

**А.М.Камышный  
Т.М.Прозорова  
В.А.Камышная**

Запорожский государственный медицинский университет

**Ключевые слова:** экспериментальный гестационный диабет, брыжеечные лимфатические узлы, Aire, Treg.

Надійшла: 18.05.2015

Прийнята: 06.06.2015

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2015.2.29-35>

УДК: 612.438.017.1:616.379-008.64-092.9

## **ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕСТАЦИОННОГО ДИАБЕТА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ мРНК AIRE И ХАРАКТЕР ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ FOXP3<sup>+</sup> КЛЕТОК В БРЫЖЕЕЧНЫХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ У ПОТОМСТВА**

*Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Роль нарушений взаимоотношений лимфоидного и эпителиального компартментов иммунной системы слизистых оболочек в развитии экспериментальной патологии» (номер государственной регистрации 0112U005642).*

**Реферат.** С помощью молекулярно-генетических и иммунофлуоресцентных методов исследовали влияние гестационного диабета на уровень экспрессии мРНК аутоиммунного регулятора Aire и характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup>-клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомства крыс линии Wistar. У потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом выявлено снижение содержания в клетках брыжеечных лимфоузлов мРНК аутоиммунного регулятора Aire в 2,3-8,1 раза (p<0,05) по сравнению с контрольной группой животных. Обнаруженное снижение транскрипционной активности Aire сопровождается уменьшением количества регуляторных Foxp3<sup>+</sup>-лимфоцитов в брыжеечных лимфоузлах у потомства крыс с экспериментальным гестационным диабетом, а также снижением концентрации транскрипционного фактора Foxp3 в лимфоцитах коркового плато. Выявленные изменения свидетельствуют о нарушении формирования периферической иммунологической толерантности и могут быть триггером развития аутоиммунных заболеваний у потомков от матерей с экспериментальным гестационным диабетом.

**Morphologia.** – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 29-35.

© А.М.Камышный, Т.М.Прозорова, В.А.Камышная, 2015

✉ alexkamyshny@yandex.ru

**Kamyshny A.M., Prozorova T.M., Kamyshna V.A. The influence of experimental gestational diabetes on expression of Aire mRNA and character of differentiation of Foxp3<sup>+</sup> - cells in mesenteric lymph nodes in the offspring.**

**ABSTRACT. Background.** Formation of immunological tolerance to self-antigens is an important mechanism that prevents development of the autoimmune diseases. **Objective.** With the help of molecular genetic and immunofluorescence techniques to investigate the effects of experimental gestational diabetes on the level of mRNA expression of autoimmune regulator Aire and differentiation features of Foxp3<sup>+</sup> cells in mesenteric lymph nodes in the offspring of Wistar rats. **Methods.** To determine the level of Aire mRNA RT-PCR was performed in real-time by thermocycler CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-RadLaboratories, Inc», USA). The relative level of gene expression were studied with rat reference genes GAPDH by the method  $\Delta\Delta Ct$ . Statistical analysis were conducted using available software «Bio-Rad CFX Manager 3.1» (Bio-Rad, USA). The immunopositive Foxp3<sup>+</sup>-lymphocytes were determined using an indirect immunofluorescence technique with using a monoclonal rat antibody. **Results.** The offspring of experimental gestational diabetes rats showed the reduction of autoimmune regulator Aire mRNA in 2,3-8,1 times (p <0,05) in mesenteric lymph node cells compared to control animals. The observed decrease in the transcriptional activity of Aire is accompanied by reduction in the number of regulatory Foxp3<sup>+</sup> lymphocytes in mesenteric lymph node in the offspring of rats with experimental gestational diabetes, as well as reduction of concentration of the transcription factor Foxp3 in lymphocytes of cortical plateau. **Conclusion.** The revealed changes evidence the abuse of formation of peripheral immunological tolerance and can trigger the development of autoimmune disease in the offspring of mothers with experimental gestational diabetes.

**Key words:** experimental gestational diabetes, mesenteric lymph nodes, Aire, Treg.

### **Citation:**

Kamyshny AM, Prozorova TM, Kamyshna VA. [The influence of experimental gestational diabetes on expression of Aire mRNA and character of differentiation of Foxp3<sup>+</sup> - cells in mesenteric lymph nodes in the offspring]. Morphologia. 2015;9(2):29-35. Russian.

## Введение

Формирование иммунологической толерантности к собственным антигенам является важным механизмом, предотвращающим развитие аутоиммунных заболеваний. Регулятором эктопической транскрипции в тимусе целого ряда периферических тканеспецифических антигенов (peripheral tissue-specific antigens, PTSAs), в том числе таких панкреатических антигенов как инсулин, проинсулин, проглюкагон, просоматостатин и пропанкреатический полипептид является аутоиммунный регулятор (Aire) [1, 2]. Однако элиминация аутореактивных Т-клеток в тимусе является незавершенным процессом, такие лимфоциты обнаруживаются в периферической крови даже у клинически здоровых лиц [3]. Экстратимическая экспрессия PTSAs была продемонстрирована в различных исследованиях. Так, экспрессия панкреатических островковых аутоантигенов, включая проинсулин, была показана на циркулирующих дендритных клетках и макрофагах у людей [4] и грызунов [5]. Многочисленные экстратимические Aire-экспрессирующие клетки (extrathymic Aire-expressing cells, eTACs) обнаруживаются в лимфатических узлах (ЛУ) и являются одним из критических факторов формирования периферической толерантности (ПТ).

Еще одним важным участником негативного контроля развития аутоиммунных заболеваний (АИЗ) является популяция индуцибельных Т-регуляторных клеток (Treg), экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3 [6]. Действие Treg реализуется через продукцию супрессорных цитокинов-IL10, IL13, IL35, TGF $\beta$ , перфорин- и гранзим-зависимый цитолиз эффекторных клеток и другие механизмы [6]. В свою очередь, интранатальная гипергликемия, которая развивается при гестационном диабете (ГД), может влиять на морфогенез органов иммунной системы и приводить к нарушениям формирования ПТ к панкреатическим АГ. Ключевым местом для индукции ПТ являются брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ), в которых происходит интенсивная активация наивных Т-лимфоцитов и их дифференцировка в субпопуляции эффекторных клеток [7]. Изменения уровня экспрессии Aire способны влиять на характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup> Treg-клеток [8, 9].

**Целью** нашей работы было изучить особенности экспрессии мРНК Aire и характер дифференцировки Foxp3<sup>+</sup> Treg-клеток в брыжеечных лимфатических узлах у потомков крыс с экспериментальным гестационным диабетом (ЭГД).

## Материалы и методы

Исследования проведены на 1- и 6-месячных самцах – потомках крыс с ЭГД. ЭГД моделировали однократным введением стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг веса животного на 14-15 сутки датируемой беременности крысы, что соответст-

вует последнему триместру беременности. После индукции диабета самок выпаивали в первый день 20% р-ром глюкозы, на второй день – 10% р-ром глюкозы для снижения риска развития острой гипогликемии, которая развивается вследствие значительной одномоментной деструкции  $\beta$ -клеток и повышения концентрации инсулина в крови. Потомки крыс с ЭГД находились на высококалорийном рационе со свободным доступом к воде и пище.

Объектом для молекулярно-генетических исследований у экспериментальных животных были клетки БЛУ. РНК получали из гистологических срезов толщиной 15 мкм, для этого проводили их депарафинизацию в ксилоле и регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (Изоген Lab., LTD, Россия). Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H<sub>2</sub>O, очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) и набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Специфические пары праймеров для анализа исследуемого и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) и изготовлены фирмой Metabion (Германия). После начальной денатурации в течение 10 мин при 95°C амплификация состояла из 45-50 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация - 95°C, 15 сек., отжиг-60°C, 30-60 сек., элонгация - 72°C, 30 сек. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии Aire был использован ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК Aire определяли методом  $\Delta\Delta C_t$ . Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Структуру классов Foxp3<sup>+</sup>-клеток изучали путем анализа серийных гистологических срезов, обработанных МКАТ к транскрипционному фактору Foxp3 (Santa Cruz Biotechnology, США) при использовании системы визуализации Envision (Dako, Дания). Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе Primo Star (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбужде-

ния 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры Axio Cam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводили в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для лимфоидных клеток экспрессирующих Foxp3. Вычислялись морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитив-

ных клеток. При окраске антителами исследовали иммунопозитивные лимфоциты, расположенные в корковом плато и мягкотных тяжах БЛУ.

#### Результаты и их обсуждение

Исследование экспрессии AIRE в БЛУ показало, что у потомства крыс с ЭГД наблюдается значительное снижение содержания мРНК аутоиммунного регулятора (в 8,1 раза ( $p < 0,05$ ) у 1-месячного и в 2,3 раза ( $p < 0,01$ ) у 6-месячного потомства) по сравнению с контрольной группой животных (рис. 1).

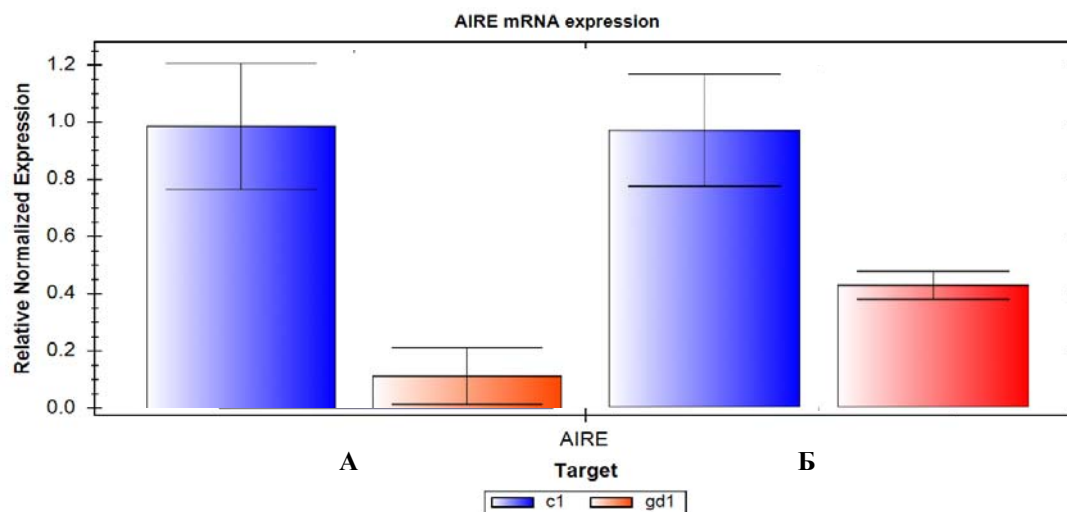


Рис.1. Относительное нормализованное количество мРНК гена аутоиммунного регулятора AIRE в клетках БЛУ у 1-месячного (А) и 6-месячного потомства (Б) крыс с ЭГД. Нормализация по методу  $\Delta\Delta Ct$  с референс-геном GAPDH. с 1-контроль 1 мес; с 6-контроль 6 мес; gd1 и gd6 -1-месячное и 6-месячное потомство крыс с ЭГД.

Изучение серийных срезов брыжеечных лимфатических узлов показало следующие результаты: в контрольной группе 1-месячных потомков интактных животных суммарная плотность Foxp3+-лимфоцитов составила  $44 \pm 4$  в корковом плато, и  $50 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  в мозговых тяжах, к возрасту 6 месяцев несколько уменьшалась до  $39 \pm 3$  и  $42 \pm 3$  на  $1 \text{ мм}^2$  соответственно (табл. 1). Анализ суммарной плотности популяции Foxp3+-лимфоцитов в экспериментальных группах животных показал: у 1-месячных потомков крыс с ЭГД обнаружилось сниженное на 57% ( $p < 0,05$ ) количество T-регуляторных клеток в корковом плато и на 76% ( $p < 0,05$ ) в мозговых тяжах. У 6-месячных крыс эти показатели были снижены на 54% ( $p < 0,05$ ) и на 64% ( $p < 0,05$ ) соответственно (см. табл. 1).

Изучение распределения отдельных классов Treg показало, что количество Foxp3+-лимфобластов относительно контрольных групп уменьшилось в наибольшей мере: в 1-месячном возрасте на 78% ( $p < 0,05$ ) в корковом плато и на 92% ( $p < 0,05$ ) в мозговых тяжах БЛУ, а у 6-месячного потомства на 33% ( $p < 0,05$ ) и на 78% ( $p < 0,05$ ) соответственно. Количество Foxp3+-малых и средних лимфоцитов у потомства крыс с ЭГД снижалось в меньшей мере, при этом в

структуре популяции Treg процент Foxp3+-средних лимфоцитов оставался прежним, достоверно уменьшалась процентная доля Foxp3+-лимфобластов и увеличивалось процентное число Foxp3+-малых лимфоцитов (см. табл. 1).

Измерение интенсивности флуоресценции, которая отражает концентрацию транскрипционного фактора Foxp3 в иммунопозитивных клетках, показало достоверное снижение флуоресценции в корковом плато БЛУ во всех классах Foxp3+-клеток у 1-месячного потомства, и выравнивание этого показателя к 6-месячному возрасту (табл. 2). В мозговых тяжах наблюдалось достоверное увеличение интенсивности флуоресценции у Foxp3+-малых лимфоцитов обеих возрастных групп.

Первые свидетельства экстра-тимической экспрессии Aire на уровне мРНК были получены в оригинальных исследованиях с клонированием гена Aire [10]. И, хотя более высокий уровень AIRE был обнаружен в тимусе в этих исследованиях тканей человека, РНК-транскрипты были также выявлены в лимфатических узлах, печени и других тканях. Дальнейшие исследования с применением техники гибридизации, нозерн-блоттинга, ПЦР подтвердили широкую экспрессию Aire в различных тканях вне тимуса. У мы-

шей определялась даже более высокая экспрессия Aire в ЛУ и селезенке по сравнению с тимусом [11]. В тканях человека мРНК Aire детектируется в ЛУ (в БЛУ намного интенсивнее, чем в периферических), миндалинах, КАЛТ [12], селезенке, печени, моноцитах, ДК, Т- и В-лимфоцитах периферической крови [13], эпителиоцитах [14] и клетках стромы ЛУ [15]. Эти результаты подтверждены и на уровне белка иммуногистохимическим и иммуноблоттингом

[12]. Некоторые исследования были неспособны подтвердить свои обнаружения мРНК на уровне белка. Так, Hubert F. и др. (2008), который ранее сообщил о экспрессии mRNA Aire в тимусе, лимфатическом узле, селезенке и других периферических тканях у крыс, был неспособен обнаружить белок Aire, используя Вестерн-блоттинг или иммуногистохимию в любой ткани кроме тимуса [16].

Таблица 1  
Количество Foxp3<sup>+</sup>-клеток в БЛУ у потомства крыс с ЭГД (M ± m)

Серии	Суммарная плотность	Foxp3 <sup>+</sup> лимфобласты	Foxp3 <sup>+</sup> средние лимфоциты	Foxp3 <sup>+</sup> малые лимфоциты
Корковое плато				
Контроль – 1 мес	44±4	$\frac{9 \pm 1}{20,0 \pm 2,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{25,1 \pm 2,4\%}$	$\frac{24 \pm 3}{55,0 \pm 5,9\%}$
Потомство крыс с эгд – 1 мес	19±3 <sup>1</sup>	$\frac{2 \pm 0^1}{8,1 \pm 1,9\%}$	$\frac{5 \pm 1^1}{26,6 \pm 4,1\%}$	$\frac{13 \pm 2^1}{65,2 \pm 9,1\%}$
Контроль – 6 мес	39±3	$\frac{3 \pm 1}{8,7 \pm 1,8\%}$	$\frac{13 \pm 1}{32,0 \pm 3,5\%}$	$\frac{23 \pm 2}{59,3 \pm 4,2\%}$
Потомство крыс с эгд – 6 мес	18±2 <sup>1</sup>	$\frac{2 \pm 0}{12,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{5 \pm 1^1}{27,6 \pm 3,9\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{60,3 \pm 8,3\%}$
Мякотные тяжи				
Контроль – 1 мес	50 ± 3	$\frac{13 \pm 2}{26,2 \pm 4,0\%}$	$\frac{13 \pm 1}{27,0 \pm 2,8\%}$	$\frac{23 \pm 2}{46,9 \pm 3,6\%}$
Потомство крыс с ЭГД – 1 мес	12±2 <sup>1</sup>	$\frac{1 \pm 0^1}{11,8 \pm 2,1\%}$	$\frac{4 \pm 1^1}{32,7 \pm 4,6\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{55,5 \pm 7,6\%}$
Контроль – 6 мес	42±3	$\frac{9 \pm 1}{20,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{14 \pm 1}{32,3 \pm 3,3\%}$	$\frac{20 \pm 2}{47,5 \pm 4,3\%}$
Потомство крыс с ЭГД – 6 мес	15±1 <sup>1</sup>	$\frac{2 \pm 0^1}{11,5 \pm 1,4\%}$	$\frac{5 \pm 1^1}{27,1 \pm 2,8\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{61,4 \pm 5,7\%}$

Примечание: в числителе – плотность популяции клеток (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменателе – процентная доля отдельных классов лимфоцитов; достоверность отличий параметров p<0,05 по отношению к контролю (<sup>1</sup>).

Таблица 2  
Концентрация Foxp3 (УЕ<sub>оп</sub>) в лимфоцитах БЛУ у потомства крыс с ЭГД (M ± m)

Серии	Foxp3 <sup>+</sup> лимфобласты	Foxp3 <sup>+</sup> средние лимфоциты	Foxp3 <sup>+</sup> малые лимфоциты
Корковое плато			
Контроль – 1 мес	0,558±0,025	0,311±0,004	0,134±0,003
Потомство крыс с ЭГД – 1 мес	0,212±0,012 <sup>1</sup>	0,112±0,002 <sup>1</sup>	0,060±0,001 <sup>1</sup>
Контроль – 6 мес	0,538±0,027	0,308±0,003	0,146±0,003
Потомство крыс с ЭГД – 6 мес	0,597±0,023	0,302±0,003	0,152±0,002
Мякотные тяжи			
Контроль – 1 мес	0,603±0,024	0,308±0,004	0,140±0,003
Потомство крыс с эгд – 1 мес	0,619±0,032	0,313±0,003	0,155±0,003 <sup>1</sup>
Контроль – 6 мес	0,635±0,035	0,307±0,004	0,148±0,003
Потомство крыс с эгд – 6 мес	0,616±0,021	0,306±0,002	0,165±0,002 <sup>1</sup>

Примечание: достоверность отличий параметров p<0,05 по отношению к контролю (<sup>1</sup>).

Gardner с соавторами [14] с помощью изящной трансгенной модели показал способность экстратимических Aire<sup>+</sup>-клеток экспрессировать панкреатические PTASs, в частности белок Igrp

(islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein), а также методом ДНК-микрочипов показал наличие большого числа Aire-регулируемых генов в ЛУ. Увеличение уровня Aire в селезенке

ночных CD11c+ дендритных клетках приводит к нарастанию в них транскриптов инсулина, но не декарбоксилазы глутаминовой кислоты 67 (GAD67) [17]. Отсутствие транскриптов отдельных панкреатических АГ может объясняться тем, что субпопуляции клеток лимфатического узла отличаются по их экспрессии Aire. Возможно, нокаут гена Aire не действует на экспрессию ПТА в пределах тех субпопуляций, которые его не выражают. Например, GAD67 выражен в трех субпопуляциях клеток лимфатического узла, только две из которых экспрессируют Aire [18]. Анализ Aire – / – мышей показал отсутствие транскриптов GAD67 только в тех совокупностях клеток, где Aire будет обычно экспрессироваться. В тоже время те клетки от Aire – / – мышей, в которых в норме Aire отсутствовал, все еще могли представлять антиген определенным антиген-специфическим Т-лимфоцитам [18].

Yang S. и др. (2015) показал способность Aire генерировать в перинатальный период (включая до 10 суток после рождения) особую популяцию FoxP3+Treg-клеток, которая устойчиво сохраняется и у взрослых мышей [19]. Эти перинатально-продуцируемые Treg демонстрируют более высокую супрессорную активность, другой профиль транскрибируемых генов и фенотипически отличаются от Treg, генерирующихся у взрослых. У мышей линии NOD удаление Treg во время этого “перинатального окна” приводит к развитию мультиорганных аутоиммунных заболеваний, подобных развивающимся при нокауте Aire [19]. В отличие от этого, никаких подобных эффектов не наблюдается при деляции Treg у взрослых мышей. Важное значение этих различий - методы лечения, основанные на трансфере Tregs, полученных от взрослых доноров, зачастую не в состоянии воздействовать на аутоиммунные процессы, регулируемые “молодыми” Tregs.

Роль Aire в дифференцировке Foxp3+ Tregs показана в ряде работ [8, 9]. И, хотя, Daniely D. и др. (2010) установили, что недостаток Aire не оказывал значительного эффекта на репертуар

TCR Foxp3+ Tregs [20]. Malchow S. и др. (2013) недавно продемонстрировали Aire-зависимую продукцию Tregs в тимусе у мышей [21]. Показана способность Aire регулировать экспрессию мРНК Foxp3 в спленocyтaх и усиливать продукцию CD4+FoxP3+ Т-клеток в селезенке [22]. Gardner J. и др. (2013) продемонстрировали способность eTACs (extrathymic Aire-expressing cells) функционально инактивировать эффекторные CD4+ Т-лимфоциты, увеличивать численность Treg и влиять на их выживаемость [23]. Treg от Aire-дефицитных мышей, несмотря на свою транскрипционную и фенотипическую “нормальность”, демонстрируют неспособность предотвратить развитие экспериментального колита [24]. Интересно, что комменсальные бактерии кишечного микробиома оказывают влияние на уровень экспрессии Aire в тимусе [25], тогда как уровень экспрессии Aire в БЛУ, по видимому, должен быть еще в большей мере зависим от кишечной микробиоты, учитывая что БЛУ являются своеобразным “контрольно-пропускным пунктом” для кишечных АГ. Была показана способность Aire регулировать экспрессию цетого ряда TLR (TLR3, TLR8, TLR2, TLR4, TLR6 и TLR9) моноцитами и макрофагами в ЛУ и селезенке [26]

#### Выводы

1. У потомства крыс с ЭГД наблюдается снижение содержания в клетках БЛУ мРНК аутоиммунного регулятора Aire в 2,3-8,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой животных.

2. Транскрипционная репрессия Aire сопровождается снижением количества регуляторных Foxp3+-лимфоцитов в БЛУ у потомства крыс с ЭГД, а также уменьшением концентрации транскрипционного фактора Foxp3 в лимфоцитах коркового плато.

Перспективы дальнейших разработок предусматривают проведение молекулярно-генетических исследований с целью изучения уровня мРНК регуляторов миграции лимфоцитов в БЛУ.

#### Литературные источники References

1. Akirav EM, Ruddle NH, Herold KC. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011;7(1):25-33. PMID: 21102544.

2. Laan M, Peterson P. The many faces of Aire in central tolerance. *Front Immunol.* 2013;4:326. PMID: 24130560.

3. Semana G, Gausling R, Jackson RA, Hafler DA. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J. Autoimmun.* 1999;12:259-67. Cited in PubMed; PMID:

10330297.

4. Narendran P, Neale AM, Lee BH, Ngui K, Steptoe RJ, Morahan G, Madsen O, Dromey JA, Jensen KP, Harrison LC. Proinsulin is encoded by an RNA splice variant in human blood myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006;103(44):16430-5. PMID: 17053071.

5. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101(8):2458-63. PMID:

14983031.

6. Shevach E, Thornton A. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol. Rev.* 2014;259(1):88-102. doi: 10.1111/immr.12160. PMID: 24712461.
7. Macpherson A, Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J. Exp. Med.* 2006;203(3):497-500. PMID: 16533891.
8. Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK. Selection of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire<sup>+</sup> medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 2007;8(4):351-8. PMID: 17322887.
9. Hinterberger M, Aichinger M, da Costa O, Voehringer D, Hoffmann R, Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4<sup>+</sup> T cell tolerance. *Nat. Immunol.* 2010;11(6):512-9. doi: 10.1038/ni.1874. PMID: 20431619.
10. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N. Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* 1997;17(4):393-8. PMID: 9398839.
11. Kont V, Laan M, Kisand K, Merits A, Scott HS, Peterson P. Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Mol. Immunol.* 2008;45(1):25-33. PMID: 17599412.
12. Poliani PL, Kisand K, Marrella V, Ravanini M, Notarangelo LD, Villa A, Peterson P, Facchetti F. Human peripheral lymphoid tissues contain autoimmune regulator-expressing dendritic cells. *Am. J. Pathol.* 2010;176(3):1104-12. doi: 10.2353/ajpath.2010.090956. PMID: 20093495.
13. Suzuki E, Kobayashi Y, Kawano O, Endo K, Haneda H, Yukiue H, Sasaki H, Yano M, Maeda M, Fujii Y. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes. *Autoimmunity.* 2008;41(2):133-9. doi: 10.1080/08916930701773941. PMID: 18324482.
14. Gardner JM, Devoss JJ, Friedman RS, Wong DJ, Tan YX, Zhou X, Johannes KP, Su MA, Chang HY, Krummel MF, Anderson MS. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science.* 2008;321(5890):843-7. doi: 10.1126/science.1159407. PMID: 18687966.
15. Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, Curry MS, Collier AR, Boyd RL, Turley SJ. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J. Exp. Med.* 2010;207(4):689-97. doi: 10.1084/jem.20092642. PMID: 20308362
16. Hubert FX, Kinkel SA, Webster KE, Cannon P, Crewther PE, Proeitto AI, Wu L, Heath WR, Scott HS. A specific anti-Aire antibody reveals Aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery. *J. Immunol.* 2008;180(6):3824-32. PMID: 18322189.
17. Zheng X, Yin L, Liu Y, Zheng P. Expression of tissue-specific autoantigens in the hematopoietic cells leads to activation-induced cell death of autoreactive T cells in the secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 2004;34(11):3126-34. PMID: 15368272.
18. Cohen JN, Guidi CJ, Tewalt EF, Qiao H, Rouhani SJ, Ruddell A, Farr AG, Tung KS, Engelhard VH. Lymph node-resident lymphatic endothelial cells mediate peripheral tolerance via Aire-independent direct antigen presentation. *J. Exp. Med.* 2010;207(4):681-8. doi: 10.1084/jem.20092465. PMID: 20308365.
19. Yang S, Fujikado N, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science.* 2015;348(6234):589-94. doi: 10.1126/science.aaa7017. PMID: 25791085.
20. Daniely D, Kern J, Cebula A, Ignatowicz L. Diversity of TCRs on natural Foxp3<sup>+</sup> T cells in mice lacking Aire expression. *J. Immunol.* 2010;184(12):6865-73. PMID: 20483761.
21. Malchow S, Leventhal DS, Nishi S, Fischer BI, Shen L, Paner GP, Amit AS, Kang C, Geddes JE, Allison JP, Socci ND, Savage PA. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science.* 2013;339(6124):1219-24. doi: 10.1126/science.1233913. PMID: 23471412.
22. Sun J, Fu H, Wu J, Zhu W, Li Y, Yang W. Macrophages overexpressing Aire induce CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells. *Mol. Med. Rep.* 2013;7(1):159-65. doi: 10.3892/mmr.2012.1150. PMID: 23128958.
23. Gardner JM, Metzger TC, McMahon EJ, Au-Yeung BB, Krawisz AK, Lu W, Price JD, Johannes KP, Satpathy AT, Murphy KM, Tarbell KV, Weiss A, Anderson MS. Extrathymic Aire-expressing cells are a distinct bone marrow-derived population that induce functional inactivation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity.* 2013; 39(3):560-72. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.005. PMID: 23993652.
24. Pomié C, Vicente R, Vuddamalay Y, Lundgren BA, van der Hoek M, Enault G, Kagan J, Fazilleau N, Scott HS, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Autoimmune regulator (AIRE)-deficient CD8<sup>+</sup>CD28<sup>low</sup> regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108(30):12437-42. doi: 10.1073/pnas.1107136108. PMID: 21746930.
25. Nakajima A, Negishi N, Tsurui H, Kadowaki-Ohtsui N, Maeda K, Nanno M, Yamaguchi Y, Shimizu N, Yagita H, Okumura K, Habu S. Commensal bacteria regulate thymic Aire expression. *PLoS One.* 2014;9(8):e105904. doi: 10.1371/journal.pone.0105904. PMID: 25157574.
26. Zhu W, Yang W, He Z, Liao X, Wu J, Sun J, Yang Y, Li Y. Overexpressing autoimmune regulator regulates the expression of toll-like receptors

**Камишний О.М., Прозорова Т.М., Камишна В.А. Вплив експериментального гестаційного діабету на рівень експресії мРНК Aire та характер диференціювання Foxp3<sup>+</sup>- клітин в брижових лімфатичних вузлах у нащадків.**

**Реферат.** За допомогою молекулярно-генетичних та імуофлюоресцентних методів досліджували вплив гестаційного діабету на рівень експресії мРНК автоімунного регулятора Aire та характер диференціювання Foxp3<sup>+</sup>-клітин в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів лінії Wistar. У нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом виявлено зниження вмісту в клітинах брижових лімфатичних вузлів мРНК автоімунного регулятора Aire в 2,3-8,1 рази (p<0,05) порівняно з контрольною групою тварин. Виявлене зниження транскрипційної активності Aire супроводжується зменшенням кількості регуляторних Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів в брижових лімфатичних вузлах у нащадків щурів з експериментальним гестаційним діабетом, а також зниженням концентрації транскрипційного фактору Foxp3 в лімфоцитах коркового плато. Виявлені зміни свідчать про порушення формування периферичної імунологічної толерантності та можуть бути тригером розвитку аутоімунних захворювань у нащадків від матерів з експериментальним гестаційним діабетом.

**Ключові слова:** експериментальний гестаційний діабет, брижові лимфатичні вузли, Aire, Treg.