

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

ТОПОЛ ІННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК: 616.341:616.42 - 018]:[616 – 092+616.34 – 008.87 – 047.58]] – 092.9

**ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КИШКОВО-АСОЦІЙОВАНОЇ ЛІМФОЇДНОЇ
ТКАНИНИ ЩУРІВ В УМОВАХ СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ І ПРИ
МОДУЛЯЦІЇ СКЛАДУ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Запорізькому державному медичному університеті

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Камишний Олександр Михайлович,
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Зяблицев Сергій Володимирович,
Український науково-практичний центр ендокринної
хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин,
завідувач відділу патофізіології, імунології та
трансплантології

доктор біологічних наук,
Блашків Тарас Вірославович,
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
провідний науковий співробітник відділу імунофізіології

Захист відбудеться “21” червня 2016 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01601, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (01601, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4) та на сайті:
<http://biph.kiev.ua/uk>

Автореферат розісланий “18” травня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хронічний соціальний стрес (ХСС) є невід'ємною частиною сучасного життя [Magnavita N., 2015]. Ситуація, що склалася останні роки в українському суспільстві характеризується високим рівнем соціальної напруги, при яких стресові умови набувають затяжного характеру. ХСС здатен викликати значні порушення не тільки у нейроендокринній системі, спричиняючи розвиток стану депресії і тривоги [Резніков О.Г., 2007; Tilburg M., 2015], але і призводити до змін у функціонуванні вродженого та адаптивного імунітету [Hodes G., 2014; Reader B., 2015]. Стрес-індукована імунна дизрегуляція може бути тригером розвитку багатьох патологічних станів, включаючи цукровий діабет 1 типу (ЦД 1 типу) [Rasmussen B., 2013], запальні захворювання кишківнику (ЗЗК) [Iglesias-Rey M., 2014], інфекції [Mays J., 2010] і пухлини [Powell N., 2013].

Останнім часом з'явилися нові дослідження, які демонструють, що ХСС активує функціональну активність дендритних клітин (ДК), цитотоксичних лімфоцитів і Т-лімфоцитів пам'яті, підвищує рівень мРНК інтерферону (IFN)- γ та IFN- α [Mays J. et al., 2010, 2012; Powell N. et al., 2011], прискорює дозрівання ДК, збільшуючи експресію на їх поверхні МНС I і II, коstimуляторних молекул CD80, CD86 і CD44, підсилює експресію TLR2 і TLR4 макрофагами селезінки [Bailey M., 2007]. Викликані ХСС зміни асоційовані зі зниженням рівня циркулюючих Foxp3⁺ T_{reg}- клітин [Freier E., 2010], посиленням продукції прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-17, IFN- γ , TNF α) [Carlsson E., 2014]. Показана роль ХСС як тригера таких аутоімунних захворювань, як ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, аутоімунний тиреоїдит та ін. [Stojanovich L., 2010; Delévaux I., 2013].

В більшості існуючих моделей ХСС відзначається зниженням рівня глюкокортикоїдної (ГК) сигналізації [Engler H. et al., 2008; Schmidt D. et al., 2010; Reber S. et al., 2011], але молекулярні механізми цього явища повністю не з'ясовані. Причинами розвитку резистентності до ГК в умовах ХСС можуть бути зниження рівня експресії мРНК Nr3c1 [Kadmiel M., 2013], генетичний поліморфізм гена Nr3c1, епігенетичні зміни рівня експресії мРНК ДНК-метилтрансфераз 3a і 3b, мРНК гістон-деацетилази HDAC, цілої низки мікро-РНК [Jung S., 2015], що може нівелювати імуносупресивні ефекти ГК, посилювати прозапальну сигналізацію в кишківнику і ще в більшій мірі індукувати резистентність до ГК. Є також дані щодо здатності ГК в умовах стресу активувати утворення Nlrp3-інфламасоми [Frank M.G. 2014], відповідальної за дозрівання ІЛ-1 β [Haneklaus M., 2015] і здатної при гіперактивності зміщувати Th1/Th17 баланс в сторону Th17 відповіді [Meng G., 2010]. Не менш важливими ефекторними гормонами під час стрес-реакції є катехоламіни (КХ), а Т- і В- лімфоцити активно експресують β 2-адренергічні рецептори (Adrb2) на різних стадіях диференціювання [Sanders M., 2012]. Сигналізація через Adrb2 посилює супресорну активність T_{reg}, сприяє конверсії Foxp3⁻ клітин у Foxp3⁺- індукційні T_{reg} – клітини, збільшуючи експресію негативної коstimуляторної молекули CTLA-4 [Guereschi M., 2013], через активацію патерн-розпізнавальних рецепторів (PPR) NOD2 і TLR2 індукує Т-клітинне диференціювання у напрямку Th17 [Manni M., 2011], а TLR4 - залежним шляхом індукує Nf-kB [Kizaki T., 2008].

Відомо, що кишково-асоційована лімфоїдна тканина (КАЛТ) є найдревнішим відділом імунної системи та містить до 80% всіх лімфоцитів і найбільшу кількість коменсальної та патогенної мікрофлори [Caballero S., 2015], розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних патернів (ПАМП) якої через цілу низку ПРР (TLR, NLR, RLR) формує становлення імунної системи цього регіону та силу імунної відповіді [Elia P., 2015]. Зміни експресії TLR лімфоцитами КАЛТ в умовах стресу Nf-kB-залежним шляхом впливають на їх диференціювання. КАЛТ є основним місцем генерації за участю кишкової мікрофлори індукбельних T_{reg} - клітин (iT_{reg}) [Angelina M., 2012] і резервуаром пулу Th17 - лімфоцитів [Huber S., 2012].

ХСС здатен не тільки порушувати баланс між Th17/ T_{reg} - клітинами [Hong M. et al., 2013], а й змінювати склад кишкової мікрофлори [Bailey M., 2011; Sommer F., 2013], яка, в свою чергу, впливає на рівень диференціювання різних субпопуляцій Т-хелперів [Ivanov I., 2009; Round J., 2010]. Катехоламіни, які синтезуються в умовах ХСС, можуть виступати в ролі лігандів для рецепторів адреналін/норадреналінової системи кворум-сенсінгу бактерій [Curtis M., 2011], що сприймається як сигнал, який свідчить про достатню для атаки щільність бактеріальної популяції та індукує їх транслокацію в КАЛТ з гіперактивацією спочатку вродженої, а потім адаптивної ланки імунної системи [Karavolos M., 2013].

Стреси різної етіології призводять до порушень фолдингу білків [Hetz C., 2012], а важливим регулятором “відповіді на незгорнуті білки” [Todd D., 2008] є транскрипційний фактор ХВР1 [Glimcher L., 2010]. Регуляторами процесингу пептидів є імунні протеасоми (ІМП) [Krüger E., 2012], їх інгібування або дефіцит призводить до зниження експансії Th1 і Th17- клітин [Kalim K. et al., 2012], знижує виробництво ІЛ-17, рівень мРНК транскрипційного фактору Ror γ t та сприяє розвитку T_{reg} [Suzuki E. et al., 2011]. В доступній літературі дані про характер експресії ІМП та ХВР1 клітинами КАЛТ в умовах ХСС - відсутні.

Таким чином, події, які відбуваються в КАЛТ в умовах ХСС суперечать класичній парадигмі стресу, що в умовах посилення резистентності рецепторів до ГК [Reber S. et al., 2007; Schmidt D. et al., 2010], може провокувати не імуносупресію, а виражену активацію імунної системи і запальний процес. Тем не менш, характер змін вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ при ХСС практично не відомий, а з'ясування цих особливостей є головним предметом нашого дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана в Запорізькому державному медичному університеті в рамках планової науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології (2013-2017 р.р.) на тему: “Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології” (№ державної реєстрації 0108U005113). Здобувач є співвиконавцем теми.

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати механізми змін функціонального стану імунних структур, асоційованих зі слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту в умовах ХСС і при модуляції складу кишкової мікрофлори за допомогою молекулярно-генетичних й імуногістохімічних методів. Для досягнення мети були поставлені такі **завдання:**

1. З'ясувати кількісний рівень експресії мРНК Nr3c1- і Adrβ2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1β, ІЛ-17α та Nlrp3–субодиниці інфламасоми в КАЛТ щурів в умовах ХСС.

2. Вивчити розподіл TLR2⁺-, TLR4⁺- і Nf-κB⁺- лімфоцитів в лімфоїдних структурах клубової кишки щурів в умовах ХСС і після введення антибіотику і пробіотику.

3. Визначити динаміку клітинного складу T-bet⁺ (Th1), GATA3⁺ (Th2), Rorγt⁺ (Th17) і Foxp3⁺- клітин (T_{reg}) в лімфоїдних структурах клубової кишки в цих же експериментальних групах тварин.

4. Дослідити особливості експресії імунної субодиниці протеасоми LMP2 та регулятора стресу ендоплазматичного ретикулуму XBP1 в лімфоїдних структурах клубової кишки в цих же експериментальних групах тварин.

Об'єкт дослідження – механізми імунних порушень в КАЛТ у щурів, які піддавалися дії ХСС.

Предмет дослідження – молекулярно-патофізіологічні і структурні зміни стану компонентів КАЛТ в умовах ХСС.

Методи дослідження: патофізіологічні (моделювання хронічного соціального стресу), гістологічні, морфометричні і денситометричні (визначення розмірів клітин, концентрації транскрипційних факторів), імуногістохімічні й імунофлюоресцентні (ідентифікація імунопозитивних клітин), молекулярно-генетичні (виділення тотальної РНК, отримання кДНК, полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (ПЛР-РЧ), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів дослідження. Вперше виявлено в умовах ХСС зниження рівня експресії в КАЛТ мРНК Nr3c1- і Adrβ2- рецепторів та збільшення транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів ІЛ-1β, ІЛ-17α і Nlrp3–інфламасоми, що є ймовірною причиною резистентності лімфоцитів до глюкокортикоїдів і катехоламінів та розвитку запального процесу.

Вперше показано, що в умовах ХСС зростає кількість TLR2⁺- і TLR4⁺-лімфоцитів в КАЛТ, збільшується чисельність Nf-κB⁺- клітин, змінюється баланс TLR2⁺/TLR4⁺ - клітин і щільність TLR2 і TLR4 на мембрані, що свідчить про активацію вродженої імунної системи.

Вперше встановлено, що ХСС збільшує кількість T-bet⁺- і Rorγt⁺- лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію T-bet, Rorγt і GATA3 в лімфоцитах. Ці зміни відбуваються на тлі зменшення кількості T-регуляторних CD25⁺-, Foxp3⁺- і CD25⁺Foxp3⁺- лімфоцитів, зростання співвідношення T-bet⁺/GATA3⁺ та зниження Foxp3⁺/Rorγt⁺- клітин і може свідчити про домінування в умовах ХСС Th1- і Th17-диференціювання на фоні супресорної недостатності.

З'ясовано, що в умовах ХСС порушується система “відповіді на незгорнуті білки”, що на тлі імунопротеасомного дефекту може впливати на генерацію імунодомінантних епітопів в КАЛТ, виживання і диференціювання лімфоцитів.

Експериментально обґрунтована необхідність обережно ставитись до модуляції складу кишкової мікрофлори в умовах ХСС через вірогідність посилення рівня прозапальної сигналізації.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані мають фундаментальне і прикладне значення для сучасної патофізіології й імунології оскільки поглиблюють сучасні уявлення про ключові механізми змін вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ в умовах ХСС.

Дисертанткою, спільно із співавторами, були оновлені і доповнені методи ідентифікації в гістологічних зрізах Th17-клітин і CD25⁺Foxp3⁺ Т-регуляторних лімфоцитів. Розроблено спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків архівних тканин.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені у наукову роботу та навчальний процес кафедр патофізіології Дніпропетровської медичної академії МОЗ України, Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, ВДНЗУ “Українська медична стоматологічна академія”, Харківського національного медичного університету, кафедри фізіології і патофізіології з курсом медичної біології медичного інституту Сумського державного університету.

Особистий внесок здобувача. Результати дослідження, описані в дисертації, отримані автором особисто і полягають у проведенні патентно-інформаційного пошуку, аналізі літературних даних, організації і проведенні імуногістохімічних і молекулярно-генетичних досліджень, статистичній обробці даних, написанні всіх розділів дисертації, формулюванні висновків. Формулювання наукової концепції дослідження, вибір теми, формулювання мети та завдань наукового дослідження, планування роботи здійснені спільно з науковим керівником. У роботах, виконаних у співавторстві, реалізовані наукові ідеї здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлені у вигляді усних і стендових доповідей на міжнародній конференції “Програмована загибель клітин в біології і медицині” (Москва, Росія, 2012); на 2-му міжнародному конгресі з проблем молекулярної імунології та імуногенетики (Анталья, Туреччина, 2014); на 9-му конгресі міжнародного товариства з питань нейроімуномодуляції (Льєж, Бельгія, 2014); на 7-му міжнародному конгресі патофізіологів (Рабат, Марокко, 2014); на 26-му конгресі польського фізіологічного товариства (Щецін, Польща, 2014); на 44-му щорічному засіданні німецького товариства з імунології (Бонн, Німеччина, 2014); на міжнародній конференції “Пробіотики та пребіотики” (Будапешт, Угорщина, 2014); на 5-му міжнародному симпозіумі «Взаємодія нервової та імунної систем в нормі та при патології» (Санкт-Петербург, Росія, 2015); на 11-му конгресі “Нові концепції вродженого імунітету” (Тюбінген, Німеччина, 2015); на 15-му науковому форумі “Дні імунології в Санкт-Петербурзі” (Санкт-Петербург, Росія, 2015), на міжнародному симпозіумі “TOLL2015” (Марбелья, Іспанія, 2015), а також на наукових міжкафедральних семінарах ЗДМУ та Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 27 наукових праць, з них 12 статей (з яких 12 – у виданнях іноземних держав та у виданнях України, які включені до міжнародних наукометричних баз), 3 патенти на корисну модель, 12 тез у матеріалах наукових конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 211 сторінках друкованого тексту. Складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів

дослідження, 4 розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаної літератури, який охоплює 297 найменувань. Робота ілюстрована 25 рисунками, 44 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 140 самках щурів лінії Вістар масою 170-220 г віком 4-5 місяців. Досліджувані тварини були розділені на сім експериментальних груп: контрольні щури (група 1); щури, яким моделювали ХСС1 шляхом трьохтижневої соціальної ізоляції і тривалого психоемоційного впливу (ПЕВ), що вимагав перманентне проживання самок в “агресивному середовищі”, а саме, через перфоровану перегородку в клітці з агресивним самцем, який щодня вступав в конфронтації з підсадженим до нього іншим самцем (група 2); щури, яким моделювали ХСС2 шляхом утримання тварин у перенаселених клітках (20 щурів на клітку) впродовж 3 тижнів із щоденною зміною угруповання, при цьому піддослідну самку кожний день поміщали до нової збалансованої та перенаселеної колонії (група 3); щури з ХСС1 та ХСС2, яким здійснювали модуляцію складу кишкової мікрофлори шляхом в/ш введень аміноглікозидного антибіотику *канаміцину* (*Кан*, Sigma-Aldrich, USA) впродовж 7 діб щоденно, починаючи із 3-го тижня моделювання ХСС у дозі 15 мг/кг (групи 4 і 5, відповідно); щури з ХСС1 та ХСС2, яким здійснювали модуляцію складу кишкової мікрофлори шляхом в/ш щоденних введень *Лактобактеріну* (*Лб*, суміш живих ліофільно висушених лактобактерій *L. plantarum* штам 8P-A3 і *L. fermentum* штам 90T-C4; виробник ВАТ “Біофарма”, м. Київ) впродовж 3-х тижнів у дозі $4 \cdot 10^8$ КУО (групи 6 і 7, відповідно).

Всі експерименти виконувались з дотриманням положень Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” (від 21.02.2006 № 3447-IV) та “Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою” (Страсбург, 1986).

Показники рівня емоційно-поведінкової активності та депресивності у експериментальних тварин визначали за допомогою поведінкових тестів: “Відкрите поле”, тест Порсолта і тест “Перегородка”.

Поведінковий тест “Відкрите поле”. Рівень емоційно-поведінкової активності встановлювали у тесті “відкрите поле”. У піддослідних щурів фіксували число пересічених квадратів, реєстрували горизонтальну і вертикальну рухову активність, час і число грумінгів, обнюхування отворів, акти дефекації за 5 хвилин тесту.

Поведінковий тест “Вимушене плавання” або тест Порсолта. Оцінку поведінки, а саме, рівень депресивності тварин, здійснювали на основі класичного методу Porsolt R. D. (1977) (“вимушеного плавання”). При тестуванні кожного щура поміщали в скляну ємність, наповнену водою ($t=25 \pm 1^\circ\text{C}$), висотою 50 см і діаметром 40 см, при цьому тварина не мала можливості опиратися задніми кінцівками або хвостом об дно циліндра. За 5 хвилин тесту оцінювали час активного плавання, пасивного плавання (дрейф + повна нерухомість) у воді, а також латентний час до прояву першої іммобільності.

Поведінковий тест “Перегородка”. Тест “перегородка” [Кудрявцева Н.Н., 2002] кількісно оцінює рівень комунікативної поведінки та спілкування, а також розвиток тривожності щурів біля прозорої перфорованої перегородки, що розділяє на дві половини загальну клітку в реакції на партнера в сусідньому відсіку. Оцінювали число підходів до перегородки та загальний час, проведений біля перегородки. Тривалість спостереження становила 5 хвилин. Також враховували вираженість орієнтовно-дослідницької та рухової активності тварин: вертикальні стійки, грумінг та фрізінг (завмирання).

Структуру субпопуляцій лімфоїдних клітин клубової кишки вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних морфометричних та денситометричних характеристик при фарбуванні антитілами (АТ). Для проведення даного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (рН =7,4).

Вивчення морфометричних і денситометричних характеристик імунних клітин проводили за допомогою програм AxioVision4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (NIH, США), при цьому досліджуваними параметрами були: щільність відповідних імунопозитивних лімфоцитів на 1 мм² тканини, їх частка в структурі лімфоїдної популяції. Зображення, отримане на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) чи AXIOSKOP (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) або 595 нм (Texas Red) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) вводилось в комп'ютерну систему.

Для ідентифікації TLR2⁺ і TLR4⁺- клітин у гістологічних зрізах клубової кишки використовували метод прямої імунофлюоресценції з використанням мишиних АТ до мембранних паттерн-розпізнавальних рецепторів TLR2 і TLR4 щура (NycultBiotech, Нідерланди), кон'югованих з FITC. Для візуалізації Nf-κB⁺-, T-bet⁺ (Th1), GATA3⁺ (Th2), Rorγt⁺ (Th17), Foxp3⁺- (T_{reg}), LMP2⁺- та XBP1⁺- клітин у гістологічних зрізах клубової кишки застосовували метод непрямой імунофлюоресценції з використанням поліклональних АТ до транскрипційних факторів Nf-κB, T-bet, GATA3, Rorγt, Foxp3, LMP2 і XBP1 (SantaCruzBiotechnology, США) та вторинних антитіл, кон'югованих з FITC (SantaCruzBiotechnology, США).

Для ідентифікації CD25⁺Foxp3⁺- та Rorγt⁺CD8⁺- лімфоцитів використовували метод подвійної імунофлюоресценції, при цьому в якості вторинних антитіл для Foxp3 і Rorγt використовували АТ, кон'юговані з Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США), а для візуалізації CD25⁺- і CD8⁺- лімфоцитів застосовували мишині моноклональні АТ до молекули CD25 і CD8 щура, кон'юговані з FITC (Beckman Coulter, США).

Досліджували три морфофункціональні зони: заповнені лімфоцитами ворсинки (ЗЛВ), субепітеліальну зону (СЗ) та лімфоїдні фолікули (ЛФ) згрупованих лімфоїдних вузликів.

Методи молекулярно-генетичних досліджень. Для дослідження експресії мРНК генів *Nr3c1* і *Adrb2*-рецепторів, прозапальних цитокінів та *Nlrp3*-інфламасоми

імунними клітинами КАЛТ щурів в умовах ХСС використовували архівний гістологічний матеріал (парафінові блоки) віком 3-х років. Тотальну РНК отримували з гістологічних зрізів завтовшки 15 мкм, для цього проводили їх попередню депарафінізацію в ксилолі та регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%). Підготовлені зразки гомогенізували за допомогою ступки і товчачика, поміщали в пробірки “Ахуген” (США) та проводили додаткову депарафінізацію і повторну регідратацію лімфоїдних тканин згідно протоколу дослідження. Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору “Trizol RNA Prep 100” (Ізоген Lab., LTD, Росія), який містив *Trizol reagent* (лізуючий реагент, до складу якого входив денатуруючий агент гуанідинтіоціонат та фенол с рН=4,0) та *ExtraGeneE* (суспензія суміші іонообмінників). Концентрацію та якість виділеної тотальної РНК визначали на спектрофотометрі LibraS32PC (Biochrom ltd., Англія). Для подальшої процедури зворотної транскрипції (ЗТ) відбирали зразки РНК з наступними показниками (за співвідношенням оптичної щільності A260/A280): 260нм/280нм=1,8-2,2. Для синтезу кДНК проводили реакцію ЗТ з використанням набору ЗТ-1 фірми “Синтол” (Росія). Отриману кДНК зберігали при -20°C. Молекулярно-генетичні дослідження рівня експресії мРНК генів здійснювали за допомогою ампліфікатора CFX96™Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) і набору реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2x) (ThermoScientific, США). Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина). В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta C_t$. В експеримент були включені негативні контролю: без додавання кДНК матриці в реакцію ПЛР, без додавання мРНК матриці в синтезі кДНК, без додавання ферменту в синтезі кДНК. Усі реакції ампліфікації виконували на індивідуальних зразках у трьох повторях.

Методи статистичного аналізу. Всі одержані експериментальні дані обробляли на комп'ютері пакетом статистичних програм EXCEL з пакету MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії й помилки середньої (m). Для виявлення достовірності різниць результатів досліджень в експериментальних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт Стьюдента (t), після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Особливості соціальної поведінки щурів у поведінкових тестах “Відкрите поле”, Порсолта і “Перегородка”. Результати проведеного нами тестування експериментальних тварин у тесті “Відкрите поле” показали, що розвиток ХСС призводив до зниження основних показників рухово-дослідної та емоційної активності: горизонтальної рухової активності (на 25%, $p < 0,05$ при ХСС1 і 29%, $p < 0,05$ за умов ХСС2), вертикальної рухової активності (на 38%, $p < 0,05$ за умов ХСС1) і 47%, $p < 0,05$ при ХСС2) і дослідної активності (на 41%, $p < 0,05$ за умов ХСС1 і на 54%, $p < 0,05$ при ХСС2). Отримані результати свідчили про прояв вираженої тривожності у щурів в умовах хронічного соціального стресу. Крім того, ХСС приводив до посилення грумінгу (на 75%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 92%, $p < 0,05$ за умов ХСС2) та актів дефекації (болюси) (у 3,6 рази, $p < 0,05$ при ХСС1 і у 2,8 рази, $p < 0,05$ за умов ХСС2) у порівнянні з контрольною групою тварин. ХСС викликав зміну поведінки щурів і в тесті Порсолта на визначення тривожності – спостерігалось зниження тривалості активного плавання (на 39%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 42%, $p < 0,05$ за умов ХСС2) і збільшення стадії іммобілізації (на 25%, $p < 0,05$ за умов ХСС1 і на 32%, $p < 0,05$ при ХСС2) у порівнянні з контролем. Результати тестування експериментальних тварин в тесті “Перегородка” також показали, що ХСС призводив до розвитку підвищеної тривожності у самок щурів, про це свідчило зниження числа підходів до перегородки (на 61%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 52%, $p < 0,05$ на фоні ХСС2), середнього часу перебування біля перегородки (на 37%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 31%, $p < 0,05$ на фоні ХСС2) у порівнянні з контрольною групою.

Рівень експресії мРНК Nr3c1- і Adrb2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17 α та Nr3-субодиниці інфламасоми в КАЛТ щурів в умовах ХСС. Можливими причинами розвитку резистентності рецепторів до ГК в умовах ХСС є зниження рівня експресії мРНК Nr3c1. Дослідження експресії гену *Nr3c1* в КАЛТ клубової кишки показало, що розвиток ХСС призводив до значного зниження вмісту його мРНК (*Nr3c1* - у 3,1 рази, $p < 0,05$ при ХСС1 і у 10 разів, $p < 0,01$ на фоні ХСС2) у порівнянні з контрольною групою щурів. Отримані нами дані узгоджуються з даними інших досліджень. Так, Jung S. et al. (2015) встановив, що експресія мРНК ГК рецепторів зменшена в макрофагах селезінки при ХСС. Стрес також індукує значне зниження експресії мРНК FK506-зв'язуючого білка 52 (FKBP52) та підвищення експресії 9 різних мікроРНК, 6 з яких взаємодіють з мРНК ГК рецепторів.

Важливими ефекторними гормонами під час стрес-реакції є КХ, а Т- і В-лімфоцити активно експресують β 2-адренергічні рецептори (*Adrb2*) на різних стадіях диференціювання. Дослідження експресії *Adrb2* в КАЛТ клубової кишки показало, що розвиток ХСС призводив до зниження вмісту мРНК гену *Adrb2* - у 12,5 рази ($p < 0,02$) при ХСС1 та у 10 разів ($p < 0,01$) в умовах ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів. Виявлені нами зміни експресії *Adrb2*-рецепторів здатні безпосередньо впливати на лімфоїдні клітини. Так, Sanders V.M. et al. (2012) встановлено, що активація *Adrb2* порушує диференціювання, проліферацію та функції Th1-клітин, а Guerreschi M. et al. (2013) виявлено, що передача сигналів через *Adrb2* посилювала супресорну активність T_{reg} *in vitro*, сприяла конверсії

Foxp3⁻ клітин в індукцибельні Foxp3⁺T_{reg}⁻ клітини. Крім того, в T_{reg} - клітинах Adrβ2-сигналізація збільшувала експресію негативної коstimуляторної молекули CTLA-4. Тому, виявлене нами зниження рівня експресії мРНК Adrβ2 може частково пояснити причину дефіциту супресорної сигналізації.

Nlrp3 - інфламасома відповідальна за активацію каспази-1 і сприяє дозріванню найбільш активного прозапального цитокіну ІЛ-1β, а її підвищена експресія пов'язана з розвитком багатьох аутоімунних і запальних захворювань. Виявлено, що ХСС супроводжувався зростанням рівня мРНК Nlrp3-інфламасоми (у 17 разів, p<0,05 при ХСС1 і у 2,2 рази, p<0,05 за умов ХСС2) у порівнянні з контрольною групою тварин. Це відбувалось на тлі транскрипційної індукції генів прозапальних цитокінів ІЛ-1β і ІЛ-17α в КАЛТ щурів, більш виразною у випадку ХСС1. Зокрема, встановлено зростання транскрипційної активності генів ІЛ-1β (у 6 разів, p<0,05 при ХСС1 і у 2,8 разів, p<0,05 за умов ХСС2) і ІЛ-17α (у 2,3 рази, p<0,05 за умов ХСС1 і на 50%, p<0,05 при ХСС2) у порівнянні з відповідними величинами у тварин контрольної групи. Отримані нами дані узгоджуються з даними інших дослідників. Посилення експресії мРНК Nlrp3 показано при запаленні тонкого кишківнику, на моделях коліту, а в дослідженні Meng et al. (2010) при аналізі CD4⁺T-клітинної відповіді у мишей в результаті гіперактивації Nlrp3 спостерігалось явне зміщення балансу Th1/Th17 в сторону Th17 відповіді.

Розподіл TLR2⁺-, TLR4⁺- і Nf-κB⁺- лімфоцитів в лімфоїдних структурах клубової кишки щурів в умовах ХСС і після введень антибіотику і пробіотику. Проведені дослідження показали, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості лімфоцитів, які експресують TLR2 і 4 типу в КАЛТ щурів, найбільш вираженим у ЗЛВ (TLR2⁺ - лімфоцити) і в ЛФ (TLR4⁺- лімфоцити), та призводив до зростання числа Nf-κB⁺ - клітин: в ЗЛВ – у 1,8 - 2 рази (p<0,05); в С3 – на 52 – 91% (p<0,05); в ЛФ – на 89–92% (p<0,05), а також впливав на щільність TLR2, TLR4 і концентрацію Nf-κB в імунопозитивних клітинах. Оцінка балансу між TLR2⁺/TLR4⁺- лімфоцитами в КАЛТ свідчило про те, що розвиток ХСС призводив до зростання співвідношення TLR2⁺/TLR4⁺ - клітин в лімфоїдних структурах клубової кишки щурів з переважанням популяції TLR2⁺- лімфоцитів. Так, коефіцієнт розподілу TLR2⁺/TLR4⁺ - клітин збільшився в ЗЛВ на 97% (p<0,05) за умов ХСС1 і на 66% (p<0,05) при ХСС2; у С3 - на 39% (p<0,05) при ХСС1 і на 41% (p<0,05) за умов ХСС2; в ЛФ - на 32% (p<0,05) при ХСС1 у порівнянні з контролем. ХСС індукував зростання рівня лігандів для TLR2. Ці результати узгоджуються з даними інших дослідників, зокрема щодо здатності ХСС підсилювати експресію TLR2 і TLR4 макрофагами селезінки [Bailey M. et al., 2007], викликати індукцію фактору транскрипції Nf-κB в моноцитах периферичної крові у здорових добровольців, які проходили соціальний стрес-тест Тріра [Bierhaus A. et al., 2004]. Зміни складу кишкової мікрофлори шляхом введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувались зниженням кількості TLR2⁺-, TLR4⁺- і Nf-κB⁺ - клітин при ХСС2 за винятком ЛФ. При цьому, в лімфоїдних фолікулах загальне число TLR2⁺- і TLR4⁺- лімфоцитів збільшувалось на 75% - у 2,1 рази (p<0,05), також при ХСС2 зростала чисельність Nf-κB⁺- клітин на 54% (p<0,05) в С3. Введення *Лб* стресованим щурам призводили до зниження сумарної ЩП TLR2⁺- лімфоцитів в

умовах ХСС1 і не впливали на їх чисельність при ХСС2, а загальна кількість TLR4⁺- лімфоцитів зростала (в ЗЛВ - на 46%, ХСС2; в ЛФ - на 43%, ХСС1 і на 49%, ХСС2). Одночасно з цим зменшувалась кількість Nf-kB⁺ - клітин (в ЗЛВ - на 46%, ХСС1 і на 50%, ХСС2; в ЛФ - на 17%, ХСС2) за винятком СЗ, де їх число при ХСС1 збільшувалось (на 29%); *Лб* різноспрямовано впливав на концентрацію Nf-kB в імунопозитивних клітинах.

Таким чином, нами встановлено, що пероральний прийом лактобактерину в умовах ХСС посилює в окремих зонах КАЛТ експресію PRR, причому TLR4, які не є безпосередніми сенсорами ПАМП лактобацил. Це не суперечить даним, про те, що введення *Лб* експериментальним тваринам може активувати експресію TLR2 і TLR4, пригнічувати деградацію інгібітору ядерного фактора kB [Bai, 2006], зменшувати рівень T_{reg} - клітин та підвищувати кількість прозапальних Th17- і Th1-клітин, а також продукцію ІЛ-12 [Chiba Y., 2010; Shida K., 2011].

Оцінка клітинного складу T-bet⁺ (Th1), GATA3⁺ (Th2), Rorγt⁺ (Th17) і Foxp3⁺ (T_{reg}) в лімфоїдних структурах клубової кишки в умовах ХСС і після введення антибіотику і пробіотику. На наступному етапі роботи ми досліджували розподіл субпопуляцій Т-хелперів в КАЛТ. Встановлено, що розвиток стресу супроводжувався збільшенням кількості T-bet⁺- клітин в обох досліджуваних зонах КАЛТ (на 39 – 92%, p<0,05), GATA3⁺ - лімфоцитів в ЗЛВ (на 61 – 74%, p<0,05), зменшенням щільності Th2 в СЗ при ХСС1 (на 21%, p<0,05), зростанням концентрації T-bet і GATA3 в лімфоцитах. При цьому, аналіз змін балансу субпопуляцій Т-хелперів в КАЛТ показав, що розвиток ХСС не впливав на співвідношення T-bet⁺/GATA3⁺ - клітин в ЗЛВ клубової кишки шурів і призводив до підвищення даного коефіцієнту в СЗ (на 75%, p<0,05 при ХСС1 і на 46%, p<0,05 на фоні ХСС2) у порівнянні з відповідними величинами у контрольних тварин.

Аналіз розподілу Rorγt - експресуючих і T_{reg}- лімфоцитів продемонстрував, що розвиток ХСС призводив до збільшення кількості Rorγt⁺ - лімфоцитів (на 94% - у 2,1 рази в ЗЛВ, у 2,3 рази в СЗ лише за умов ХСС2) та Rorγt⁺CD8⁺ - клітин (у 2,1-2,3 рази в ЗЛВ) у порівнянні з величинами в контролі і супроводжувався зростанням рівня Rorγt. Ці зміни відбувались на тлі зменшення кількості CD25⁺- (на 41% - у 2,1 рази), Foxp3⁺- (на 44 - 49% в ЗЛВ, 20 - 39% в СЗ) і CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів (на 37-51%) і свідчали про домінування в умовах ХСС Th17- і Th1- диференціювання. Це підтверджувалось і зниженням співвідношення T_{reg}/Th17-лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки шурів. Так, коефіцієнт розподілу Foxp3⁺/Rorγt⁺ - клітин зменшився в ЗЛВ у 4,1 рази (p<0,05) за умов ХСС1 і у 3,5 рази (p<0,05) при ХСС2; у СЗ - на 39% (p<0,05) при ХСС1 і у 3,8 рази (p<0,05) за умов ХСС2 у порівнянні з контролем. Наші дані узгоджуються з даними інших дослідників, про те, що при розвитку стресу і стрес-індукованої депресії в лімфоїдних органах змінюється кількість Th17- лімфоцитів, порушується баланс між T_{reg}/Th17 і Th1/Th2 - клітинами [Schmidt D. et al., 2010; Hong M. et al., 2013].

Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до зростання кількості T-bet⁺- (на 87 – 94%, p<0,05) і GATA3⁺- лімфоцитів (на 42% в СЗ, p<0,05) за умов ХСС1, не впливало на їх чисельність при ХСС2, зменшувало ЩП Rorγt⁺- лімфоцитів, підвищувало чисельність Foxp3⁺- клітин (тільки в ЗЛВ),

різноспрямовано впливало на концентрацію досліджуваних факторів у залежності від виду стресу. Прийом *Кан* стресованими тваринами призводив до достовірного збільшення співвідношення Th1/Th2- лімфоцитів лише у випадку ХСС1 (в ЗЛВ у 2,1 рази, $p < 0,05$ і в СЗ на 37%, $p < 0,05$) і не впливав на цей баланс за умов ХСС2. При цьому коефіцієнт розподілу $T_{reg}/Th17$ – лімфоцитів збільшився в ЗЛВ у 2,9 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,7 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, у СЗ – на 61% ($p < 0,05$) лише у разі ХСС2. Таким чином, незважаючи на домінування Th1-субпопуляції після введення *Кан* стресованим тваринам, спостерігається і збільшення числа T_{reg} – клітин, здатних нівелювати їх ефекторні функції.

Введення *Лб* щурам супроводжувалось зростанням кількості $T\text{-bet}^+$ -лімфоцитів в СЗ (на 25 – 50%, $p < 0,05$), зменшенням їх щільності в ЗЛВ (на 24 – 30%, $p < 0,05$), не впливало на чисельність $GATA3^+$ - клітин, збільшувало концентрацію $T\text{-bet}$ у лімфобластів і $GATA3$ у середніх лімфоцитів. При цьому загальна кількість $Ror\gamma^+$ - лімфоцитів зменшувалась, а $Foxp3^+$ - і $CD25^+Foxp3^+$ - клітин зростала. При прийомі *Лб* експериментальними тваринами зміни у співвідношенні $T\text{-bet}^+/GATA3^+$ - лімфоцитів носили різноспрямований характер: Th1/Th2 баланс знижувався в ЗЛВ (на 18%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 29%, $p < 0,05$ у разі ХСС2) і зростав в СЗ (на 29%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 24%, $p < 0,05$ за умов ХСС2). У той же час, співвідношення $Foxp3^+/Ror\gamma^+$ - клітин після введення *Лб* стресованим щурам збільшувалось у всіх вивчених нами морфофункціональних зонах, найбільш інтенсивно у ЗЛВ. Так, коефіцієнт розподілу $T_{reg}/Th17$ - лімфоцитів збільшився в ЗЛВ у 5 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,4 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2; у СЗ - на 77% ($p < 0,05$) у разі ХСС1 і у 5,8 разів ($p < 0,05$) при ХСС2. Отримані нами дані узгоджуються з даними інших досліджень, які продемонстрували здатність *Лб* збільшувати кількість T_{reg} - клітин, підвищувати експресію $Foxp3$, зменшувати рівень експресії $Ror\gamma$ і $T\text{-bet}$ в моноцитах периферичної крові [Zarrati M., 2013; Forsberg A., 2013] і, таким чином, запобігати розвитку запальних і АІЗ, а також зменшувати стан депресії і тривоги в умовах стресу. Разом з тим, є дані про здатність *Лб* збільшувати продукцію ІЛ-12 клітинами селезінки і Пейєровими бляшками мишей навіть сильніше, ніж деякі патогенні бактерії, що, в свою чергу, стимулює утворення Th1-клітин і продукцію прозапального $IFN-\gamma$ [Chiba Y. et al., 2010; Shida K. et al., 2011], це корелює і з нашими даними щодо збільшення числа $T\text{-bet}^+$ - клітин в СЗ після введення *Лб*. Тобто, ефекти пробіотиків в умовах ХСС можуть суттєво відрізнятися від їх “класичних” ефектів.

Особливості експресії імунної субодиниці протеасоми LMP2 та регулятора стресу ендоплазматичного ретикулулу ХВР1 в лімфоїдних структурах клубової кишки в умовах ХСС і після введення антибіотику і пробіотику.

Відомо, що важливими регуляторами процесингу власних і мікробних антигенів є імунні протеасоми (імунопротеасоми, ІМП), які ефективно генерують імунодомінантні епітопи в місцях запалення [Angeles A. et al., 2012]. Нами встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості $LMP2^+$ - лімфоцитів в лімфоїдних структурах клубової кишки щурів, найбільш вираженої в ЗЛВ. Так, сумарна щільність $LMP2^+$ - клітин в ЗЛВ зросла у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,5 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2; в ЛФ - у 3,3 рази ($p < 0,05$) при

ХСС1 і на 60% ($p < 0,05$) за умов ХСС2; в СЗ - у 2,6 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 46% ($p < 0,05$) за умов ХСС2. Введення *Кан* супроводжувалось збільшенням ЩП LMP2⁺-лімфоцитів, в ЗЛВ і ЛФ при ХСС1 (на 24%, $p < 0,05$ і на 27%, $p < 0,05$, відповідно) і в СЗ при ХСС2 (на 50%, $p < 0,05$). Прийом *Лб* призводив до зростання кількості LMP2⁺ - лімфоцитів тільки в ЛФ при ХСС2 (на 35%, $p < 0,05$). Виявлені нами зміни рівнів експресії LMP2 в умовах ХСС можуть суттєво впливати на ризик розвитку ЗЗК. Так, раніше виявлено зв'язок між підвищеною експресією LMP2 та розвитком запальних і аутоімунних захворювань, зокрема, ЦД 1 типу, ревматоїдного артриту, неспецифічного виразкового коліту [Basler M. et al., 2013], хвороби Крона [Visekruna A. et al., 2009], ЗЗК [Fitzpatrick L. et al., 2007; Moebius J. et al., 2010; Hensley S. et al., 2010; Hutchinson S. et al., 2011; Basler M. et al., 2013].

Серед трьох основних систем “відповіді на незгорнуті білки” важливе значення має сигнальна система IRE1-ХВР1 [Glimcher L. et al., 2010]. Ми з'ясували, що лімфоцити КАЛТ активно експресують ХВР1: найбільша кількість ХВР1⁺- клітин локалізована в ЛФ, найменша - у ЗЛВ. Серед ХВР1⁺- клітин переважали ХВР1⁺- малі лімфоцити, на частку яких припадало 60% (у ЗЛВ) – 68% (в ЛФ) від загальної кількості ХВР1⁺- клітин. Розвиток ХСС супроводжувався зниженням чисельності ХВР1⁺- лімфоцитів в лімфоїдних структурах клубової кишки, найбільш вираженої в ЛФ. Так, сумарна щільність ХВР1⁺- клітин в ЗЛВ знижувалась на 31% (ХСС1) - 35%, $p < 0,05$ (ХСС2), в СЗ – на 47% (ХСС2) - 58%, $p < 0,05$ (ХСС1), в ЛФ – у 2,5 (ХСС2) - 3 рази (ХСС1) у порівнянні з контролем. Пероральний прийом *Кан* не впливав на ЩП ХВР1⁺- лімфоцитів в ЗЛВ, але призводив до збільшення їх числа в СЗ на 41% ($p < 0,05$) при ХСС1, сприяв інтенсивному зростанню їх кількості в ЛФ - на 66% ($p < 0,05$) у разі ХСС1 і на 42% ($p < 0,05$) при ХСС2. Навпаки, введення *Лб* стресованим щурам, на відміну від *Кан*, більш значний вплив на експресію ХВР1 лімфоцитами КАЛТ чинило при ХСС2. Зокрема, загальна кількість ХВР1⁺- лімфоцитів у тварин, підданих дії ХСС1, збільшувалась лише в ЛФ (на 97%, $p < 0,05$), тоді як під дією ХСС2 їх кількість зростала вже у всіх вивчених морфофункціональних зонах: в ЗЛВ - на 70% ($p < 0,05$), в СЗ – на 63% ($p < 0,05$), в ЛФ – у 2 рази ($p < 0,05$). Виявлені нами зміни рівнів експресії ХВР1 при стресі можуть впливати на рівень імунної відповіді, враховуючи здатність цього транскрипційного фактору індукувати диференціювання активованих В-лімфоцитів у плазматичні клітини [Brunsing R. et al., 2008], впливати на утворення T_{reg} [Franco A. et al., 2010].

Таким чином, за отриманими результатами можна назвати наступні імунні механізми активації прозапальної сигналізації в КАЛТ в умовах ХСС (див. схему):

1. Активація вроджених компонентів імунної системи, яка супроводжується зміною розподілу TLR2⁺/TLR4⁺ - і Nf-κB⁺ - лімфоцитів, а також змінами щільності ПРР на поверхні імунних клітин і концентрації транскрипційного фактора Nf-κB в лімфоцитах. Така активація вродженої ланки імунної системи призводить до зростання рівня цитокінових і коstimуляторних сигналів і, відповідно, включення адаптивної імунної відповіді. Це підтверджується зростанням транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів ІЛ-1β, ІЛ-17α та Nlrp3–інфламасоми.

2. Активація адаптивної ланки імунної системи призводить до дисбалансу Th1/Th2 і T_{reg}/Th17-клітин і свідчить про домінування в умовах ХСС Th1 - і Th17 - диференціювання.

3. Порушення Т-регуляторної ланки, що підтверджується зменшенням кількості CD25⁺-, Foxp3⁺- і CD25⁺Foxp3⁺- лімфоцитів і може сприяти втраті ауто толерантності й ініціювати розвиток ЗЗК.

4. Імунопротеасомний дефект, який характеризується збільшенням кількості LMP2-клітин, що може змінювати рівень процесингу антигенів та генерації імунодомінантних епітопів, в першу чергу, в місцях запалення, посилювати активацію “наївних” Т - лімфоцитів.

5. Порушення “відповіді на незгорнуті білки” через зниження експресії транскрипційного фактору ХВР1 сприяє накопиченню таких конформаційно-дефектних білків в люмені ЕПР, знижує ефективність їх деградації і продукції шаперонів, здатно індукувати різні варіанти клітинної загибелі, порушувати диференціацію та виживання ДК, В- і Т-лімфоцитів.

6. Зміни чутливості клітин-мішеней до ГК і КХ через зниження рівня експресії мРНК їх рецепторів Nr3c1- та Adrβ2- можуть нівелювати імуносупресивні ефекти ГК, впливати на метаболізм лімфоцитів і диференціювання Т-хелперів.

Слід відмітити, що можливими додатковими причинами виявлених порушень можуть бути зміни складу кишкової мікрофлори в умовах стресу, та, відповідно, рівня лігандів для PRR, активності систем кворум-сенсингу, збільшення проникності кишкових бар'єрів і рівня бактеріальної транслокації та інше.

ВИСНОВКИ

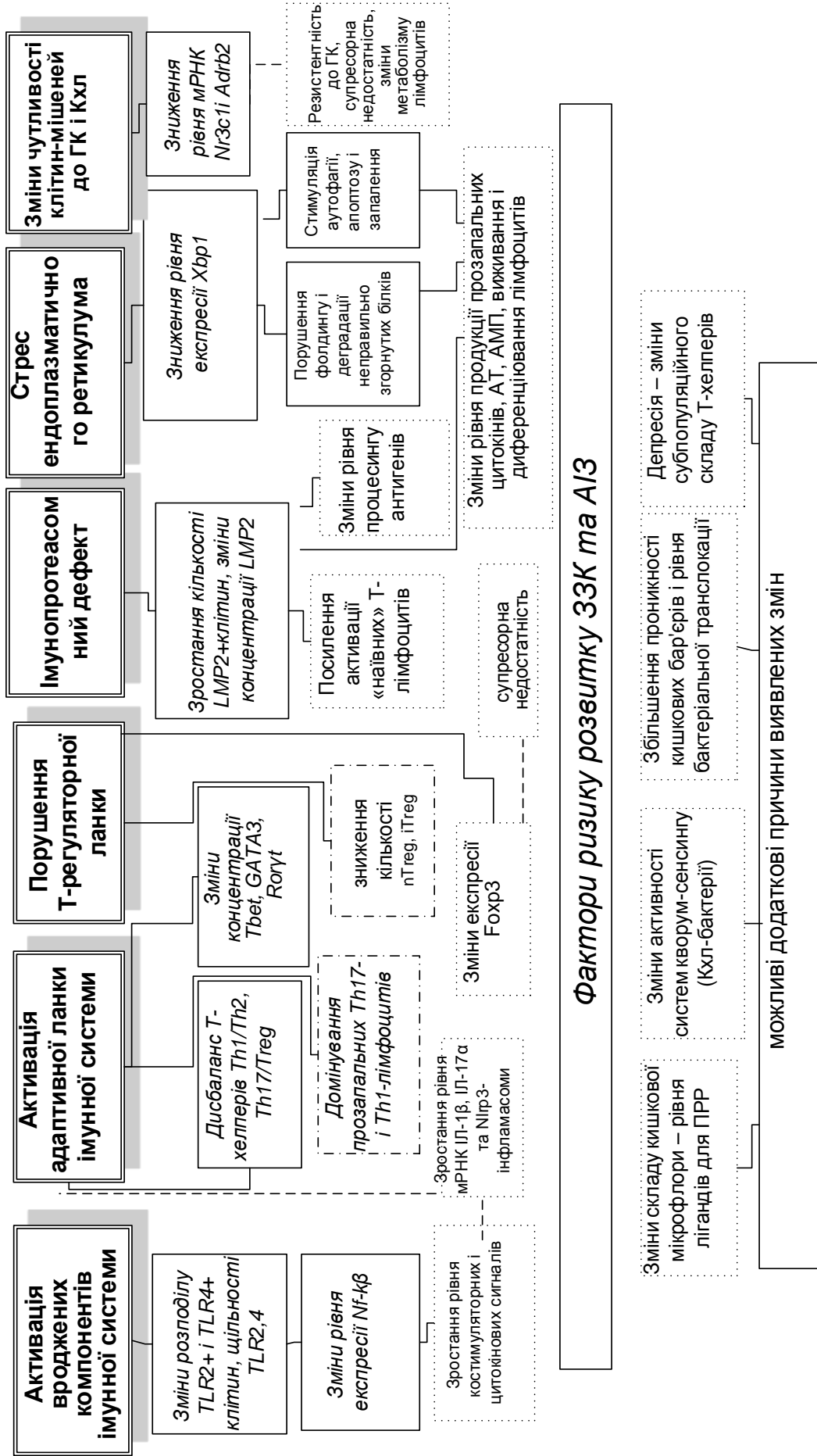
Хронічний соціальний стрес - тягар сучасних суспільств і визнаний фактор ризику для численних фізичних і афективних розладів. ХСС здатен викликати значні порушення не тільки у нейроендокринній системі, але і призводити до змін у функціонуванні вродженого та адаптивного імунітету, а стрес-індукована імунна дизрегуляція є тригером розвитку багатьох патологічних станів, включаючи ЗЗК. Тому, з'ясування механізмів змін функціонального стану імунних структур, асоційованих зі слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту в умовах ХСС є актуальним для сучасної патофізіології.

У відповідності до поставленої мети, сформульованих завдань і отриманих результатів дослідження зроблено наступні висновки:

1. В умовах ХСС реєструється зниження рівня експресії в КАЛТ мРНК Nr3c1- (у 3 - 10 разів) і Adrβ2-рецепторів (у 10 - 12 разів), зростання транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів ІЛ-1β (у 3 - 6 разів), ІЛ-17α (50% - у 2 рази) та Nlrp3-інфламасоми (у 2 - 17 разів), більш виразним у випадку ХСС1.

2. В умовах ХСС зростає кількість TLR2⁺- і TLR4⁺- лімфоцитів в КАЛТ, збільшується чисельність Nf-kB⁺- клітин (в ЗЛВ – у 2 рази; в СЗ – на 52 – 91%; в ЛФ – на 89–92%), змінюється баланс TLR2⁺/TLR4⁺- клітин і щільність TLR2 і TLR4, концентрація Nf-kB в клітинах, що свідчить про активацію вродженої імунної системи.

ІМУННІ МЕХАНІЗМИ АКТИВАЦІЇ ПРОЗАПАЛЬНОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ В КАЛТ В УМОВАХ ХСС



3. Розвиток стресу збільшує кількість T-bet⁺- (на 39–92%) і Rorγt⁺-лімфоцитів (на 94% - у 2 рази в ЗЛВ, у 2 рази в СЗ при ХСС2) та Rorγt⁺CD8⁺-клітин (у 2 рази в ЗЛВ), підвищує концентрацію T-bet, Rorγt і GATA3 в лімфоцитах. Ці зміни відбуваються на тлі зменшення кількості CD25⁺- (на 41% - у 2 рази), Foxp3⁺- (на 44–49% в ЗЛВ, 20–39% в СЗ) і CD25⁺Foxp3⁺- лімфоцитів (на 37–51%), зростання співвідношення T-bet⁺/GATA3⁺ та зниження Foxp3⁺/Rorγt⁺- клітин і свідчать про домінування в умовах ХСС Th1- і Th17- диференціювання на тлі супресорної недостатності.

4. ХСС індукує зниження кількості XBP1⁺- лімфоцитів в КАЛТ (на 31% - у 3 рази), найбільш виразне в ЛФ, змінює концентрацію білка XBP1 в імунопозитивних клітинах. Ці зміни супроводжуються збільшенням загальної кількості LMP2⁺-лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки щурів (у 2,5 - 3 рази в ЗЛВ; на 60% - у 3 рази в ЛФ; на 46% - у 3 рази в СЗ).

5. Реакція КАЛТ на модуляцію складу кишкової мікрофлори в умовах ХСС незважаючи на загальний ефект зниження активації її вроджених і адаптивних компонентів може в окремих випадках свідчити і про посилення рівня прозапальної сигналізації. Введення АБ призводить до зростання щільності TLR2⁺- і TLR4⁺-лімфоцитів на 75% - у 2,1 рази в ЛФ, на 54% Nf-kB⁺-клітин в СЗ за умов ХСС2, збільшення кількості T-bet⁺- і GATA3⁺- лімфоцитів в умовах ХСС1. Введення пробіотику – до підвищення чисельності TLR4⁺- лімфоцитів (в ЗЛВ – на 46%, ХСС2; в ЛФ - на 43%, ХСС1 і на 49%, ХСС2), Nf-kB⁺-клітин в СЗ (на 29%, при ХСС1), а також супроводжується зростанням кількості T-bet⁺-лімфоцитів в СЗ (на 25 – 50%).

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Topol I. Study of expression of TLR2, TLR4 and transcription factor NF-kB structures of GALT of rats in the conditions of the chronic social stress and modulation of structure of intestinal microflora/ I. Topol, A. Kamyshny// GeorGianMedicalnews. – 2013. – № 12 (225). –Р. 115-122. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

2. Топол І.О. Вивчення експресії молекулярних маркерів Т-регуляторних клітин в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори / І. О. Топол, О. М. Камишний// Клінічна та експериментальна патологія. – 2013. – № 2 (44). – С. 180-184. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

3. Топол І. О. Вплив соціального стресу на розподіл RORγt-експресуючих клітин кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів/ І. О. Топол, О. М. Камишний //Здобутки клінічної і експериментальної медицини. -Т.: ТДМУ ім. І. Я. Горбачевського. – 2013. – № 2. - С.191-195. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

4. Topol I. A. Peculiarities of XBP1 expression with lymphocytes of small intestine in Wistar rats under chronic social stress and modulation of intestinal microflora

composition with antibiotics and probiotics/ I. A. Topol, A. M. Kamyshny, A. V. Abramov, Yu. M. Kolesnik // *Фізіологічний журнал*. – 2014. – Т. 60, № 2 – С. 38-44. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

5. Топол И. А. Изменения баланса субпопуляций Т-хелперов в КАЛТкрыс в условиях хронического зоосоциального стресса и модуляции состава кишечной микрофлоры/ И. А. Топол, А. М. Камышный // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. – 2014. — №2. – С. 44-50. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

6. Топол И. А. Соотношение уровня экспрессии транскрипционных регуляторов дифференцировки Т-хелперов в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани крыс в условиях хронического социального стресса / И. А. Топол, А. М. Камышный // *Российский иммунологический журнал / Russian Journal of Immunology*. – 2014. – Том 8(17). — № 3. — С. 408–410. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

7. Топол І. О. Експресія імунної субодиниці протеасоми LMP2 лімфоцитами кишково-асоційованої лімфоїдної тканини в умовах хронічного соціального стресу і модуляції складу кишкової мікрофлори/ І. О. Топол, О. М. Камишний // *Вісник морфології*. – 2014. – Т 20, № 2. – С. 347-352. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

8. Жеребятъев О. С. Закономірності експресії TLR лімфоцитами в умовах експериментальної патології/ О. С. Жеребятъев, І. О. Топол, А. С. Деген, О. М. Камишний // *Світ медицини та біології*. — 2014. — №1(43). — С. 163-169. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

9. Топол І. О. Зміни транскрипційної активності генів NR3C1 і ADRB2-рецепторів, про-запальних цитокінів та NLRP3–інфламасоми у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів в умовах хронічного соціального стресу / І. О. Топол, О. М. Камишний // *Клінічна та експериментальна патологія*. – 2015. – № 2. – С. 220 – 225. *Особистий внесок дисертанта – проведення молекулярно-генетичного дослідження методом ЗТ-ПЛР-РЧ.*

10. Topol I. A. Expression of mRNA of Nlrp3 inflammasome and pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-17 α of small intestine in rats under chronic social stress / I. A. Topol, A. M. Kamyshny // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. – 2015. – №3. - С.7-13. *Особистий внесок дисертанта – проведення молекулярно-генетичного дослідження методом ЗТ-ПЛР-РЧ.*

11. Топол И. А. Влияние социального стресса на экспрессию мРНК генов глюкокортикоидных NR3C1 и ADRB2-рецепторов в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани /И. А. Топол, А. М. Камышный // *Российский иммунологический журнал* – 2015. –Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 569 – 571. *Особистий внесок дисертанта – проведення молекулярно-генетичного дослідження методом ЗТ-ПЛР-РЧ.*

12. Камышный А. М. Механизмы активации кишечного ассоциированной лимфоидной ткани в условиях хронического социального стресса / А. М. Камышный, И. А. Топол // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 455-460. *Особистий внесок дисертанта – отримання експериментальних даних та проведення їх статистичної обробки.*

13. Спосіб ідентифікації Т-хелперів 17 типу (Th17). Патент України №72776 від 27.08.12, МПК G01N21/00 Бюл. № 16 Камишний О. М., Топол І. О., Деген А. С. *Особистий внесок дисертанта – аналіз результатів дослідження.*

14. Спосіб ідентифікації натуральних CD25+Foxp3 регуляторних Т-клітин. Патент України №72775 від 27.08.12, МПК G01N21/00 Бюл. № 16. Камишний О. М., Топол І. О., Деген А. С., Луц І. Ю., Прозорова Т. М., Жеребятєв О. С. *Особистий внесок дисертанта – аналіз результатів дослідження.*

15. Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин. Патент України № 102400 від 26.10.2015, МПК G01N21/00 Бюл. № 20. Камишний О. М., Жеребятєв О. С., Топол І. О., Деген А. С., Тарасевич Ю. В., Прозорова Т. М., Путілін Д. А., Камишна В. А. *Особистий внесок дисертанта – аналіз літератури та результатів дослідження.*

Результати досліджень представлено на таких конференціях:

1. Kamyshny A. M. Influence of chronic social stress on the expression of the immunoproteasome subunits LMP2 in Peyer's Patches of Wistar rat s/ A. M. Kamyshny, I. A. Topol // Abstract book. Programmed cell death in biology and medicine.—Moscow (Russia). – 2012. – P. 21-22.

2. Kamyshny A. M. Features of TLR-2⁺, TLR-4⁺ and Nf-kB⁺-expressive lymphocytes of the intestine under stress / A. M. Kamyshny, I. A. Topol // Abstract book. 2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress. – Antalya (Turkey). – 2014. – P. 77.

3. Kamyshny A. M. Expression of molecular marker of T-regulatory cells in the condition of social stress and modulation of the composition of intestinal microflora / A. M. Kamyshny, I. A. Topol // Neuroimmunomodulation: Abstract Book. 9th Congress of the international society for neuroimmunomodulation. – Liège (Belgium). – 2014. – Vol. 21. – P.56.

4. Topol I. A. Functional status of components of the innate immune system of the intestine under stress / I. A. Topol, A. M. Kamyshny // Abstract Book. 7th International Congress of the International Society for Pathophysiology, University Mohammed V. – Rabat (Morocco). – 2014. – P. 74-75.

5. Kamyshny A. M. XBP1 expression of lymphocytes in terms of modulation of the intestinal microflora: from social stress to the endoplasmic reticulum stress / A. M. Kamyshny, I. A. Topol // Journal of physiology and pharmacology: Book of programme and abstracts. 26th Congress of the Polish Physiological Society. – Szczecin (Poland). – 2014. – Vol. 65– P. 94.

6. Kamyshny A. M. Study of XBP1 expression of GALT lymphocytes in terms of modulation of the intestinal microflora / A. M. Kamyshny, I. A. Topol // Abstract Book. 44th Annual Meeting German Society for Immunology. – Bonn (Germany). – 2014. – P. 264-265.

7. Kamyshny A. M. Functional status of components of the innate immune system of the intestine under stress and modulation of structure of intestinal microflora / A. M. Kamyshny, I. A. Topol// Abstract Book. International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics. – Budapest (Hungary). – 2014. – P. 59.

8. Topol I. A. Influence of probiotic administration on the immune mechanisms of pro-inflammatory signaling activation in rats GALT in conditions of chronic social stress / I. A. Topol, A. M. Kamyshny//Медицинская иммунология: Материалы конференции «Дни иммунологии в СПб 2015». – 2015. – Том 17. – С. 56.

9. Topol I. A. Impact of chronic social stress on the modification of Nlrp3 inflammasome gene expression level in the gut-associated lymphoid / I. A. Topol, A. M. Kamyshny// Abstract Book. 11Novel concepts in innate immunity. – Tübingen, Germany. – 2015. – P.89.

10. Камышный А. М. Стресс-индуцированные изменения врожденных компонентов кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани / А. М. Камышный, И. А. Топол // Материалы V Международного симпозиума «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (23 – 26 июня 2015 р., г. Санкт-Петербург, Россия). — 2015. – С. 106 - 107.

11. Топол И. А. Влияние хронического социального стресса на экспрессию мРНК глюкокортикоидных рецепторов NR3C1 и β -адренергических рецепторов ADRB2 в кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани / И. А. Топол, А. М. Камышный // Материалы V Международного симпозиума «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (23 – 26 июня 2015 р., г. Санкт-Петербург, Россия). — 2015. – С. 136 - 137.

12. Topol I. A. Modification of NLRP3 inflammasome gene expression level in the gut-associated lymphoid tissue in conditions of chronic social stress / I. A. Topol, A. M. Kamyshny// Abstract Book. TOLL2015. Targeting innate immunity. – Marbella, Spain. – 2015. – P.46.

АНОТАЦІЯ

Топол І. О. Функціональний стан кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів в умовах соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.04. — патологічна фізіологія. Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена з'ясуванню механізмів змін функціонального стану імунних структур, асоційованих зі слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. Для досягнення поставленої мети використовувались імуногістохімічні, імунофлюоресцентні, методи молекулярно-генетичного аналізу (ЗТ-ПЛР-РЧ), комп'ютерний аналіз зображень, статистичні методи. Вперше виявлено, що розвиток ХСС призводив до змін розподілу TLR2⁺/TLR4⁺ - і Nf-kB⁺- лімфоцитів, дисбалансу Th1/Th2 і T_{reg}/Th17- клітин, змінам загальної кількості LMP2⁺ і

ХВР1⁺ - лімфоцитів, зниження рівня експресії мРНК Nr3c1 та Adrβ2 - рецепторів, а також збільшення транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів і Nlrp3 - інфламасоми. В результаті роботи встановлені імунні механізми активації прозапальної сигналізації в КАЛТ в умовах хронічного соціального стресу: (1) активація вроджених компонентів імунної системи; (2) активація адаптивної ланки імунної системи; (3) порушення Т-регуляторної ланки; (4) імунопротеасомний дефект; (5) зміни чутливості клітин-мішеней до глюкокортикоїдів і катехоламінів; (6) стрес ендоплазматичного ретикулулуму.

Ключові слова: хронічний соціальний стрес, кишково-асоційована лімфоїдна тканина, лімфоцити.

АННОТАЦІЯ

Топол І. А. Функциональное состояние кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани крыс в условиях социального стресса и при модуляции состава кишечной микрофлоры. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04. – Патологическая физиология. Институт физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена выяснению механизмов изменений функционального состояния иммунных структур, ассоциированных со слизистыми оболочками желудочно-кишечного тракта в условиях хронического социального стресса и при модуляции состава кишечной микрофлоры.

Исследование носило экспериментальный характер. Тревожно-депрессивное состояние, формировавшееся у самок крыс линии Вистар при развитии хронического социального стресса путем социальной изоляции или перенаселения с ежедневной сменой состава, характеризуется основным спектром присущих стрессу реактивных изменений и является аналогом социального стресса у людей. Для достижения поставленной цели были использованы иммуногистохимические, иммунофлуоресцентные, методы молекулярно-генетического анализа (ОТ-ПЦР-РВ), компьютерный анализ изображений, статистические методы.

Впервые выявлено, что развитие ХСС приводит к снижению уровня экспресии в КАЛТ мРНК Nr3c1- и Adrβ2-рецепторов, увеличению транскрипционной активности генов провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-17α и Nlrp3-инфламасомы. Доказано, что в условиях ХСС увеличивается количество TLR2⁺ - и TLR4⁺ - лимфоцитов в КАЛТ, численность Nf-kB⁺ - клеток, изменяется баланс TLR2⁺/TLR4⁺-лимфоцитов и плотность TLR2 и TLR4 на их мембране, что свидетельствует об активации компонентов врожденной иммунной системы. Впервые установлено, что развитие ХСС увеличивает количество T-bet⁺- и Rorγt⁺- лимфоцитов, преимущественно повышает концентрацию T-bet, Rorγt и GATA3 в лимфоцитах. Эти изменения происходят на фоне уменьшения числа Т - регуляторных CD25⁺-, Foxp3⁺- и CD25⁺Foxp3⁺ лимфоцитов, роста соотношения T-bet⁺/GATA3⁺ и снижения Foxp3⁺/Rorγt⁺ клеток и свидетельствуют о доминировании в условиях ХСС Th1- и Th17-дифференцировки на фоне

супрессорной недостаточности. Установлено, что в условиях ХСС нарушается система "ответа на несвернутые белки", что на фоне иммунопротеасомного дефекта может влиять на генерацию иммунодоминантных эпитопов в КАЛТ, выживание и дифференцировку лимфоцитов.

Таким образом, нами были выявлены ключевые иммунные механизмы активации провоспалительной сигнализации в КАЛТ в условиях хронического социального стресса: (1) активация врожденных компонентов иммунной системы; (2) адаптивного звена иммунной системы; (3) нарушения Т-регуляторного звена; (4) иммунопротеасомный дефект; (5) изменения чувствительности клеток-мишеней к глюкокортикоидам и катехоламинам; (6) стресс эндоплазматической сети.

Ключевые слова: хронический социальный стресс, кишечно - ассоциированная лимфоидная ткань, лимфоциты.

SUMMARY

Topol I. A. Functional state of gut-associated lymphoid tissue rats in conditions of social stress and modulation of the intestinal microflora. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological science in specialty 14.03.04. – Pathological Physiology. – Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, 2016.

The thesis is devoted to the mechanisms of changes in the functional state of immune structures associated with the mucous membranes of the gastrointestinal tract in conditions of chronic social stress and modulation of the intestinal microflora.

We used the combination of immunohistochemical and immunofluorescence techniques, methods of molecular genetic analysis (RT-PCR-RT), computer image analysis, statistical methods. We were the first to show that the development of the CSS led to changes in the distribution of TLR2⁺/TLR4⁺ - and Nf-kB⁺ - lymphocytes, imbalance Th1/Th2 and T_{reg}/Th17- cells, changes in the total number of LMP2⁺- and XBP1⁺- lymphocytes, reducing mRNA expression of Nr3c1 and Adrβ2-receptors and an increase in transcriptional activity of proinflammatory cytokines and Nlrp3-inflammasome genes.

Thus, we have established immune mechanisms of proinflammatory signaling activation in GALT under conditions of chronic social stress: (1) activation of the innate immune system; (2) and adaptive components of immune system; (3) violation of T-regulatory level; (4) immune proteasome defect; (5) changes in the sensitivity of target cells to glucocorticoids and catecholamines; (6) endoplasmic reticulum stress.

Key words: chronic social stress, gut-associated lymphoid tissue, lymphocytes.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АІЗ	– аутоімунні захворювання
ЗЗК	– запальні захворювання кишківнику
ЗЛВ	– заповнені лімфоцитами ворсинки
ІІ	– інтерлейкін
ІМП	– імунопротеасома
КАЛТ	– кишково-асоційована лимфоїдна тканина
Кан	– канаміцин
ЛБ	– лактобактерин
ЛФ	– лімфоїдні фолікули згрупованих лімфоїдних вузликів
МКАТ	– моноклональні антитіла
ПАМП	– патоген-асоційованих молекулярні образи
ПРР	– образ - розпізнаючи рецептори
СЕР	– стрес ендоплазматичного ретикулуму
СЗ	– суб'епітеліальна зона згрупованих лімфоїдних вузликів
ХСС	– хронічний соціальний стрес
ЩП	– щільність популяції
Adr β 2	– β 2-адренергічні рецептори
LMP2	– імунна субодиниця протеасоми 2
NF- κ B	– нуклеарний фактор κ B
Nlrp3	– субодиниця інфламасоми
Nr3c1	– глюкокортикоїдний рецептор
Th	– Т хелпери
TLR	– Toll – подібні рецептори
T _{reg}	– Т-регуляторні клітини

Підписано до друку 16.05.2016. Гарнітура Times New Roman
Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,9
Наклад – 100 прим. Замовлення № 6858.

Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.