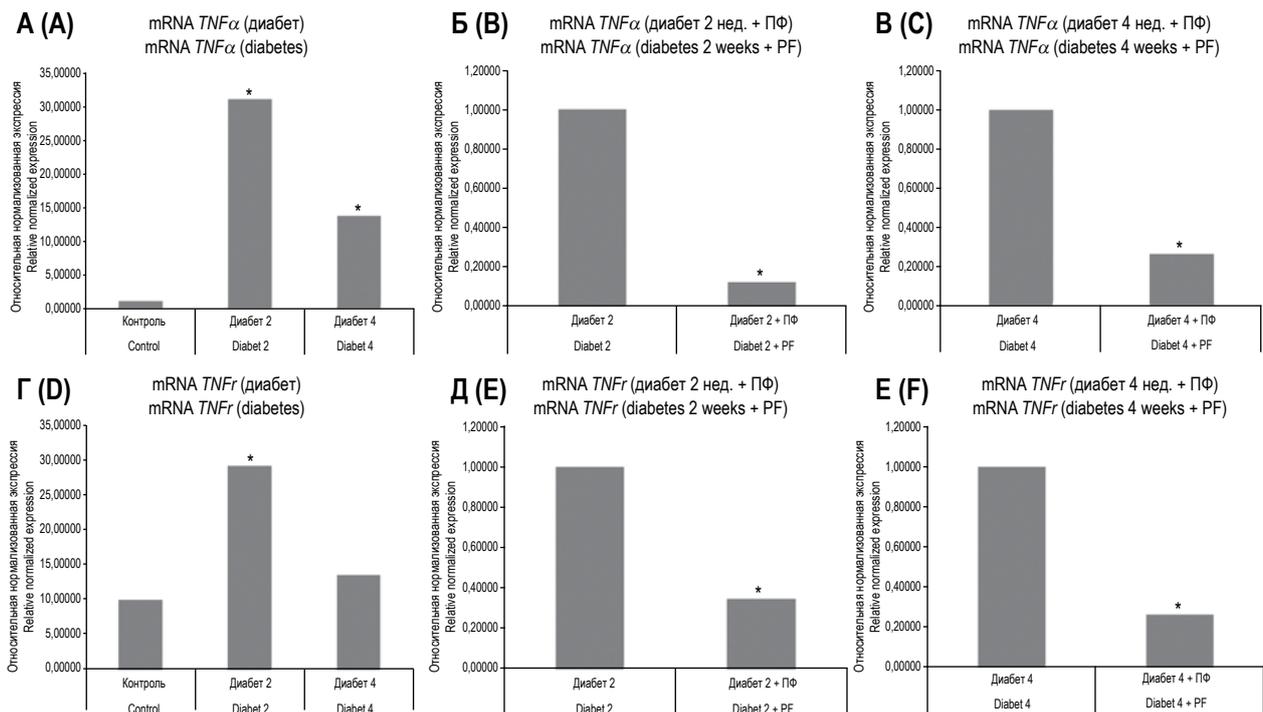


Рисунок 7. Относительное нормализованное количество мРНК генов *TNFα* и *TNFβ* в клетках ИЛФ подвздошной кишки крыс

Примечание. Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном *GAPDH*. Диабет 2, диабет 4 – 2- и 4-недельный ЭСД соответственно; диабет 2 + ПФ, диабет 4 + ПФ – после введения пентоксифиллина диабетическим животным.

Figure 7. Relative normalized expression of mRNA of *TNFα* and *TNFβ* genes in rat ileum ILF cells

Note. Normalization by the $\Delta\Delta Ct$ method with the *GAPDH* reference gene. Diabetes 2, diabetes 4 – 2 and 4 week experimental diabetes mellitus, respectively; diabetes 2 + PF, diabetes 4 + PF – after the administration of pentoxifylline to a diabetic animal.

ческими интактными животными (длительность ЭСД 2 недели) (рис. 7Д), с сохранением аналогичной динамики и на 28-й день – снижение в 3,8 раза по сравнению с диабетическими интактными животными (длительность ЭСД 4 недели) (рис. 7Е).

Обсуждение

Роль TLRs в развитии СД 1 типа активно дискутируется в целом ряде работ. Так, введение новорожденным NOD-мышам бактериальных экстрактов способно предотвратить развитие СД 1 типа и это напрямую зависит от TLR2- и TLR4-зависимой продукции TGF-β [2]. Экспрессия TLR2 и TLR4 в моноцитах у пациентов с СД1 усилена по сравнению со здоровыми [13], а Devaraj S. и соавт. показали, что продукция моноцитами TNFα и IL-1β также коррелирует с экспрессией TLR2 и TLR4 [6]. У человека наивные CD4⁺ и CD8⁺T-клетки экспрессируют TLR2 и TLR4 мРНК, однако поверхностная экспрессия данных рецепторов в достаточной степени представлена только у активированных лимфоцитов. Усиление экспрессии TLR2 в CD4⁺T-клетках

может способствовать их поляризации в направлении Th1-фенотипа и активировать продукцию IFNγ. Следует отметить, что данный эффект в наибольшей степени выражен при сочетанной активации TLR2 и TCR [12], однако, если дифференцированные Th1-клетки рестимулировать агонистами TLR2, то для продукции IFNγ и пролиферации не будет необходимости в активации TCR, но эффект может быть усилен добавлением IL-2. Также TLR2 оказывают влияние и на Th17, принимая непосредственное участие в их дифференцировке. Было показано, что CD4⁺T-клетки, лишённые TLR2, не способны к индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE) [7]. В то же время активированные CD4⁺T-клетки через рестимуляцию TLR2 способны к усилению продукции IL-17 [3]. Кроме того, гиперактивация TLR2 способна привести к поляризации Treg в сторону клеток с фенотипом Th17 и потере супрессорной активности. Таким образом, активация TLR2 представляет собой новый путь в регуляции провоспалительных функций Th17-клеток.

Усиление сигнализации через TLR4 также может контролировать функцию CD4⁺T-клеток. Так, у TLR4-дефицитных животных, после введения ЛПС снижается способность к продукции CD4⁺T-клетками IFN γ , но активируется продукция IL-17 [12]. Zanin-Zhogov A. и соавт. показали, что активация TLR4 у человека способна усилить миграцию CD4⁺T-клеток за счет повышения связывания фибронектина [30]. *In vivo* нокаут TLR4 в CD4⁺T-клетках приводит к снижению продукции IFN γ и IL-17 только в месте локализации воспаления, но не на периферии. Известны и противоположные данные, демонстрирующие, что делеция гена *TLR4* в CD4⁺T-клетках приводит к увеличению продукции IFN γ и развитию воспаления. Такие различия в описанных данных можно объяснить наличием различных лигандов TLR в кишечнике по сравнению со стерильным микроокружением в ЦНС. То есть в кишечнике T-клетки и TLR, несомненно, имеют непосредственный контакт с микробиотой и стимулирующими сигналами от нее, тогда как в ЦНС, вероятно, они будут в большей степени реагировать на сигналы от DAMP (Damage-associated molecular pattern molecules).

Обнаруженная нами индукция транскрипционной активности генов *Gp2* и *Spi-B* может свидетельствовать о важной роли M-клеток в прогрессии диабета. Гликопротеин Gp2, экспрессирующийся на апикальной мембране M-клеток (ранее считалось, что прерогатива экспрессии Gp2 принадлежит ацинарным панкреатическим клеткам), взаимодействует с FimH компонентом пилей 1 типа, присутствующем у представителей комменсальной и патогенной флоры (*E. coli*, *S. enterica* серовар Turphimurium). Антигены, трансцитированные M-клетками, доставляются к незрелым дендритным клеткам, а растворимая форма Gp2 опсонизирует бактерии, несущие FimH, что в значительной степени облегчает процесс транцитоза [11]. Процесс дифференцировки M-клеток из стволовых клеток кишечника во многом зависит от иммунных клеток КАЛТ, продуцирующих рецептор активатора лиганда ядерного фактора κ B (RANKL), который является одним из членов семейства TNF [26]. Это подтверждается тем, что у RANKL-дефицитных мышей обнаруживается значительное снижение количества M-клеток, которое может быть восстановлено после введения экзогенного рекомбинантного RANKL [15]. Кроме того, важную роль в поддержании дифференцировки M-клеток играет транскрипционный фактор Spi-B, экспрессия которого усиливается на ранних стадиях дифференцировки M-клеток. Было установлено что у Spi-B^{-/-} мышей не происходила дифференцировка M-клеток [14], также

они были дефицитны по нескольким маркерам, таким как Gp2, CCL9, M-Sec и Sgen-1, что указывает на их более позднюю экспрессию. Еще одним эффектом, отмеченным для Spi-B^{-/-} мышей, было значительное снижение уровня активации специфических T-клеток. Megan B. Wood и соавт. обнаружили, что TNF α усиливает полноценную RANKL-зависимую экспрессию генов, участвующих в дифференцировке M-клеток, посредством канонического пути активации NF- κ B, но не способен к самостоятельной индукции транскрипции Spi-B [29].

Обнаруженное в работе усиление транскрипционной активности генов *Nf- κ B1* и *c-Rel* в клетках ИЛФ подвздошной кишки крыс способно оказывать непосредственное влияние на дифференцировку лимфоцитов. Так, в T-лимфоцитах гены, кодирующие IL-2 и FoxP3, непосредственно связаны с c-Rel, а c-Rel-зависимая транскрипция IL-12 и IL-23 макрофагами и дендритными клетками критична для дифференцировки субпопуляций T-клеток и осуществления их эффекторных функций. В последнее время появляются данные о том, что c-Rel играет одну из критических ролей в развитии воспалительных заболеваний, таких как колит и экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ). Так, у c-Rel-дефицитных мышей, параллельно со снижением вероятности развития ЕАЕ, отмечены нарушения в пролиферации и дифференцировке Th1 и Th17 [31]. В то же время активация c-Rel в DC приводит к экспрессии IL-12 и IL-23, что положительно влияет на продукцию IL-17 активированными CD4⁺T-клетками со сдвигом реакции в провоспалительную сторону [18]. Кроме того, выключение c-Rel приводит к резистентности к стрептозотозин-индуцированному диабету. С другой стороны, c-Rel имеет решающее значение для развития FoxP3-позитивных Treg-клеток, которые подавляют активность аутореактивных T-клеток [24].

Полученные нами данные подтверждают важную роль и TNF α и его рецепторов в прогрессии СД 1 типа. Koulmanda M. и соавт. показали [16], что введение NOD-мышам ингибиторов продукции TNF α в неонатальный период приводит к предупреждению старта СД 1 типа, однако системное применение нетоксичных доз TNF α самкам NOD-мышей до 24 дня жизни приводит к увеличению числа случаев СД 1 типа. Вместе с тем введение TNF α в более позднем возрасте способно привести к задержке старта и снижению заболеваемости СД 1 типа. Все это свидетельствует о том, что TNF α , наряду с другими факторами, способен осуществлять как положительную, так и отрицательную регуляцию толерантности периферических T-лимфоцитов к аутоантиге-

нам, в том числе к антигенам β -клеток островков. Кроме описанного выше эффекта, anti-TNF α -терапия имеет дополнительный терапевтический эффект – восстановление чувствительности к инсулину. Liu С. и соавт. показали, что у пациентов с ревматоидным артритом на фоне назначения МКАТ к TNF α наблюдается снижение уровня Th1, Th17 IFN γ -продуцирующих CD8⁺T-клеток, а уровень Treg-клеток возрастает, что может говорить о снижении количества провоспалительных Th17-клеток на фоне усиления продукции IFN γ и увеличения количества Treg. Однако, несмотря на многочисленные положительные эффекты, использование МКАТ к TNF α может стать индуктором развития инфекционной патологии (туберкулез, пневмония и сепсис), реактивации латентной инфекции, а также нарушения нормального морфогенеза КАЛТ. Именно поэтому все более интересными становятся менее агрессивные блокаторы TNF α , например пентоксифиллин (РТХ). РТХ – это ингибитор фосфодиэстераз (ИФДЭ), который увеличивает уровень цАМФ, угнетает активацию NF- κ B и транскрипцию гена TNF α [17]. Данные, полученные в ходе нашего эксперимента, совпадают с результатами других авторов, что IFN γ /TNF α /NO-индуцированный апоптоз β -клеток значительно ослаблен на фоне введения РТХ. Visser J. и соавт. показали, что эффект от введения РТХ в значительной мере зависит от сроков использования препарата. Так, если DP-BB (Diabetes-prone Bio Breeding) крысам вводили РТХ в течение 2 месяцев, то развития патологии практически не происходило, а у DR-BB (Diabetes-resistant) наблюда-

лась лишь задержка старта развития СД. В обеих линиях ВВ-крыс введение РТХ результировалось в ингибировании продукции TNF α [28].

Выводы

1. Развитие диабета сопровождалось снижением количества TLR2⁺ и TLR4⁺ лимфоцитов в СПСОВ и ИЛФ подвздошной кишки крыс, при этом плотность TLR2 на мембране иммунопозитивных клеток увеличивалась у малых, а TLR4 – у средних и малых лимфоцитов.

2. Введение ПФ диабетическим крысам приводило к снижению числа TLR2⁺ клеток на 2-й неделе и увеличению данного показателя на 4-й неделе развития патологии, суммарная плотность TLR4⁺ клеток демонстрировала динамику к росту только в СПСОВ. Изменения плотности TLR2 и TLR4 на поверхности лимфоцитов носили разнонаправленный характер.

3. Диабет вызывал транскрипционную индукцию генов *Nf- κ B1* и *c-Rel* в клетках КАЛТ, тогда как введение ПФ снижало уровень экспрессии мРНК *Nf- κ B1* и увеличивало мРНК *c-Rel*.

4. Отмечен рост нормализованной экспрессии маркеров М-клеток Gp2 и Spi-B в ходе развития экспериментальной патологии. Введение ПФ приводило к разнонаправленным эффектам на интенсивность экспрессии мРНК Gp2 в зависимости от срока развития диабета и не влияло на уровень мРНК Spi-B.

5. Развитие ЭСД приводило к транскрипционной активации генов TNF α и TNF β и демонстрировало динамику к снижению этого показателя на фоне введения ПФ диабетическим животным.

Список литературы / References

1. Деген А.С., Камышный А.М. Экспрессия цитоплазматических NOD-2 и RIG-I рецепторов врожденного иммунитета в кишечнике крыс при экспериментальном сахарном диабете // Российский иммунологический журнал, 2014. № 3. С. 525-528. [Degen A.S., Kamyshnyi A.M. Expression of cytoplasmic nod-2 and rig-i receptors of innate immunity in intestine of rats in experimental diabetes mellitus. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, no. 3, pp. 525-528. (In Russ.)]
2. Alyanakian M.A., Grela F., Aumeunier A., Chiavaroli C., Gouarin C., Bardel E., Normier G., Chatenoud L., Thieblemont N., Bach J.F. Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. *Diabetes*, 2006, Vol. 55, no. 1, pp. 179-185.
3. Biswas A., Banerjee P., Biswas T. Porin of *Shigella dysenteriae* directly promotes toll-like receptor 2-mediated CD4⁺ T cell survival and effector function. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 15, pp. 3076-3085.
4. d'Addio F., Fiorina P. Type 1 diabetes and dysfunctional intestinal homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2016, Vol. 27, no. 7, pp. 493-503.
5. Degen A., Kamyshny A. Distribution characteristics of RIG-I receptors of innate immunity in experimental diabetes mellitus and administration of nonspecific blockers of TNF- α . *J. Immunol. Clin. Microbiol.*, 2018, Vol. 3, no. 3, pp. 50-59.
6. Devaraj S., Dasu M.R., Rockwood J., Winter W., Griffen S.C., Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008, no. 93, pp. 578-583.

7. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, no. 8, pp. 337-348.
8. Faustman D.L. TNF, TNF inducers, and TNFR2 agonists: A new path to type 1 diabetes treatment. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2018, Vol. 34, no. 1.
9. Flaherty S., Reynolds J.M. TLR function in murine CD4(+) T lymphocytes and their role in inflammation. *Methods Mol Biol.*, 2016, no. 1390, pp. 215-227.
10. Fulford T.S., Ellis D., Gerondakis S. Understanding the roles of the NF- κ B pathway in regulatory T cell development, differentiation and function. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2015, no. 136, pp. 57-67.
11. Hase K., Kawano K., Nochi T., Pontes G.S., Fukuda S., Ebisawa M., Kadokura K., Tobe T., Fujimura Y., Kawano S., Yabashi A., Waguri S., Nakato G., Kimura S., Murakami T., Iimura M., Hamura K., Fukuoka S., Lowe A.W., Itoh K., Kiyono H., Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH1 bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 2009, Vol. 462, no. 7270, pp. 226-230.
12. Imanishi T., Hara H., Suzuki S., Suzuki N., Akira S., Saito T. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J. Immunol.*, 2007, no. 178, pp. 6715-6719.
13. Jialal I., Yun J.M., Bremer A., Devaraj S. Demonstration of increased TLR2 and TLR4 Expression in monocytes of type 1 diabetic patients with microvascular complications. *Metabolism*, 2011, Vol. 60, no. 2, pp. 256-259.
14. Kanaya T., Hase K., Takahashi D., Fukuda S., Hoshino K., Sasaki I., Hemmi H., Knoop K.A., Kumar N., Sato M., Katsuno T., Yokosuka O., Toyooka K., Nakai K., Sakamoto A., Kitahara Y., Jinnohara T., McSorley S.J., Kaisho T., Williams I.R., Ohno H. The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 729-736.
15. Knoop K.A., Kumar N., Butler B.R., Sakthivel S.K., Taylor R.T., Nochi T., Akiba H., Yagita H., Kiyono H., Williams I.R. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 9, pp. 5738-5747.
16. Koulmanda M., Bhasin M., Awdeh Z., Qipo A., Fan Z., Hanidziar D., Putheti P., Shi H., Csizsuadia E., Libermann T.A., Strom T.B. The role of TNF- α in mice with type 1- and 2- diabetes. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 5, pp. 332-354.
17. Liang L., Beshay E., Prud'homme G.J. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 1998, Vol. 47, no. 4, pp. 570-575.
18. Maloy K.J., Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 2011, no. 474, pp. 298-306.
19. Nakamura Y., Kimura S., Hase K. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. *Inflamm. Regen.*, 2018, no. 38, pp. 1-5.
20. Needell J.C., Zipris D. The Role of the intestinal microbiome in type 1 diabetes pathogenesis. *Curr. Diab. Rep.*, 2016, Vol. 16, no. 10, pp. 8-9.
21. Ohno H. Intestinal M cells. *J. Biochem.*, 2016, Vol. 159, no. 2, pp. 151-160.
22. Opazo M.C., Ortega-Rocha E.M., Coronado-Arrázola I., Bonifaz L.C., Boudin H., Neunlist M., Bueno S.M., Kalergis A.M., Riedel C.A.. Intestinal microbiota influences non-intestinal related autoimmune diseases. *Front. Microbiol.*, 2018, Vol. 9, 432. doi: 10.3389/fmicb.2018.00432.
23. Qiao Y.C., Chen Y.L., Pan Y.H., Tian F., Xu Y., Zhang X.X., Zhao H.L. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, Vol. 12, no. 4, e0176157. doi: 10.1371/journal.pone.0176157.
24. Ramakrishnan P., Yui M.A., Tomalka J.A., Majumdar D., Parameswaran R., Baltimore D. Deficiency of nuclear factor- κ B c-Rel accelerates the development of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 2016, Vol. 65, no. 8, pp. 2367-2379.
25. Sato S., Kaneto S., Shibata N., Takahashi Y., Okura H., Yuki Y., Kunisawa J., Kiyono H. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.*, 2013, Vol. 6, no. 4, pp. 838-846.
26. Taylor R.T., Patel S.R., Lin E., Butler B.R., Lake J.G., Newberry R.D., Williams I.R. Lymphotoxin-independent expression of TNF-related activation-induced cytokine by stromal cells in cryptopatches, isolated lymphoid follicles, and Peyer's patches. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 9, pp. 5659-5667.
27. Vaarala O. Human intestinal microbiota and type 1 diabetes. *Curr. Diab. Rep.*, 2013, Vol. 13, no. 5, pp. 601-607.
28. Visser J., Groen H., Klatter F., Rozing J. Timing of pentoxifylline treatment determines its protective effect on diabetes development in the Bio Breeding rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, Vol. 445, no. 1-2, pp. 133-140.

29. Wood M.B., Rios D., Williams I.R. TNF- α augments RANKL-dependent intestinal M cell differentiation in enteroid cultures. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2016, Vol. 311, no. 3, pp. 498-507.
30. Zanin-Zhorov A., Tal-Lapidot G., Cahalon L., Cohen-Sfady M., Pevsner-Fischer M., Lider O., Cohen I.R. Cutting edge: T cells respond to lipopolysaccharide innately via TLR4 signaling. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 1, pp. 41-44.
31. Zhang H., Bi J., Yi H., Fan T., Ruan Q., Cai L., Chen Y.H., Wan X. Silencing c-Rel in macrophages dampens Th1 and Th17 immune responses and alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol. Cell Biol.*, 2017, Vol. 95, no. 7, pp. 593-600.

Авторы:

Деген А.С. — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Коваль Г.Д. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и эндокринологии, Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы, Украина

Сухомлинова И.Е. — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Морозова О.В. — к.м.н., доцент кафедры нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Камышный А.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Authors:

Degen A.S., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Koval G.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

Sukhomlinova I.E., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal Physiology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Morozova O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal Physiology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Kamyshnyi A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Поступила 22.11.2018
Принята к печати 25.12.2018

Received 22.11.2018
Accepted 25.12.2018