

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

Камишний Олександр Михайлович,
доктор медичних наук, професор

Київ - 2016

ЗМІСТ

	ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	7
	ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1	ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	15
1.1.	Структурно-функціональна організація КАЛТ та її вроджених компонентів	15
1.2.	Адаптивні компоненти КАЛТ	23
1.3.	Функціональний стан КАЛТ в умовах хронічного соціального стресу	33
1.4.	Висновок по огляду літератури	43
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	44
2.1.	Експериментальні тварини	44
2.2.	Серії експериментальних досліджень	44
2.3.	Експериментальні моделі	46
2.3.1.	Моделювання хронічного соціального стресу 1 типу (ХСС1)	46
2.3.2.	Моделювання хронічного соціального стресу 2 типу (ХСС2)	46
2.3.3.	Визначення рівня емоційно-поведінкової активності та депресивності у експериментальних тварин	47
2.3.4.	Модуляція складу кишкової мікрофлори	49
2.4.	Методи дослідження клітинних субпопуляцій КАЛТ	51
2.4.1.	Вивчення особливостей структурно-функціональної організації ЗЛВ	51
2.4.2.	Дослідження експресії TLR2-, TLR4-рецепторів та транскрипційного фактору NF- κ B	52
2.4.3.	Дослідження експресії транскрипційних факторів Tbet, GATA3, Ror γ t та Foxp3	54
2.4.4.	Дослідження експресії LMP2-субодиниці імунопротеасоми та транскрипційного фактору XBP1	56
2.5.	Методи молекулярно-генетичних досліджень	56

2.5.1.	Депарафінізація лімфоїдних тканин, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін	57
2.5.2.	Виділення тотальної РНК	58
2.5.3.	Зворотна транскрипція (виділення кДНК)	59
2.5.4.	Полімеразно-ланцюгова реакція у реальному часі	60
2.6.	Методи статистичного аналізу	61
РОЗДІЛ 3	Молекулярно-генетичний аналіз впливу ХСС на експресію генів Nr3c1- і Adr β 2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17 α та Nlpr3–інфламасоми у КАЛТ щурів	62
3.1.	Дослідження соціальної поведінки експериментальних тварин	62
3.2.	Дослідження експресії мРНК Nr3c1 і Adr β 2-рецепторів у КАЛТ щурів	65
3.3.	Дослідження експресії мРНК ІЛ-1 β , ІЛ-17 α та Nlpr3–інфламасоми у КАЛТ щурів	67
3.4.	Висновки до розділу 3	70
РОЗДІЛ 4	Вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію вроджених компонентів імунної системи КАЛТ щурів лінії Вістар	71
4.1.	Особливості структурно-функціональної організації заповнених лімфоцитами ворсинок при експериментальних впливах	71
4.2.	Особливості експресії TLR2 лімфоцитами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	74
4.3.	Особливості експресії TLR2 лімфоцитами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	78

4.4.	Особливості експресії TLR2 лімфоцитами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	80
4.5.	Особливості експресії TLR4 лімфоцитами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	83
4.6.	Особливості експресії TLR4 лімфоцитами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	87
4.7.	Особливості експресії TLR4 лімфоцитами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	89
4.8.	Особливості експресії транскрипційного фактора Nf-kB імунними клітинами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	91
4.9.	Особливості експресії транскрипційного фактора Nf-kB імунними клітинами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	94
4.10.	Особливості експресії транскрипційного фактора Nf-kB імунними клітинами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	96
4.11.	Висновки до розділу 4	99
РОЗДІЛ 5	Вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію транскрипційних регуляторів диференціювання Т-лімфоцитів в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів	100
5.1.	Особливості розподілу T-bet ⁺ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	100

5.2.	Особливості розподілу T-bet ⁺ -лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	103
5.3.	Особливості розподілу GATA3 ⁺ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	105
5.4.	Особливості розподілу GATA3 ⁺ -лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	107
5.5.	Особливості розподілу Rorγt ⁺ - і Rorγt ⁺ CD8 ⁺ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	109
5.6.	Особливості розподілу Rorγt ⁺ -лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	113
5.7.	Особливості розподілу CD25 ⁺ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	117
5.8.	Особливості розподілу Foxp3 ⁺ - і CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	120
5.9.	Особливості розподілу Foxp3 ⁺ -лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	124
5.10.	Висновки до розділу 5	128
РОЗДІЛ 6	Вплив хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на експресію імунної субодиниці протеасоми LMP2 та транскрипційного фактора ХВР1 в кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів	130

6.1.	Особливості розподілу LMP2 ⁺ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	130
6.2.	Особливості розподілу LMP2 ⁺ -лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	133
6.3.	Особливості розподілу LMP2 ⁺ -лімфоцитів в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	135
6.4.	Особливості експресії ХВР1 лімфоцитами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	137
6.5.	Особливості експресії ХВР1 лімфоцитами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	142
6.6.	Особливості експресії ХВР1 лімфоцитами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори	143
6.7.	Висновки до розділу 6	145
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ		147
ВИСНОВКИ		179
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		181

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АІЗ	– аутоімунні захворювання
ДК	– дендритні клітини
ГК	- глюкокортикоїди
ЗЗК	– запальні захворювання кишечника
ЗЛВ (LFV)	– заповнені лімфоцитами ворсинки (Lymphocyte - filled villi)
ІЛ	– інтерлейкін
ІМП	– імунопротеасома
КАЛТ	– кишково-асоційована лимфоїдна тканина
Кан	– канаміцин
КХ (Кхл)	- катехоламіни
ЛБ	– лактобактерин
ЛФ (LF)	– лімфоїдні фолікули ЗЛВ
МКАТ	– моноклональні антитіла
ПАМП (PAMP)	– патоген - асоційовані молекулярні образи
ПРР (PRR)	– образ - розпізнаючи рецептори
СЕР (ER stress)	– стрес ендоплазматичного ретикулуму
СЗ	– суб'епітеліальна зона ЗЛВ
ХСС	– хронічний соціальний стрес
ЩП	– щільність популяції
Adr β 2	- β 2-адренергічні рецептори
LMP2	– імунна субодиниця протеасоми 2
NF-kB	– нуклеарний фактор kB
Nlrp3	– субодиниця інфламасоми
Nr3c1	- глюкокортикоїдний рецептор
Th	– Т хелпери
TLR	– Toll – подібні рецептори
T _{reg}	– Т-регуляторні клітини
TNF α	– фактор некрозу пухлин α
UPR	– відповідь на незгорнуті білки (unfolded protein response)

ВСТУП

Актуальність теми. Хронічний соціальний стрес (ХСС) є невід'ємною частиною сучасного життя [185]. Ситуація, що склалася за 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 [22, 269], але і призводити до змін у функціонуванні вродженого та адаптивного імунітету [126, 235]. Стрес-індукована імунна дизрегуляція може бути тригером розвитку багатьох патологічних станів, включаючи цукровий діабет 1 типу (ЦД 1 типу) [234], запальні захворювання кишківнику (ЗЗК) [133], інфекції [194] і пухлини [230].

Останнім часом з'явилися нові дослідження, які демонструють, що ХСС змінює функціональну активність дендритних клітин (ДК), цитотоксичних лімфоцитів і Т-лімфоцитів пам'яті, підвищує рівень мРНК інтерферону (IFN)- γ та IFN- α [194, 195, 229], прискорює дозрівання ДК, що збільшує експресію на їх поверхні МНС I і II, ко-стимуляторних молекул CD80, CD86 і CD44, підсилює експресію TLR2 і TLR4 макрофагами селезінки [47]. Викликані ХСС зміни асоційовані зі зниженням рівня циркулюючих Foxp3⁺T-регуляторних клітин [103], посиленням імунної відповіді на панкреатичні аутоантигени і продукції цілого ряду прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-17, IFN γ , TNF α) [68]. Показана роль ХСС як тригера таких аутоімунних захворювань, як ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, аутоімунний тиреоїдит та ін. [84, 260].

В більшості існуючих моделей ХСС відзначається зниженням рівня глюкокортикоїдної (ГК) сигналізації [93, 236, 249], але молекулярні механізми цього явища повністю не з'ясовані. Причинами розвитку резистентності до ГК в умовах ХСС можуть бути зниження рівня експресії мРНК Nr3c1 [145], генетичний поліморфізм гена Nr3c1, епігенетичні зміни рівня експресії мРНК ДНК-метилтрансфераз 3a і 3b, мРНК гістон-деацетилази HDAC, цілої низки мікро-РНК [144], що може нівелювати імуносупресивні ефекти ГК, посилювати прозапальну

сигналізацію в кишечнику і ще в більшій мірі індукувати резистентність до ГК. Є також дані щодо здібності ГК в умовах стресу активувати утворення Nlrp3-інфламасоми [102], відповідальної за дозрівання ІЛ-1 β [118] і здатної при гіперактивності зміщувати Th1/Th17 баланс в сторону Th17 відповіді [201].

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 [246]. Сигналізація через Adrb2 посилює супресорну активність T_{reg}, сприяє конверсії Foxp3⁻-клітин у Foxp3⁺ індукційні T_{reg} – клітини, збільшуючи експресію негативної ко-стимуляторної молекули CTLA-4 [115], через активацію патерн-розпізнавальних рецепторів (ППР) NOD2 і TLR-2 індукує Т-клітинне диференціювання у напрямку Th17 [187], а TLR-4-залежним шляхом індукує Nf-kB [170].

Відомо, що кишково-асоційована лимфоїдна тканина (КАЛТ) є найдревнішим відділом імунної системи та містить до 80% всіх лімфоцитів і найбільшу кількість коменсальної та патогенної мікрофлори [65], розпізнавання патоген – асоційованих молекулярних патернів (ПАМП) якої через цілу низку ППР (TLRs, NLRs, RLRs) формує становлення імунної системи цього регіону та силу імунної відповіді [91]. 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 індукційних T_{reg}-клітин (iT_{reg}) [41] і резервуаром пула Th17-лімфоцитів [131].

ХСС здатен не тільки порушувати баланс між Th17/T_{reg}-клітинами [127], а й змінювати склад кишкової мікрофлори [46, 256], яка, в свою чергу, впливає на рівень диференціювання різних субпопуляцій Т-хелперів [136, 243]. Катехоламіни, які синтезуються в умовах ХСС, можуть виступати в ролі лігандів для рецепторів адреналін / норадреналінової (АІ-3) системи кворум-сенсінгу (QS) бактерій [83], що сприймається у вигляді сигналу, який свідчить про достатню для атаки щільність бактеріальної популяції та індукує їх транслокацію в КАЛТ з гіперактивністю спочатку вродженої, а потім адаптивної імунної системи [160].

Стреси різної етіології можуть призводити до порушень фолдингу білків, що сприяє розвитку стресу ендоплазматичного ретикулу (СЕР) [124] та активує систему “відповіді на незгорнуті білки” (unfolded protein response, UPR) [271], а важливим маркером активації сигнального IRE1-шляху системи UPR є транскрипційний фактор ХВР1 [111]. Зміни експресії ХВР1 є тригером розвитку запальних і АІЗ [163], а ХВР1-дефіцитні В-лімфоцити демонструють порушене диференціювання в плазмоцити і зміни продукції АТ [78]. Важливими регуляторами процесингу власних і мікробних АГ є імунні протеасоми (ІМП) [174], які ефективно генерують імунодомінантні епітопи в місцях запалення [40], а їх інгібування або дефіцит призводить до зниження експансії Th1 і Th17-клітин [149], знижує виробництво ІЛ-17, рівень мРНК транскрипційного фактору Ror γ t та сприяє розвитку T_{reg} [265]. Тим не менш, про характер експресії ІМП та ХВР1 клітинами КАЛТ в умовах ХСС нічого не відомо.

Таким чином, події, які відбуваються у КАЛТ за умов ХСС явно суперечать класичній парадигмі стресу, що в умовах посилення резистентності рецепторів до ГК [236, 249], 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, тому з'ясування цих особливостей є головним предметом нашого дослідження. Важливо, що експериментальні моделі різних стресів, які супроводжуються зниженням ГК сигналізації, є хронічними і психосоціальними за своєю природою [236, 237], як і людські стресори, які провокують розвиток аутоімунних і запальних захворювань. Тому, саме ХСС є одним з найбільш перспективних експериментальних підходів для вивчення механізмів, які лежать в основі викликаних стресом захворювань, в тому числі ЗЗК.

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 дослідження – 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 і 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 у 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 ретикулулу ХВР1 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-1 β , ІЛ-17 α 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-kB⁺- 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 Ror γ t⁺- лімфоцитів, переважно підвищує концентрацію T-bet, Ror γ t і GATA3 в лімфоцитах. Ці зміни відбуваються на тлі зменшення кількості Т-регуляторних CD25⁺-, Foxp3⁺- і CD25⁺Foxp3⁺- лімфоцитів, зростання співвідношення T-bet⁺/GATA3⁺ та зниження Foxp3⁺/Ror γ t⁺- 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.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ВРОДЖЕНИХ І АДАПТИВНИХ КОМПОНЕНТІВ КАЛТ В НОРМІ І ПРИ ПАТОЛОГІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Структурно-функціональна організація КАЛТ і її вроджених компонентів

Величезний потік антигенного матеріалу і тривалий його контакт з внутрішньою поверхнею слизових оболонок шлунково-кишкового тракту (ШКТ) сприяє формуванню в процесі еволюції скупчень лімфоїдних утворень, що мають найбільший об'єм серед усіх органів імунної системи й містять до 80% всіх лімфоцитів, тому зміна їх функціонального стану критична для формування імунологічної толерантності та розвитку аутоімунної патології. Крім того, лімфоїдна тканина, асоційована з кишківником (кишково-асоційована лімфоїдна тканина - КАЛТ) виникла набагато раніше тимуса, селезінки, лімфатичних вузлів та є найбільш древнішим відділом імунної системи слизових оболонок (ІССО). Відповідно до сучасної міжнародної номенклатури ІССО, прийнятої у 2007 році в Токіо [59] в КАЛТ виділяють індуктивну (де відбувається стимуляція антигенами “наївних” лімфоцитів) та ефекторну зону (імунна відповідь, продукція SIgA), які утворені дифузно розташованими чи організованими лімфоїдними утвореннями, частина з яких, до того ж, є видоспецифічними. До перших утворень відносять інтраепітеліальні лімфоцити (ІЕЛ) та лімфоцити у власній пластинці слизової оболонки, до других – компактно розміщені скупчення лімфоцитів у вигляді згрупованих лімфоїдних вузликів (Пейєрові бляшки, ПБ, агреговані лімфоїдні фолікули), ізольованих лімфоїдних вузликів (ІЛВ), видоспецифічних крипто-бляшок

(crypto-patch, у мишей) та заповнених лімфоцитами ворсинок (ЗЛВ, lymphocyte – filled villi, LFV, – у людини, щурів) [58, 136, 192, 193, 217].

Пейерові бляшки (ПБ) розташовуються в тонкому кишечнику, головним чином, у стінках клубової кишки у власній пластинці слизової оболонки — *lamina propria* та в її підслизовій основі — *tela submucosa* [4]. Незважаючи на значну кількість робіт [4, 5], присвячених морфології ПБ, до цього часу в їх цитології є дискусійні питання, які потребують сучасного дослідження та оцінки. Відносно виділення окремих структурно-функціональних зон ПБ в літературі є розбіжності. Так, на думку Ю.І. Афанасьєва зі співавторами, у згрупованих лімфоїдних вузликах виділяють п'ять зон: 1) верхівка; 2) гермінативний центр; 3) основа; 4) зародковий або гермінативний світлий центр; 5) Т-зона [4]. За даними В.А. Шахламова і Ю.А. Гайдара, в ПБ існують три зони: 1) лімфатичні фолікули; 2) купол; 3) між фолікулярна Т-зона. Інші дослідники виділяють в ПБ ще більше, до десяти структурних зон: 1) центр розмноження; 2) купол; 3) корона; 4) мантія; 5) В-зона; 6) Т-зона; 7) основа; 8) перивузликові, внутрішньо-вузликові лімфатичні і кровоносні капіляри; 9) капсула; 10) міжвузликова лімфоїдна тканина [4, 5].

Розвиток ПБ залежить від популяції “вроджених” LTi-клітин (Lymphoid tissue inducing cells) і продукуємих ними лімфотоксину (LT α 1/LT β 2) та транскрипційного фактору Ror γ t [264, 284]. Так, нокаутні по LT β та Ror γ t-дефіцитні миші позбавлені ПБ [264]. ПБ є лімфо-епітеліальними утвореннями за участю спеціалізованого фолікулярно-асоційованого епітелію (follicle-associated epithelium, FAE) з М-клітинами (mikrofold cells) [67]. Важливими функціональними зонами ПБ є субепітеліальна зона (СЗ, купол), де відбувається безпосередня індукція імунної відповіді, процесинг антигенів, праймування антиген-специфічних Т- і В-лімфоцитів [167, 177, 217], та лімфатичні фолікули (ЛФ) з гермінативними центрами (ГЦ, germinal centres; GC), в яких відбуваються соматичні гіпермутації, рекомбінації. Дані процеси забезпечують перемикання синтезу антитіл різних класів та дозрівання активованих В-лімфоцитів, що, в свою чергу, супроводжується появою В-клітин пам'яті і плазматичних клітин (ПК) [79, 96, 167, 198, 254].

Разом з тим, однією з найбільш загадкових морфофункціональних структур у КАЛТ є, так звані, заповнені лімфоцитами ворсинки, ЗЛВ (Lymphocyte-filled villi, LFV), які є окремим компартментом слизово-асоційованої лімфоїдної тканини у щурів і являють собою скупчення лімфоїдних клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок [192, 193]. За образним висловленням Maughofer G. et al. (1999) LFV є “дифузним кишковим тимусом” (diffuse “gutthymus”), вони є джерелом екстратимічних Т-клітин, переважно “вроджених” лімфоцитів: НКТ, НК, LTi – клітин, Rorγt-експресуючих клітин та ін. [193, 217]. Можливо, ЗЛВ – це більш примітивний шар імунної системи і спочатку були ефекторними елементами, але, згодом, розвинулися в імунорегуляторну роль, адже відомо, що КАЛТ – еволюційно найбільш древня частина імунної системи, яка сформувалася ще до появи тимусу, селезінки, лімфатичних вузлів [207]. На думку інших авторів, LFV не є джерелом екстратимічних Т-лімфоцитів, а враховуючи велику кількість розташованих в них МНСII⁺-клітин вони можуть являти собою місце інтенсивної активації наївних лімфоцитів і ранню стадію формування ізольованих лімфоїдних вузликів [125]. Тому, вивчення цього компартменту КАЛТ представляє значний науковий інтерес.

Типові LFV у щурів більш широкі, ніж суміжні ворсинки і містять у власній пластинці велику кількість лімфоцитів [193]. Найбільш ранні LFV були помічені на 7-й день життя і містили переважно IL-2R⁺ клітини (CD25). Подальше вивчення фенотипу клітин, якими упаковані такі ворсинки, показало наявність у них також CD45⁺ і НК-клітин (на 15-й день), лімфоцитів з αβTCR (на 19-й день життя). CD45⁺-клітини були спочатку розташовані у верхній частині ворсинок (до 19-денного віку), тоді як після цього терміну вони розподілялись більш рівномірно, а доля НК-клітин була вищою, ніж αβTCR⁺. Після 21-го дня життя частка клітин, що експресувала IL-2R⁺, CD45⁺ і αβTCR⁺ збільшувалась. Клітини з γδTCR⁺ визначались в мінорних кількостях лише на 70-й день життя (0,1 ± 0,1%). Макрофаги були помічені на 17-й день і розташовувались в основі LFV, В-лімфоцити (CD45RA) з 25 дня життя. Фенотип інфільтруючих LFV клітин у 70-денних щурів складався з 57% CD45⁺-клітин, 29% αβTCR⁺, 0,1% γδTCR⁺, 37% CD4⁺, 28% CD8⁺, 36% НК- клітин, 1,3% макрофагів і 33% IL-2R⁺-клітин. Причому загальна кількість клітин в LFV з віком

збільшувалась більш ніж у 2 рази (від 67 ± 8 на 7 добу до 139 ± 10 на 70 добу життя). Є певні видові особливості цитоархітекtonіки LFV. Так, у щурів LFV містять, переважно, незрілі клітини, які не експресують CD3 або TCR. У протилежність цьому, людські LFV містять зрілі $CD3^+CD4^+$ - лімфоцити і мають фенотип активованих клітин пам'яті ($CD45R0$). Крім того, лімфоцити LFV у людини не експресують c-kit або CD1 і не фарбуються АТ до генів реаранжування RAG1. Останнє вказує на те, що ці структури не є сайтами для екстратимічного дозрівання Т-клітин у людини, та, ймовірно, представляють собою ранню стадію розвитку ІЛВ.

За даними Hitotsumatsu O. (2005) LFV у щурів заповнені переважно c-kit⁺- та ІЛ-7R⁺-позитивними клітинами, тоді як лімфоцитів з $\alpha\beta$ TCR менше [125]. На користь того, що LFV є індуцибельними утвореннями, засвідчує факт їх відсутності у плодів щурів і появи тільки на 2-му тижні після народження на протибрижовій стінці тонкої кишки. Слід зазначити той факт, якщо у молодих щурів у LFV IgM^+ -В-лімфоцити присутні переважно в підставі ворсинок, то у дорослих тварин площа, займана ними, значно більша, і нерідко визначаються гермінативні центри. Ці дані ще раз свідчать на користь того, що LFV є ранньою стадією формування ІЛВ, і, як LFV, так і ІЛВ, розвиваються не в ембріональному періоді, а з'являються виключно після народження та впродовж усього постнатального життя. Тому дані утворення класифікують як "третинні" лімфоїдні органи, аналогічно лімфоїдних структур, що виникають заново у зрілому віці під впливом хронічних запальних або аутоімунних захворювань, таких як ревматоїдний артрит, синдром Шегрена, міастенія, розсіяний склероз, Н. рулогі - індукований гастрит, хронічний гепатит С та ін.. Поява цих структур, проте, не обов'язково пов'язана з патологічними станами, вони активно задіяні у фізіологічних процесах, зокрема, в імунних реакціях в КАЛТ [171, 207].

Слід зазначити, що дещо раніше (у 1996 році), були вперше відкриті попередники формування ІЛВ у мишей – так звані крипто-бляшки (crypto-patches, CP), які представляють собою невеликі кластери лімфоцитів біля тонко-кишкових крипт [134, 158]. Визначається близько 1000-1500 CP у тонкому кишечнику у мишей, а імуногістохімічні методи показали, що більшість з цих лімфоцитів CP (70-

80%) є недиференційованими та експресують c-kit, ІЛ-7R, Thy-1 і LFA-1 (leukocyte function-associated antigen-1), але не CD3, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, sIgM або B220. Окрім лімфоцитів, близько 20-30% клітин складають CP CD11c⁺/CD18⁺ – дендритні клітини, які розташовані переважно навколо лімфоцитів [242].

Кілька груп вчених активно шукали аналоги мишачих CP в КАЛТ людини [217], і, хоча LFV були знайдені [207], таких скупчень недиференційованих лімфоцитів, як в CP у мишей, не виявлено. Завдяки появі МКАТ до антигенів клітинної поверхні лімфоцитів щурів, з'явилась можливість більш ретельно охарактеризувати LFV у щурів [192, 193]. Результати показали, що в слизовій оболонці кишечника у щурів немає скупчень лімфоцитів, які були б структурно порівнянні з CP мишей, однак виявляється близько 1600 кластерів лімфоцитів в особливих ворсинках, які і були названі LFV. Як і CP у мишей, LFVs у щурів на початкових етапах розвитку містять CD3⁻, $\alpha\beta$ TCR⁻, CD25⁺ і CD44⁺-клітини, проте, з віком в них починають з'являтися популяції CD3⁺CD4⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺-лімфоцитів, які поступово накопичуються в субепітеліальній області ворсинок [192].

Разом з припущенням про те, що LFV – сайт екстратимічного диференціювання Т-клітин, подібно CP, їх розвиток може бути спричинений антигенами, що надійшли з просвіту кишківника через М-клітини. Як і CP у мишей, LFV також присутні у бестимусних “голих” (nude) щурів [242]. Про відсутність традиційних CP-подібних структур, повідомлялося в зразках кишківника не тільки у щура, а й у свині і людини. За даними Hitotsumatsu O. (2005) середнє число LFV в дванадцятипалій і порожній кишці у 7-тижневих щурів було відповідно $1,6 \pm 0,2$ і $1,1 \pm 0,1/100$ ворсинок у порівнянні з $0,2 \pm 0,1/100$ ворсинок ($P < 0,005$) у дистальній половині клубової кишці [132].

Ні CP, ні ІЛФ не виявляються в тонкому кишківнику у плодів мишей. Так, у мишей CP вперше виявляються в КАЛТ на 14-17 день після народження, а ІЛФ на 7 (BALB/c миші) або 25 (C57BL/6 миші) [124, 207, 242]. LFV також не виявляються в ембріональному періоді у новонароджених щурів, вперше з'являючись на 13 добу після народження і містять велику кількість недиференційованих c-kit⁺ і ІЛ-7R⁺-клітин. Використовуючи для детекції В-лімфоцитів у LFV МКАТ до IgM щура,

автори показали, що LFV можна розділити на ті, в яких присутні IgM⁺-лімфоцити і ті, де їх немає. Більшість IgM⁺LFV були розташовані на протибрижовому краї тонкої кишки в кількості близько 400 у 7-тижневих щурів. IgMLFV були знайдені по всій слизовій оболонці тонкого кишківника, їх налічувалось близько 1200 у 7-тижневих щурів, однак, в дистальній частині клубової кишки їх було менше, ніж у порожній. При цьому IgM⁺ - клітини розташовані переважно в підставі більш товстих LFV, в той час як αβ⁺T- клітини переважно в їх верхній частині. Вивчення проліферативної активності клітин LFV показало, що у 7-тижневих щурів близько 10% клітин є BrdU⁺-позитивними. Це більше, ніж у медулярній зоні тимуса (5-10%), але менше, ніж у його корі (близько 30%). Ці дані свідчать на користь того, що LFV можуть бути ранньою стадією формування ІЛФ. Однак, на сьогоднішній момент залишається не ясним цілий ряд запитань: чому LFV є унікальними для щурів і людини? які особливості їх субпопуляційного клітинного складу? чи експресують клітини LFV рецептори вродженої імунної системи? наскільки широко в них представлені різні субпопуляції Т-хелперів? як змінюється функціональний стан клітин LFV при різних патологічних станах? як модуляція кишкової мікрофлори може впливати на їх цитоархітектоніку та інше?

За останнє десятиріччя відбувся справжній науковий переворот в імунології і стало зрозуміло, що першою і основною ланкою захисту організму є саме вроджена імунна система (ВІС), яка здатна визначати походження антигену і необхідність розвитку імунної відповіді на нього. Досить зазначити, що 98% живих організмів на Землі зовсім не мають адаптивної імунної системи, Т- і В-лімфоцитів, антитіл, що, не заважає їм досить успішно захищатись від патогенів. Визначення походження антигену ґрунтується на розпізнаванні еволюційно високо консервативних структур, так званих патоген - асоційованих молекулярних патернів мікроорганізмів – ПАМП (pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Рецептори ВІС, що розпізнають ПАМП, мають назву патерн-розпізнаючі рецептори – ПРР (pattern-recognition receptors, PRR), які за функцією розділяють на гуморальні, ендцитозні та сигнальні. На даний момент відомо кілька сімейств сигнальних ПРР, які локалізуються на мембранах клітини або в її цитозолі: Toll-подібні рецептори (Toll-like receptors,

TLRs), лектинові рецептори С-типу (C-type lectin receptors, CLR), рецептори “сміттяри”, або фагоцитарні рецептори (scavenger receptors, SR), NOD-подібні рецептори (NOD-like receptors, NLR), RIG-подібні рецептори (RIG-I-like receptors, RLR) [70, 267]. Всі класи ППП широко експресуються клітинами КАЛТ та відіграють ключову роль у розвитку запалення та ініціації адаптивної ланки імунної відповіді [248].

Серед відомих на теперішній час 13 TLR, кожен з яких розпізнає унікальні ліганди і має специфіку виявлення патогенів [105], найбільш повно охарактеризована взаємодія рецепторного комплексу Toll-подібних рецепторів 2 і 4 з ПАМП [106, 292]. TLR2 функціонально пов'язаний із цитоплазматичною мембраною клітини і розпізнає ПАМП бактерій, грибів, вірусів та паразитів, які мають у своєму складі ліпопротеїди, ліпотейхоєві кислоти, пептидоглікан, ліпоарабіноманан, зімозан, хітин, гемаглютиніни, поріни, глікоінозитол-фосфоліпіди [47, 91, 267]. TLR4 є первинним клітинним сенсором бактеріального ЛПС і ключовим медіатором адаптивної імунної відповіді на грамнегативні бактерії [46, 150, 180]. Зв'язування лігандів з TLR2 і 4 ініціює каскад сигналів через низку адаптерних молекул, насамперед, Myd88 (myeloid differentiation factor 88), а також активує транскрипційні фактори Nf- κ B (нуклеарний фактор κ B) і IRF3 (Interferon responsive factor 3), що регулюють експресію таких про-запальних цитокінів, як ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-18, TNF α та інтерферонів [105, 150].

Дані наукової літератури засвідчують про неоднорідний рівень експресії TLR-2 і 4 різними типами клітин ШКТ, у тому числі, антиген-презентуючими клітинами (АПК) і кишковим епітелієм [91, 150], однак в останні роки стало відомо про наявність рецепторів вродженого імунітету на Т- і В-лімфоцитах. TLR впливають на активацію, проліферацію, виживання і продукцію цитокінів різних субпопуляцій лімфоцитів; беруть участь у патогенезі та розвитку аутоімунних і запальних захворювань. Так, експресія практично всіх відомих Toll-подібних рецепторів на CD4⁺ Т-клітинах була ідентифікована на рівні мРНК [52, 142, 150, 169, 239], а Myd88^{-/-}CD4⁺ Т-клітини показали знижену проліферацію у відповідь на активацію TLR та не змогли продукувати прозапальні цитокіни (ІЛ-6, ІЛ-17) і були не здатні

індукувати коліт [239, 240]. У $CD4^+$ Т-клітинах активація TLR2 може сприяти Th1-подібному фенотипу або як мінімум виробленню IFN- γ , через активацію Nf- κ B і MAPK (mitogen-activated protein kinase). Стимуляція агоністами TLR2 сприяє диференціюванню Th17 *in vitro* і призводить до їх проліферації та продукції Th17-залежних цитокінів [132, 157, 180]. *In vivo*, $CD4^+$ Т-клітини, позбавлені TLR2, були нездатні індукувати EAE, Th17-залежну модель розсіяного склерозу [36, 105, 169, 239]. Ліганди для TLR2 модулюють проліферацію і супресорні функції T_{reg} . TLR2^{-/-} миші, на відміну від TLR4^{-/-}, містять більш низькі рівні $CD4^+CD25^+T_{reg}$ клітин, ніж контрольні тварини [41, 53, 243]. Сигналізація через TLR4 також може впливати на функціональну активність T_{reg} : введення LPS призводить до посилення їх проліферації і виживання *in vitro* та *in vivo*, а супресорна активність T_{reg} збільшується у 10 разів [53, 243, 292]. Експресія цілого ряду TLR була виявлена також на цитотоксичних лімфоцитах (CTL) [142], В-лімфоцитах [52, 130] і на, так званих, вроджених лімфоцитах (ВЛ, Innate lymphoid cells, ILCs). Зокрема, TLR2/4-активовані В-лімфоцити можуть супресувати Т-клітинно-опосередковані аутоімунні реакції, як було показано на моделі EAE [52], TLR2-дефіцитні $CD8^+$ Т-клітини були не в змозі впоратись з інфекцією, викликаною лістерією [142], а ці ж клітини, переміщені в організм з лімфопенією, втратили здатність до проліферації та продукції IFN- γ [42].

Активація сигналізації через TLR призводить до активації ядерного фактору NF- κ B, який контролює експресію більш ніж 500 генів, зокрема генів імунної відповіді, апоптозу і клітинного циклу. Порушення регуляції Nf- κ B сприяють розвитку запалення, аутоімунних і онкологічних захворювань, насамперед, через підвищення продукції прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-18, TNF α [108, 120, 283]. Незважаючи на те, що найбільш інтенсивна експресія ядерного фактору κ B спостерігається в антиген-презентуючих клітинах (АПК – макрофаги, дендритні клітини, В-лімфоцити) та епітеліоцитах, він також завжди активно виражений і в Т-лімфоцитах [108], а зміна рівня експресії Nf- κ B Т-лімфоцитами має прямий вплив на процеси їх диференціювання й активації, що було показано для всіх субпопуляцій Т-хелперів: Th1, Th2, Th9, Th17, Т-фолікулярних хелперів (Tfh) та супресорних Т-

регуляторних лімфоцитів [240, 283]. Зокрема, c-Rel-дефіцитні миші демонструють дефектну Th1-опосередковану імунну відповідь та зниження продукції основного цитокіну Th1-клітин IFN- γ [161, 224, 283]. CD4⁺ T-клітини p50-дефіцитних мишей нездатні експресувати транскрипційний фактор GATA3 в ході їх Th2-диференціювання [240], а ще два протеїну родини Nf-kB: c-Rel та p65, які здатні утворювати гетеродимери з p50, стимулюють розвиток T_{reg}-клітин через формування Foxp3-специфічної енансеосоми [215, 244]. Також дефіцит c-Rel, і p65 блокує експресію Foxp3, що у таких експериментальних тварин призводить до зниження у 4 рази кількість T_{reg}-клітин [243]. C-Rel- і p65-дефіцитні T-клітини відрізняються порушенням експресії Ror γ t, що направляє диференціювання Th17-клітин, продукцію IL-17 і здатність диференціювання у Th17 [157, 239]. Таким чином, зміни розподілу TLR2, 4 і Nf-kB клітинами КАЛТ можуть значно впливати на рівень активації адаптивної імунної системи і грати роль тригера прогресії прозапальних та аутоімунних захворювань.

1.2. Адаптивні компоненти КАЛТ

У 1986 році Т. Мосманом і його співробітниками вперше була виявлена функціональна гетерогенність CD4⁺T-клітин, серед яких спочатку виділяли лише 2 функціональні групи: Т-хелпери 1-го і 2-го типу (Th1 і Th2) [34]. Хоча механізми, які регулюють диференціювання Th1-і Th2-клітин, сьогодні відомі, в останні роки описані інші субпопуляції CD4⁺ T-клітин, такі як Т-регуляторні клітини (T_{reg}), Т-фолікулярні хелпери (T_{fh}), Т-хелпери 17 типу (Th17), Th22-клітини, і нарешті, Th9-клітини [34, 79, 129, 131]. Характерно, що різні субпопуляції Th є досить пластичними і на ранніх стадіях розвитку можуть диференціюватись в інші клітини. Ключову роль у процесі розвитку і диференціювання T-клітин грають транскрипційні фактори.

Ключовими регуляторами утворення Th1 і Th2 є транскрипційні фактори T-bet і GATA3, нокаут по генам яких (*TBX21* та *GATA3*) блокує розвиток відповідних лімфоцитів. Рівень експресії T-bet і GATA3 в значній мірі обумовлює взаємну

конкуренцію Th1- і Th2 – клітин, а також з іншими субпопуляціями Т- хелперів [129, 141]. Так, GATA3 активно інгібує експресію гена *TBX21*, що визначає розвиток Th1-клітин, і *IFNG*, що кодує його ключовий продукт – IFN- γ . Взаємне інгібування Th1- і Th2- шляхів розвитку Т-хелперів опосередковується також прямою міжбілковою взаємодією T-bet і GATA3 [34, 129, 175]. GATA3, і навіть ІЛ-4, пригнічують експресію ключового диференціовального фактору регуляторних Т-клітин – Foxp3 в наївних Т-лімфоцитах. Більш м'які взаємини складаються між транскрипційними факторами Th2- і Th17 - клітин: GATA3 навіть в умовах підвищеної експресії не перешкоджає утворенню Th17- клітин, хоча і запобігає прояву їх патогенного ефекту, тоді як T-bet пригнічує їх розвиток [119, 127, 285].

Баланс Th1/Th2 грає важливу роль у розвитку аутоімунних та запальних захворювань. Так, T-bet-дефіцитні миші резистентні до експериментальних моделей АІЗ, таких як цукровий діабет, ЗЗК, енцефаломієліт, системний червоний вовчак, з іншого ж боку – у них підвищується чутливість до інфекційних захворювань, в тому числі, до мікобактеріозів, сальмонельозів, лейшманіозу, трипаносомозу, вірусних інфекцій [129]. Дисбаланс секреції цитокінів Th1 та Th2 сприяє гендерним відмінностям в розвитку ЦД 1 типу у NOD мишей, а Т - клітини від чутливих до захворювання мишей продукують більше IFN- γ (Th1-залежний цитокін), тоді як Т - лімфоцити від резистентних самців демонструють більш високу ІЛ-4 - секрецію [34, 104]. Дефіцит *TBX21* у NOD мишей повністю блокує інсуліт та діабет через дефекти у ініціюванні імунної відповіді проти острівців і функціонуванні CD4⁺ ефекторних Т- клітин [34, 175].

Виявлені асоціації однонуклеотидного поліморфізму (SNP) в гені GATA3 з розвитком бронхіальної астми [217], алергічної екземи [140], алергічного риніту [141]. При алергенному навантаженні у пацієнтів з алергією посилюється експресія GATA3 (а також T-bet) у клітинах бронхіального лаважу, а початково підвищена експресія в легеневій тканині GATA3 знижується [217]. При аналогічному впливі на мишей з експериментальною астмою експресія GATA3 посилюється і в тканині легень. При повторному дії алергену на тлі підвищеної експресії GATA3 у мишей посилюється процес ремоделювання слизової оболонки бронхів [216, 218]. Більш м'який перебіг експериментальної астми у старих мишей

пов'язують з ослабленням експресії GATA3 внаслідок вікового зниження активності кінази ERK-МАРК, яка є важливою для експресії цього гена [285]. Інгібування GATA3 розглядають як один з механізмів лікувальної дії глюкокортикоїдів при алергії; при цьому інгібуючий ефект зв'язування глюкокортикоїдів з їх ядерним рецептором передається через промотор гена GATA3 [90, 285]. Трансфекція гену GATA3 захищає мишей від індукції запального артриту, що супроводжується зниженням кількості клітин, які продукують одночасно IFN- γ і ІЛ-17 [218]. Ослаблення експресії GATA3 та зменшення співвідношень T-bet/GATA3 і IFN- γ /ІЛ-4 виявлені у хворих з системним червоним вовчаком (СЧВ), причому ступінь виразності цих змін корелює з тяжкістю перебігу процесу [128]. Трансфекція GATA3 мишам зі спонтанно мерехтливим люпус-подібним нефритом на фоні підвищення активності Th1-клітин і зниження такої Th2-клітин призводила до послаблення патології та імунологічних зрушень [218, 285]. Тобто, зменшення експресії гену GATA3, що супроводжується послабленням диференціювання Th2-клітин і посиленням диференціювання Th1-клітин, сприяє розвитку, принаймні, деяких Th1/Th17-залежних аутоімунних процесів, тоді як посилення його експресії може сприяти розвитку алергічних захворювань.

У свою чергу, у T-bet^{-/-} мишей розвивається синдром, подібний астматичному [141], а дисфункція T-bet пов'язана з посиленням інфільтрації дихального тракту нейтрофілами й еозинофілами [175]. Навпаки, посилення експресії T-bet обумовлює пригнічення алергічного запалення респіраторного тракту, що пов'язано переважно з ослабленням вироблення ІЛ-4 і посиленням продукції IFN- γ [141]. У людини зниження експресії гена *TBX21* також пов'язане з гіперреактивністю бронхів і супроводжується розвитком бронхіальної астми [141, 216]. Нокаут гену *TBX21* проявляється також стійкістю до розвитку експериментального аутоімунного енцефаломієліту [34, 175] і посиленням аутоімунної патології суглобів. При системному червоному вовчаку це підвищено співвідношенням експресії T-bet/GATA3 [129]. Є і протилежні дані, які свідчать про те, що в деяких випадках експресія T-bet, навпаки, захищає від розвитку аутоімунних процесів. Так, при нокауті гена *TBX21* підвищується ризик розвитку аутоімунного коліту [104],

атеросклерозу [141] і тяжкої міастенії [129]. Захисна дія T-bet щодо аутоімунного коліту опосередкована його здатністю обмежувати реакцію організму хазяїна на TLR-рецептори коменсалів через зниження експресії фактора некрозу пухлини α (TNF α) [292]. У людини підвищена експресія T-bet в T-клітинах виявлена при целиакії та хворобі Крона [104], а також при СЧВ [141]. T-bet⁺- клітини є ефекторами хронічної хвороби “трансплантат проти хазяїна” [129]. Отримані свідчення ролі поліморфізму (SNP) гену TBX21 у розвитку ревматоїдного артриту [141], а також у сприйнятливості до інфікування вірусом гепатиту В [34].

Важливими ефекторами розвитку запальних і АІЗ є представники ще однієї субпопуляції T-хелперів - T-хелпери 17-го типу, перші дані про які були опубліковані у 2005 році незалежно один від одного L.E. Harrington і H. Park [119, 223]. Ця подія служить своєрідною відправною точкою, після якої T-хелпери 17-го типу були виділені в окрему популяцію лімфоцитів [15, 56, 131]. Незважаючи на велику кількість молекул, які експресуються Th17-клітинами і претендують на роль їх маркерів, мабуть, найбільш надійними з них є транскрипційні фактори, пов'язані з ядерним orphan-рецептором (Retinoic acid-related orphan receptor, ROR) [14, 157, 184]. Одна з ізоформ Ror γ - Ror γ t вперше була виявлена в тимусі. Однак, в подальшому експресія Ror γ t була виявлена і в периферичних органах імунної системи - селезінці, лімфатичних вузлах, КАЛТ та ін. Останні дослідження виявили критичну роль Ror γ t в регуляції диференціювання Th17-клітин [15, 56, 89, 136]. Так, Ivanov, Littman та їх колеги (2007) повідомили про те, що Ror γ t необхідний для диференціації “наївних” CD4⁺-T-клітин в клітини Th17. Це було підтверджено аналогічними відкриттями у декількох інших лабораторіях [136, 179]. Досить велика кількість досліджень свідчить, що клітини Th17 причетні до розвитку різних АІЗ людини, таких як системний червоний вовчак, ревматоїдний артрит, atopічний дерматит, розсіяний склероз, псоріаз, астма, ЦД 1 типу [56, 89, 184, 259], тому вивчення їх розподілу у КАЛТ в умовах ХСС представляє значний інтерес. Саме Th17- клітини є одними з основних індукторів ЗЗК, чому є цілком достатня кількість доказів. По-перше, кілька незалежних досліджень показали зв'язок Th17 з кишковим запаленням у пацієнтів із ЗЗК [34, 157, 184, 249]. По-друге, поліморфізм гену IL-23R

(один з цитокінів Th17) був пов'язаний зі сприйнятливістю до ЗЗК людей. По-третє, миші зі зниженою експресією Ror γ t демонструють підвищену стійкість до індукції експериментального запалення кишечника та характеризуються низькою кількістю інфільтруючих кишково тканину Th17 клітин [262]. Нарешті, адаптивне перенесення *in vitro* або *in vivo* клітин Th17 лімфопенічним мишам призводить до розвитку у них коліту [34]. Разом, ці дані підтверджують, що Th17-клітини відіграють центральну роль у патогенезі ЗЗК. У Ror γ ^{-/-} мишей ледве вдається індукувати лише слабо виражені аутоімунні запальні процеси [34, 240, 262]. Експресія Ror γ t в переносимих Th17-клітинах є обов'язковою умовою також для індукції аутоімунного енцефаломієліту. ІЛ-17 індукує секрецію цілого ряду цитокінів, хемокінів, металопротеїназ та інших прозапальних медіаторів і сприяє залученню нейтрофілів до органу-мішені [15, 56, 89, 136]. Втрата функції Ror γ t зменшує сприйнятливість до розвитку АІЗ у експериментальних тварин, і дозволяє припустити, що, контролюючи диференціювання Th17 і експресію ІЛ-17, Ror γ t відіграє критичну роль у регуляції запальних і аутоімунних процесів. Таким чином, зміни експресії Ror γ t у КАЛТ в умовах ХСС можуть бути одними з факторів, що підтримують прогресування патологічного процесу. Так, ряд досліджень свідчить, що розвиток ХСС може стимулювати диференціювання прозапальних Т-хелперів 17 типу [157, 249, 260]. Відомо, що Ror γ /Ror γ t є критичним транскрипційним фактором і для розвитку вторинних лімфоїдних органів. У щурів, дефіцитних по Ror γ t, кількість Th17 – клітин в ПБ кишечника була знижена у 10 разів у порівнянні з щурами дикого типу. Форсована експресія Ror γ t в наївних Т – клітинах призводила до продукції ними ІЛ-17, ІЛ-17F і ІЛ-22 [157, 262].

Транскрипційні фактори T-bet, GATA3 і Ror γ t можуть експресуватись не лише класичними Т-хелперами Th1, Th2 і Th17, а й так званими вродженими лімфоїдними клітинами (ВЛК, Innate lymphoid cells, ILCs) – досить гетерогенною групою клітин спадкової імунної системи [81, 259, 264], які диференціюються із загального лімфоїдного попередника. Незважаючи на те, що ВЛК характеризуються низьким рівнем реаранжування генів Т-клітинного рецептора, відсутністю МНС-рестрикції, інтенсивною експресією паттерн-розпізнавальних рецепторів і здатністю

розпізнавати, в першу чергу, мікробні та непептидні антигени, ці клітини виражають більшість транскрипційних факторів й ефektorних молекул, які необхідні для диференціювання Т-хелперів, припускаючи, що ВЛК можуть бути еволюційним попередником клітин адаптивної імунної системи [259, 284]. Згідно останньої класифікації, в даний час виділяють 3 групи ВЛК: група 1 популяції ВЛК складається з натуральних кілерів (NK) і, можливо, інших ВЛК, які експресують фактор транскрипції T-bet, синтезують IFN- γ і пов'язані переважно з клітинним імунітетом, чим схожі на клітини Th1; група 2 ВЛК залежить від транскрипційного фактора GATA3, синтезує ІЛ-5 й ІЛ-13, стимулює антигельмінтні й алергічні імунні реакції і, таким чином, є аналогічною Th2- клітин, які експресують GATA3, і, нарешті, група 3 ВЛК складається із LTі-клітин (lymphoid tissue inducer), ILC17, NCR22 і великої кількості інших ІЛ-17А, ІЛ-17F й ІЛ-22-синтезуючих клітин, у тому числі й з ТКР гамма-дельта ($\gamma\delta$ T - лімфоцити), головною особливістю яких є експресія транскрипційного фактора Ror γ t, що обумовлює їх схожість з Th17 [81, 264, 274].

У свою чергу, блокада розвитку запальних і АІЗ залежить від популяції супресорних Т-регуляторних клітин (T_{reg}), які переважно поділяються на натуральні (тимічні, nT_{reg}) й індуковані на периферії (індуцибельні, iT_{reg}) [16, 20, 41, 188, 243]. CD25 (α -ланцюг рецептору ІЛ-2, ІЛ-2R α) тривалий час вважався одним з характерних маркерів T_{reg}, однак він експресується і на будь-яких інших Т-клітинах після їх активації. У 2003 році був описаний ген, локалізований у хромосомі X, Foxp3 (fork head box P3), який контролював розвиток і функціонування T_{reg}- клітин у мишей, потім це було продемонстровано і для T_{reg}- клітин людини [7, 297]. Продукт гену Foxp3, транскрипційний фактор Foxp3 (білок скурфін) в даний час вважається одним з найбільш специфічних внутрішньоклітинних маркерів для T_{reg}-клітин [191, 297]. Експериментальна трансдукція Foxp3 в не регуляторні Foxp3⁻CD25⁻CD4⁻ “наївні” Т-клітини людини або мишей присвоює останнім функціональні властивості та фенотип T_{reg}, а за відсутністю функціонального Foxp3 регуляторні Т-клітини не продукуються, і такі миші гинуть впродовж перших 3 тижнів життя від важких лімфопроліферативних порушень [9, 41, 211]. Зниження вмісту Foxp3⁺T-

клітин описаний при багатьох патологічних станах. Так, при розсіяному склерозі і експериментальному енцефаломієліті накопичення в головному мозку Foxp3⁺-лімфоцитів реєструється при розвитку ремісії, адаптивне перенесення T_{reg} перешкоджає індукції даного захворювання, а елімінація цих клітин сприяє його розвитку [16]. Зниження чутливості ефektorних CD4⁺CD25⁺-клітин до супресорної дії регуляторних CD4⁺CD25⁺-клітин виявлене і у мишей лінії MLR/MP, у яких спонтанно розвивається вовчаночний синдром. Можливо, цей механізм може грати роль у формуванні аутоімунної патології при СЧВ у людини [16]. Активність T_{reg}-клітин у тимусі понижена і при міастенії [34]. Зменшення вмісту T_{reg} призводить до виникнення важкого запального захворювання кишечника (IBD – inflammatory bowel disease) [295]. При хворобі Крона описано декілька типів мутацій, які зачіпають ген Foxp3. Відомо, що T_{reg} здатні зменшувати прояви коліту, індукованого перенесенням наївних T-клітин в організм RAG2^{-/-} мишей-реципієнтів завдяки секреції протизапального цитокіну ІІ-10 [280, 295].

Дефіцит T_{reg}- клітин, причиною якого є посилений їх апоптоз, спостерігається при ревматоїдному артриті, який усувається лікуванням інфліксимабом (антитілами до TNFα). У літературі є цілий ряд даних щодо захисної ролі T_{reg}- клітин при аутоімунних тиреоїдиті, гастриті, оофориті, орхіті, виразковому коліті [178, 280]. Основним місцем генерації індукцибельних T_{reg}- клітин (iT_{reg}) є кишково-асоційована лімфоїдна тканина. При цьому розвиток і функціональний стан КАЛТ залежить від складу кишкової мікрофлори [243, 256]. Так, у гнотобіотичних тварин порушується морфогенез і спостерігаються значні дефекти як вродженої, так й адаптивної ланок імунної системи, тобто кишкова мікробіота формує КАЛТ і регулює диференціювання окремих субпопуляцій T-клітин, зокрема, T_{reg}, а зміни її складу здатні не тільки викликати розвиток запальних та АІЗ, а й попереджувати їх розвиток [53, 168, 256, 295]. Цікаво, що ХСС здатен не тільки викликати зміни у функціонуванні КАЛТ, які проявляються дисбалансом прозапальних і регуляторних субпопуляцій T-хелперів, а й змінюють склад кишкової мікрофлори [50].

Важливе значення у розвитку запалення відіграє співвідношення між T_{reg} і Th17-клітинами, що регулюється за участю кількох позитивних і негативних

регуляторних мереж [179, 244], насамперед рівновагою між експресією транскрипційних факторів Ror γ і Foxp3, а також продукцією ІЛ-6 і TGF β [179]. Субпопуляції Th є досить пластичними, підтвердженням чому є виявлення подвійних позитивних Foxp3⁺Ror γ ⁺T- лімфоцитів, які можуть надалі диференціюватися як в регуляторні клітини, так і в прозапальні Th17-клітини. Тобто, експресія лімфоцитами транскрипційних факторів Foxp3 або Ror γ ще не є свідченням їхнього термінального диференціювання [210]. Зокрема, зниженням супресорної функції Foxp3 CD4⁺ T-лімфоцитів [280] у пацієнтів із ЗЗК стимулює утворення з T_{reg}/Th17 клітин, а деякі T_{reg} секретують ІЛ-17 і експресують Ror γ . Однак, на відміну від звичайних Th17, вони не секретують ІЛ-22 і TNF α . Ror γ ⁺Foxp3⁺ можуть бути присутні в *lamina propria* тонкої кишки мишей; вони виробляють ІЛ-17A, але в меншій кількості, ніж звичайні Ror γ ⁺T-клітини [179].

Основними регуляторами процесингу значної частини антигенів в імунній системі є протеасоми - мультікаталітичні протеїназні комплекси еукаріотичних клітин, в яких відбувається регульований протеоліз до 95% всіх клітинних білків [40, 51, 174]. Конститутивні 26S-протеасоми беруть участь в регуляції таких процесів, як реплікація і репарація ДНК, транскрипція, передача сигналів, клітинний цикл, апоптоз. Заміна конститутивних субодиниць протеасом на імунні відбувається за певних умов, наприклад, під впливом IFN- γ . При цьому конститутивні каталітичні субодиниці X(β 5), Y (β 1) та Z(β 2) заміщуються на імунні субодиниці LMP7 (β 5i), LMP2 (β 1i) і LMP10 (β 2i) [51, 69]. При гідролізі білків імунними протеасомами в кілька разів зростає вихід олігопептидів довжиною 8-11 амінокислотних залишків. Олігопептиди такої довжини відповідають розмірам антигенних епітопів. У комплексі з молекулами МНСІ класу вони виносяться на поверхню клітини та більш ефективно презентуються “наївним” T-лімфоцитам [114, 174, 265, 268]. ІМП є більш ефективними генераторами імунодомінантних епітопів [32, 40, 51]. Заміна конститутивних субодиниць імунними потрібна не тільки для оптимізації презентації антигенів, але також для генерації LMP2/LMP7/MECL1-залежних епітопів в місцях запалення, які не виробляються в “спокійних” тканинах [51]. Ця

різниця в генерації антигенних детермінант може служити для того, щоб краще стимулювати Т-клітини в місцях триваючої імунної відповіді і уникнути аутоімунності в нейтральних тканинах [114, 123]. Окрім добре відомих імунних функцій ІМП у регулюванні презентації антигенів молекулами МНС І класу, вони також беруть участь у продукції цитокінів, впливають на проліферацію і виживання Т-клітин, а їх дизрегуляція пов'язана з різними клінічними розладами, що включають онкологічні, аутоімунні, нейрон - дегенеративні захворювання, хвороби серця, старіння та інфекції [51, 97, 98, 176, 206]. Більш того, протеасоми, як виявилось, процесують антигени в антигенні олігопептиди для їх подання у комплексі з молекулами МНС II Т-хелперам [268]. В АПК, таких як макрофаги і дендритні клітини, імунні протеасоми беруть участь в активації “наївних” Т-лімфоцитів в цитотоксичні Т-лімфоцити [132, 214]. Однак, про особливості експресії ІМП в самих лімфоцитах відомо вкрай мало. Таким чином, імунні протеасоми є однією з первинних ланок у формуванні імунної відповіді, а вивчення їх експресії в КАЛТ в умовах ХСС представляє значний інтерес.

З іншого боку, стреси різної етіології можуть призводити до порушень фолдингу білків. Навіть в нормальних умовах до 30% білків, що синтезується на рибосомах, мають порушену третинну та четвертинну структуру (так звані “дефектні рибосомальні продукти”) [63, 124]. В умовах клітинного стресу кількість таких білків з порушеним фолдингом зростає ще більше, що призводить до розвитку стресу ендоплазматичного ретикулума (СЕР) і функціонального перевантаження системи молекулярних шаперонів та убіквітин-протеасомної системи [6, 10]. Це, в свою чергу, порушує рівень презентації ендогенних пептидів АПК і може призводити до розвитку аутофагії, апоптозу чи запалення [162, 164]. Як протидія розвитку СЕР в клітинах активується система “відповіді на незгорнуті білки” (unfolded protein response, UPR), що є необхідним для збереження її функціональної цілісності [6, 62, 101]. На сьогодні у ссавців ідентифіковано три спеціальні сенсорно-сигнальні системи UPR, що взаємодіють між собою та розпізнають незгорнуті або неправильно згорнуті білки, які накопичуються в ендоплазматичному ретикулумі: 1) PERK (подібна до PRK кіназа ER; PRK-like ER kinase, інша назва

EIF2AK3); 2) ERN1 (Endoplasmic Reticulum – Nuclei-1) - ензим, який ще називають IRE1 (залежний від інозитулу ензим-1; Inositol Requiring Enzyme-1); 3) ATF6 (активууючий транскрипційний фактор 6; від англ. activating transcription factor-6) [21, 107, 111, 271]. Цей процес має захисний, пристосувальний характер, даючи змогу клітинам нівелювати порушення, пов'язані зі стресом ЕПР. Проте, якщо процеси синтезу, фолдінгу, транспорту та деградації білків не нормалізується, в клітині розвивається апоптоз через пряму активацію протеаз (специфічної для ЕПР каспази 12), низки протеїнкіназ (Ask, JNK, p38 MAPK) і транскрипційних факторів (ATF4, ATF6, XBP1) [21, 162, 164].

Одним з трьох канонічних шляхів, що регулюють розвиток СЕР є сигнальна система IRE1-XBP1. При стресі ЕПР відбувається активація трансмембранної кінази/ендорібонуклеази IRE1, яка специфічно розпізнає 5' і 3' сайти сплайсингу мРНК XBP1 і вирізає 2-й нуклеотидний інтрон -коротку послідовність довжиною 26 пн [111, 163]. Це приводить до зрушення рамки зчитування і трансляції активного транскрипційного фактора XBP1, завдовжки в 376 амінокислот. Утворення й накопичення сплайсінгової форми мРНК гена XBP1 є характерним маркером активації сигнального шляху IRE1-XBP1 системи UPR, координуючої метаболічні та імунні реакції [189, 190, 223, 238]. Саме цей альтернативний сплайс-варіант транскрипційного фактора XBP1 є відповідальним за регуляцію експресії сотень генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, у тому числі, до деградації неправильно згорнутих протеїнів [166].

Транскрипційний фактор XBP1 (X box-binding protein 1) був спочатку виявлений як критичний чинник у регуляції експресії генів МНС II класу у людини на початку 1990-х років. Згідно більшості наявних доказів зміни експресії XBP1 можуть суттєво впливати на ризик розвитку захворювання й прогресування запальних і аутоімунних захворювань, зокрема ЦД 1 типу, ревматоїдного артриту, неспецифічного виразкового коліту, а також раку, нейрон-дегенеративних та інших патологій в експериментальних моделях гризунів [163, 194, 236, 270-272]. Так, в панкреатичних клітинах діабетичних мишей була встановлена підвищена активність XBP1/IRE1 β шляху ЕР-стресу [159]. У IRE1 β ^{-/-} дефіцитних мишей, яким індукували

DSS-коліт, виявлялась підвищена чутливість до розвитку запалення [165]. Крім того, ряд досліджень продемонстрували ключову роль ХВР1 в регуляції імунних реакцій, зокрема продукції прозапальних цитокінів імунними клітинами. ХВР1 є критичним для розвитку запальних захворювань кишківнику і АІЗ, так як зниження його експресії блокує продукцію антимікробних пептидів клітинами Панета, викликає розвиток СЕР, гіперактивацію IRE1 і в подальшому призводить до активації генів прозапальних цитокінів, розвитку хронічного запалення та клітинної смерті (в першу чергу, аутофагії) [20, 104, 189, 190]. Якщо про роль порушень продукції ХВР1 епітеліальними клітинами кишківника у розвитку запальних і АІЗ опублікована велика кількість робіт [162, 164, 189, 190, 236], то щодо характеру експресії цього білка лімфоцитами КАЛТ в умовах ХСС нічого не відомо.

1.3. Функціональний стан КАЛТ в умовах хронічного соціального стресу

Стреси різної етіології можуть обумовлювати імунопротективну (захист організму від інфекцій, пухлин, загоєння ран), імунопатологічну (розвиток аутоімунних і запальних захворювань) та імунорегуляторну дію (частіше імуносупресивні ефекти, що обмежують силу імунної відповіді) [86, 87]. Причому, одне становище в інше, “добрий” стрес в “поганий”, може переходити дуже швидко. Найчастіше, стрес-індукована імунна дизрегуляція призводить до значних негативних наслідків для здоров’я, збільшуючи ризик розвитку вірусних інфекцій, хронічних аутоімунних і запальних захворювань [229, 230]. Соціальний стрес є невід’ємною частиною сучасного життя. Навіть в умовах мирного часу близько 70% населення живе в умовах ХСС високого та середнього рівня [230], а враховуючи події останніх років в Україні, ця цифра, напевно, наближується до 100%. У багатьох клінічних і експериментальних дослідженнях було доведено, що ХСС може бути тригером розвитку багатьох патологічних станів, включаючи ЦД 1 типу та ЗЗК.

Стрес-реакція супроводжується змінами функцій імунної системи, причому, в процес втягуються структурно-функціональні елементи як вродженого, так й

адаптивного імунітету [230]. Застосування різних експериментальних моделей ХСС показало, що він може спричинити генерацію і вихід незрілих, прозапальних міелоїдних клітин, які є нечутливими до ефектів глюкокортикоїдів (ГК) [82, 92, 93]. Крім того, такі резистентні до ГК клітини продукують високі рівні ІЛ-6 та інші прозапальні цитокіни і хемокіни [231]. Як наслідок, ці стрес-індуковані зміни на клітинному рівні призводять до значних імунних (прозапальна сигналізація, посилення імунної відповіді на мікробні і вірусні антигени) та поведінкових порушень (тривожність, депресія) [46, 48, 49, 194, 195, 230]. Викликане ХСС занепокоєння і тривожність збігається з активацією білків ранньої відповіді c-Fos у відділах головного мозку, пов'язаних з оцінкою загрози і страхом, наприклад, в гіпокампі, паравентрикулярних ядрах, префронтальній корі і мигдалині [286].

У людей ХСС асоційований зі збільшенням експресії біомаркерів запалення, погіршенням перебігу соматичних і афективних розладів [230, 255, 262], зниженням рівня циркулюючих $CD4^+Foxp3^+$ T-регуляторних клітин [103]. Так, діти, які піддавались дії ХСС, демонструють посилення імунної відповіді на панкреатичні аутоантигени, такі як глутаматдекарбоксилаза 65, тирозинфосфатаза, HSP60, а також посилення продукції цілого ряду прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-17, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) [68, 75, 255]. Ряд досліджень виявив чітку кореляцію між травмуючими життєвими подіями у перші 2 роки життя і збільшенням ризику розвитку ЦД 1 типу [94, 251]. Показана роль ХСС як тригера таких АІЗ як ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, аутоімунний тиреоїдит та ін. [197, 260]. Діти, піддані дії ХСС у ранньому віці (фізичне насильство, виховання у прийомній сім'ї) демонструють більш високі рівні продукції ІЛ-6 [205, 255], CRP [75], $TNF\alpha$ [205]. Низький соціально-економічний статус у дитинстві, у свою чергу, був пов'язаний з більш високими рівнями циркулюючих ІЛ-6 і CRP у дорослих [205], а також збільшеною експресією генів, що кодують TLR4 і зменшеною експресією генів глюкокортикоїдних рецепторів [75, 205]. Є також великий обсяг досліджень, які демонструють, що природні соціальні стресори в юності і дорослому стані (конфлікт, загроза, ізоляція, втрата родичів) асоційовані з підвищеними рівнями прозапальної активності зі зростанням концентрації ІЛ-6 і $TNF\alpha$ [94, 204, 205]. Так,

Schultze-Florey і колеги (2012) виявили, що у літніх людей, які зазнали нещодавню смерть близької людини, були більш високі рівні у крові ІЛ-1 та ІЛ-6, ніж у літніх людей, що не зазнали важку втрату [250]. Широко використовувана лабораторна модель соціального стресу – TSST-тест (TrierSocialStressTest) також демонструє у піддослідних більш високий рівень LPS-стимульованої продукції TNF α , рівнів ІЛ-1 β , sTNF-RII, Nf- κ B та посилення глюкокортикоїдної резистентності [56, 86, 221, 250].

ХСС, викликаний повторним досвідом соціальних поразок у мишей, активує функціональну активність дендритних клітин (ДК), цитотоксичних лімфоцитів і Т-лімфоцитів пам'яті, стимулює клональну експансію CD8⁺T- лімфоцитів проти інфекції, викликаній вірусом грипу типу А, підвищує рівень мРНК IFN- γ та IFN- α [194, 195, 228]. Це супроводжується прискоренням дозрівання ДК, що проявляється збільшенням експресії на їх поверхні МНС I і II, ко-стимуляторних молекул CD80, CD86, CD44, підсилює експресію TLR2 і TLR4 макрофагами селезінки [47]. Відсоток спленоцитів у фазі G0-G1 і клітин у стані апоптозу істотно знижується під впливом ХСС у самців мишей, але при цьому відсоток клітин у фазах S і G2-M, а також індекс проліферації істотно збільшуються в тимусі й селезінці [19]. У дослідженні Curry et al. (2010) показано, що ХСС самостійно може індукувати запалення легеневої тканини у мишей, що супроводжується збільшенням моноцитарної та нейтрофільної інфільтрації паренхіми, продукції ІЛ-1 β і факторів хемотаксису MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) [82]. Крім прикладів стрес-індукованого ремоделювання тканини не імунних органів, цілий ряд робіт демонструє викликані ХСС зміни в лімфоїдній тканині. Так, ХСС впливає на міграцію і перерозподіл лейкоцитів, посилюючи мієлопоез в кістковому мозку, кількість нейтрофілів і моноцитів в крові та селезінці, і зменшуючи чисельність Т-лімфоцитів у цих компартментах [92, 93]. Стрес-індуковані зміни кількості нейтрофілів, лімфоцитів, Т-хелперів, цитотоксичних лімфоцитів, В-клітин в крові було показано і в інших дослідженнях, однак аналогічні дані з КАЛТ відсутні. Доведено, що ці зміни залежать від концентрації гормонів: норадреналін збільшував кількість нейтрофілів і В-

лімфоцитів, кортикостерон переважно знижував чисельність моноцитів і лімфоцитів різних субпопуляцій у крові [82]. Характерно, що міелоїдні клітини стресованих мишей демонструють збільшення на своїй поверхні TLR і ко-стимуляторних молекул, а також є резистентними до проапоптотичних ефектів ГК [36, 47, 231].

Зв'язок між стресом і ЗЗК був показаний у великій кількості даних, отриманих в дослідях на гризунах [42, 43, 49, 50, 213, 237]. Проте, ряд цих одержаних результатів повинен бути оцінений з обережністю, оскільки деякі експериментальні моделі часто використовують неприродні і короткострокові стресори та досліджують свої ефекти на штучно (хімічно) викликані ЗЗК. У той час, як стресори, що діють на людину в сучасному суспільстві, є, головним чином, хронічними і психосоціальними за своєю природою [68, 82]. В дослідженнях останніх років використовують переважно хронічні психосоціальні стресори, які, як вважають, більш клінічно релевантні [205, 236, 237, 249, 250].

На відміну від переважно адаптивних і, таким чином, позитивних ефектів гострого стресу, хронічний стрес і, особливо, хронічний соціальний стрес - тягар сучасних суспільств і визнаний фактор ризику для численних фізичних та афективних розладів, включаючи виразкову хворобу, діарею, порушення травлення і хронічний абдомінальний біль, інфекції, пухлини, ЗЗК [82, 236, 249-251]. Докази ролі ХСС у модуляції початку хвороби і тяжкості перебігу ЗЗК були отримані в чисельних дослідженнях людини і приматів. Так, ще у 1958 році Porter et al. (1958) повідомляли про розвиток шлунково-кишкових ерозій і виразок у 11 з 19 макак-резус, на яких чинили психоемоційний вплив та провокували розвиток занепокоєння і тривожності [228]. Зв'язок між ХСС та розвитком ЗЗК у людини вперше була показана Salem і Shubaig у 1967 році, які продемонстрували, що у арабських бедуїнів їх індукція спостерігалася після того, як вони були змушені залишити своє знайоме середовище в пустелі і жити в іншій обстановці [248]. Два роки потому Stout і Snyder (1969) описали велике товсто-кишкове виразкування у гібонів *Siamong*, які померли протягом кількох тижнів після смерті їх пари [261]. Розвиток запалення і карцином кишечника у різних видів мавп - тамаринів (*Saguinus oedipus*, *Saguinus mystax*), яких переместили з природного середовища у неволю, також підтверджує

зв'язок між стресом і розвитком ЗЗК. У 1991 році Duffy і співробітники ясно продемонстрували у великому проспективному дослідженні, виконаному на 124 пацієнтах, різке посилення симптоматики та погіршення перебігу ЗЗК після серйозного тривалого життєвого стресу [88]. В інших роботах було показано, що у пацієнтів з ВК, які перебувають у стадії повної клінічної ремісії, підтвердженої ендоскопічно, після соціального стресу спостерігається повернення симптомів захворювання [236, 249, 251].

Таке посилення прозапальної сигналізації в кишківнику, всупереч класичній парадигмі стресу, може бути частково пояснено зниженням чутливості глюкокортикоїдних рецепторів. У цілому ряді клінічних спостережень було показано, що ХСС найрізноманітнішої природи, включаючи соціальну ізоляцію, втрату близьких родичів, низький соціально-економічний статус, діагноз, що загрожує життю, та інше, збільшує експресію прозапальних генів в імунних клітинах (наприклад, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $TNF\alpha$) і зменшує експресію генів, залучених у вроджені противірусні відповіді (*IFNB*, *IFIs*, *MX*, *OAS*) [75, 76]. Так, Powell D. et al. (2013) вивчаючи транскриптом людей в умовах ХСС виявив різке посилення активності генів-транскрипційних регуляторів запалення в лейкоцитах (таких як *PU.1*, *NF- κ B*, *EGRI*, *MZF1*, *NRF2*) [229]. Характерно, що низький соціальний статус і проживання в несприятливих умовах у ранньому віці знижує глюкокортикоїдну та збільшує прозапальну, зокрема $Nf-\kappa B$ -залежну сигналізацію [205]. Таким чином, роль ХСС як тригера розвитку запальних процесів підтверджується на рівні білка (прозапальні цитокіни), внутрішньоклітинної сигналізації (транскрипційні фактори) та експресії геному (зміни транскриптому).

Однак, роль психосоціологічних чинників у розвитку і модуляції шлунково-кишкових захворювань, таких як ЗЗК, залишається суперечливим. У ряді робіт не вдалось виявити достовірну кореляцію між стресовими життєвими подіями і симптомами болю або діареї у хворих із ЗЗК [82, 172, 203, 205, 221]. Однак, в цілому ряді робіт була показана стрес-індукована реактивація ЗЗК у експериментальних тварин, зокрема коліту, викликаного введенням TNBS у щурів зі стресом через обмеження рухливості (restraint stress, 3 години в день впродовж 3 днів). Дана

реактивація ЗЗК супроводжувалась збільшенням кількості CD4⁺-лімфоцитів у слизовій оболонці, ослабленням бар'єрних функцій кишківника та зменшенням секреції слизу. Також спостерігалась і реактивація DSS-індукованого коліту у мишей в умовах уникнення водного стресу (water avoidance stress; 1 година в день впродовж 7 днів) [172, 203]. Крім викликаного стресом реактивації ЗЗК, показана здатність ХСС погіршувати перебіг TNBS-індукованого коліту. У 2002 році Milde і Murison також довели, що стрес, викликаний обмеженням рухливості (2 години в день протягом 4 днів поспіль), погіршує подальший DSS-індукований коліт у щурів [203]. Також, і миші, піддані впливу ХСС протягом 19 днів (стрес, викликаний повторним досвідом соціальних поразок (social defeat, SD), перенаселенням зі зміною складу колоній чи субординаційним розміщенням в колоніях (chronic subordinate colony housing, CSC) після індукції DSS-коліту (1% DSS, 7 днів) показали погіршений перебіг патології порівняно з мишами не підданими стресу, що підтверджувалось гістологічно і більш інтенсивною втратою маси, а також супроводжувалось посиленням резистентності до ГК [203, 236, 237]. Аналогічні результати щодо посилення прогресії DSS-коліту були отримані і при стресуванні новонароджених мишей відразу після народження (early life stress – відокремлення від матері на 3 години в день впродовж перших 14 днів постнатального життя). Ще більш інтригують дані щодо здатності ХСС безпосередньо індукувати розвиток ЗЗК [46, 49, 93, 203] шляхом збільшення рівнів прозапальних цитокінів і помірного гістологічного пошкодження тканин кишківнику [255]. При цьому у більшості використовуваних моделей ХСС автори відзначають зниження рівня глюкокортикоїдної сигналізації [93, 236, 237, 249], збільшення бактеріальної транслокації в кишківник [46, 47] та зміни в структурі кишкової мікробіоти [46].

Є ряд і протилежних даних, які свідчать про викликане стресом поліпшення перебігу хімічно-індукованих ЗЗК [172, 203, 236]. Наприклад, 30-хвилинний водний стрес запобігання, застосований через 6 годин після індукції коліту оцтовою кислотою знизив тяжкість перебігу захворювання. Здавалось б, класичні імуносупресивні ефекти ГК повинні знижувати тяжкість розвитку ЗЗК, однак адреналектамія в умовах ХСС призводить до поліпшення перебігу подальшого DSS-

коліту, засвідчуючи про негативну роль активації ГГН системи в цих умовах [236, 237]. Можливо, що у початковій фазі ХСС короточасне підвищення плазматичного кортизолу і ГК-індукуюча імуносупресія дійсно присутні, однак, вони лише посилюють транслокацію просвітних мікроорганізмів в тканину, запускаючи гіперактивацію імунної системи та запалення, що було показано на моделі CSC-стресу [236]. Дана здатність мікробних АГ ініціювати ЗЗК, подібне ХК, у разі їх надмірного проникнення через негерметичний епітеліальний бар'єр кишечника було показано експериментально [203]. Стресори найрізноманітнішої природи порушують продукцію муцину в кишечнику, секрецію іонів і води, кишкову проникність всіх відділів ШКТ, регенерацію епітелію та кишковий кровотік [172]. Крім того, сам ХСС, а також застосування АБ на фоні ХСС, різко змінює склад кишкової мікрофлори у людей і лабораторних тварин [46, 236, 237, 241] та впливає на рівень експресії TLR4 у слизовій оболонці кишечника [180]. Головними ефекторними гормонами під час стрес-реакції є глюкокортикоїди та катехоламіни, між вивільненням яких існують позитивні зворотні зв'язки [144], а імунокomпетентні клітини мають рецептори до них, зокрема глюкокортикоїдний рецептор – nuclear receptor subfamily 3 (Nr3c1) [77, 145, 199, 219] і β 2-адренергічні рецептори. Важливу роль у розвитку стрес-індукованих ЗЗК відіграє і зміна продукції КХ [187, 196, 246]. Так, рівень мРНК тирозин-гідроксилази, що регулює продукцію КХ, підвищений в кишечнику після 19-денного CSC-стресу, який змінює вироблення норадреналіну і може впливати на характер роботи кворум-залежних систем мікроорганізмів [237].

Відомо, що розвиток і функціональний стан КАЛТ залежить від складу кишкової мікрофлори. Так, у гнотобіотичних тварин порушується морфогенез і спостерігаються значні дефекти як вродженої, так і адаптивної ланок імунної системи, тобто кишкова мікробіота формує КАЛТ і регулює диференціювання окремих субпопуляцій Т-клітин. В роботах Ivanova I. et al. (2009) було продемонстровано, що сегментарні ниткоподібні бактерії (segmented filamentous bacteria, SFB) індукують в КАЛТ диференціювання прозапальних Th17 і Th1-клітин, а деякі представники роду *Clostridium* (cluster IV і XIVa) та полісахарид А (PSA)

Bacteroides fragilis стимулюють утворення Т-регуляторних клітин і продукцію супресорного цитокіну ІЛ-10 [136]. Тобто, зміни складу мікрофлори здатні як викликати розвиток запальних і АІЗ захворювань, так і попереджувати їх розвиток. Крім цього, ХСС активує вроджену імунну систему [47, 48, 231], стимулює продукцію прозапальних цитокінів ІЛ-6 і TNF α [39, 50] та індукує бактеріальну транслокацію у КАЛТ [47, 49]. Одним з можливих механізмів такого стимулюючого впливу ХСС може бути активація адреналін/норадреналінової (АІ-3) системи кворум-сенсінгу. Координація діяльності бактерій в мікробній популяції забезпечується за допомогою систем, які отримали назву “Quorum Sensing” (QS), що можна перевести як “відчуття кворуму” [258]. АІ-3 активність була виявлена у багатьох представників інтестинальної мікрофлори, як коменсальної (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* [17, 34, 258], так і патогенної (*E. coli* O26:H11, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*), що свідчить про імовірну участь цього медіатора у міжвидовому “спілкуванні”. Але найбільш інтригуючим відкриттям стало виявлення агоністичних взаємодій АІ-3 QS-системи з адреналіном та норадреналіном людини [34, 258]. Даний факт дозволяє припустити наявність у бактерій досить специфічних механізмів рецепції сигнальної інформації організму хазяїна. Тобто, можливо, катехоламіни, які синтезуються в умовах ХСС, виступають в ролі лігандів для рецепторів QS-системи АІ-3 бактерій, 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 імунної системи.

Серед найбільш вживаних засобів, які здатні змінювати склад кишкової мікрофлори, і таким чином, впливати на рівень імунної відповіді, є антибіотики (АБ) і пробіотики (ПБ). Аміноглікозиди (АГ) - група антибіотиків, загальною в хімічній будові структурі молекули яких є аміноцукор, сполучений глікозидним зв'язком з аміноциклічним кільцем. Усі аміноглікозиди в нормі погано всмоктуються в просвіті кишківнику і діють тільки місцево. Це дозволяє застосовувати їх *per os* без небажаних проявів системної токсичності для деконтамінації кишково-шлункового тракту перед плановими хірургічними операціями на органах черевної порожнини,

для лікування гострих кишкових інфекцій. Відомо, що прийом АБ є фактором ризику розвитку в подальшому запальних і АІЗ, зокрема ЦД 1 й 2 типу, запалення кишківника та ін. [100, 241, 287, 289]. Ефекти, викликані застосуванням АБ, включають зміни складу бактеріальних лігандів, зміни у вироблених мікрофлорою метаболітах і втратою специфічних бактеріальних сигналів [289]. АГ через зміни мікробної композиції кишківника, насамперед, зменшення кількості коменсальної мікрофлори, здатні впливати на рівень експресії TLR2 і TLR4 типу [147, 180], молекул МНСII [122, 182], зменшувати продукцію антимікробних пептидів [183, 256], впливати на рівень прозапальних Th17-клітин [136]. Але, наш вибір був обумовлений не тільки можливістю АГ змінювати склад кишкової мікрофлори і через це впливати на рівень імунної відповіді, а й нещодавно виявленою їх здатністю стимулювати утворення нових М-клітин (microfold cells), які розташовані не в зоні фолікуло-асоційованого епітелію, а на поверхні кишкових ворсинок (так званих, ворсинчастих М-клітин, villous M-cell) [266]. Поява нових М-клітин є процес індукційний, і одним з таких індукторів їх утворення є саме АГ.

В свою чергу, пробіотики, зокрема, лактобактерії (ЛБ), здатні чинити позитивний вплив на КАЛТ через цілу низку механізмів [106]: колонізаційної резистентності, посилення продукції муцина, АМП, супресорних цитокінів, регулювання щільних контактів між епітеліоцитами та ін. Так, ЛБ продукують цілий ряд метаболітів: триптофан-індол, індол-3-ацетат, триптамін [294], які є лігандами аріл-гідрокарбонних рецепторів (АНР), що експресуються на Th17-клітинах, вроджених лімфоцитах і ДК [182]. Зміни вмісту ЛБ впливають на експресію клітинами КАЛТ ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), який індукуює катаболізм триптофану в проапоптотичні метаболіти (наприклад, кінуренин), здатні пригнічувати активацію ефекторних Т-клітин. Виявлена здатність IDO-експресуючих клітин керувати диференціюванням наївних CD4⁺Т-лімфоцитів в Foxp3⁺Т_{reg}, а також їх спроможність безпосередньо активувати дозрівання Т_{reg} та попереджувати індуквану запаленням конверсію Т_{reg} - клітин в про-запальні субпопуляції Т – хелперів: Th17- та Th1-клітини [294, 295]. Ще один метаболіт кишкової мікрофлори - коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) є важливими

сигнальними молекулами в численних фізіологічних і патологічних процесах [106] та є лігандами FFAR2 рецепторів, що експресуються клітинами імунної і нервової систем, а також у ШКТ, зокрема колоноцитами й ентероцитами тонкої і товстої кишок. Підтвердження залучення FFAR2 у запальний процес одночасно підтвердилось двома групами вчених, які встановили внесок цих рецепторів у активацію імунних клітин [146]. В імунній системі FFAR2 експресуються на еозинофілах, базофілах, нейтрофілах, моноцитах, дендритних та тучних клітинах слизових оболонок, передбачаючи, важливу роль КЛЖК в імунних реакціях [106, 146].

ЛБ чинять антидіабетогенну дію в умовах стрептозотоцин-індукованого діабету [106] та у BB-DP (BioBreeding diabetes prone) щурів [44] шляхом індукції CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-клітин [243, 252], зменшують ризик розвитку хвороби Крона і виразкового коліту [45, 181, 295]. Однак, багато досліджень щодо впливу ЛБ на імунну систему лобіюється фірмами-виробниками ПБ. Це підтверджується і деякими даними, які свідчать про можливість ЛБ підвищувати ризик розвитку АІЗ, зокрема ревматоїдного артриту, експериментального автоімунного енцефаліту та інше [44, 45, 60]. Зокрема, оральний прийом ЛБ експериментальними тваринами може активувати експресію TLR2 і TLR4 типу, зменшувати рівень T_{reg}-клітин, підвищувати кількість прозапальних Th17- і Th1-клітин, а також ІЛ-12 [36, 71, 181, 253]. Тобто, неконтрольований прийом ЛБ здатен чинити імуностимулюючу дію та бути одним з тригерів розвитку АІЗ. Крім того, ЛБ здатні впливати на кількість основних регуляторів диференціювання наївних Т-клітин у прозапальні Th17-клітини – сегментарні ниткоподібні бактерії (*segmented filamentous bacteria, SFB*) [136] та *Bacteroides fragilis*, які стимулюють утворення Т-регуляторних клітин і продукцію супресорного цитокіну ІЛ-10 [293], тобто є одними з важливих регуляторів балансу Th17/T_{reg} у КАЛТ.

1.4. Висновок по огляду літератури

В огляді літератури показані сучасні уявлення щодо морфофункціонального стану вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ, участь її клітинних субпопуляцій у фізіологічних та патологічних процесах. Події, які відбуваються в КАЛТ в умовах ХСС явно суперечать класичній парадигмі стресу, згідно якої в умовах посилення резистентності рецепторів до ГК, провокується розвиток не імуносупресії, а вираженої активації імунної системи і запального процесу. Однак, характер змін вроджених і адаптивних компонентів КАЛТ при ХСС практично не відомий, тому з'ясування цих особливостей – головний предмет даного дослідження. Важливо, що експериментальні моделі різних стресів, які супроводжуються зниженням ГК сигналізації, є хронічними й психосоціальними за своєю природою, як і людські стресори, провокуючи розвиток аутоімунних і запальних захворювань. Тому, саме ХСС є одним з найбільш перспективних експериментальних підходів для вивчення механізмів, що лежать в основі викликаних стресом захворювань, у тому числі ЗЗК.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Експериментальні тварини

Дослідження проводили на 140 самках щурів лінії Вістар масою 170-220 г віком 4-5 місяців. Тварини, використані в дослідженні, були отримані з розплідника Об'єднання ветеринарної медицини ПП “Біомодельсервіс” (м. Київ). Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних “Загальних етичних принципів досліджень на тваринах” (Україна, 2001), положень “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей” (Страсбург, 1986) і згідно “Положень про використання тварин в біомедичних дослідженнях”. Щурів утримували у приміщенні при температурі повітря 22-25⁰С та природному освітленні. В останній день експерименту тварин з 18.00 позбавляли їжі і наступного дня з 10.00 виводили з експерименту методом декапітації під наркозом (етамінал натрію 40 мг/кг внутрішньочеревно). В дослідженні у експериментальних тварин були вивчені лімфоїдні структури (згруповані лімфоїдні вузлики та заповнені лімфоцитами ворсинки) клубової кишки, яку відбирали для подальших досліджень.

2.2. Серії експериментальних досліджень

Досліджувані тварини були розділені на сім експериментальних груп: контрольні щури, яким перорально внутрішньо-шлунково (в/ш) впродовж 3-х тижнів вводили по 0,5 мл 0,9%-го фізіологічного розчину NaCl (група 1); щури, яким моделювали ХСС 1 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 якому 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 днів щоденно, починаючи із 3-го тижня моделювання ХСС у дозі 15 мг/кг (групи 4 та 5, відповідно); щури з ХСС1 та ХСС2, яким здійснювали модуляцію складу кишкової мікрофлори шляхом в/ш щоденних введень *Лактобактеріну* (*Lb*, *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 та 7, відповідно).

Таблиця 2.1.

Розподіл тварин в експериментальних серіях

№ серії	Серії експериментальних досліджень	Кількість тварин
1	контрольні щури лінії Вістар	20
2	щури лінії Вістар+ХСС1	20
3	щури лінії Вістар+ХСС2	20
4	щури лінії Вістар+ХСС1+ <i>Канаміцин</i> у дозі 15 мг/кг	20
5	щури лінії Вістар+ХСС2 + <i>Канаміцин</i> у дозі 15 мг/кг	20
6	щури лінії Вістар+ХСС1+ <i>Лактобактерін</i> у дозі $4 \cdot 10^8$ КУО	20
7	щури лінії Вістар+ХСС2+ <i>Лактобактерін</i> у дозі $4 \cdot 10^8$ КУО	20
	Всього тварин	140

Для отримання статистично достовірних результатів кожен експериментальну групу формували з 20 тварин (табл. 2.1). Щурів виводили з експерименту методом

декапітації під наркозом з урахуванням всіх діючих біотичних норм при роботі з піддослідними тваринами.

2.3. Експериментальні моделі

2.3.1. Моделювання хронічного соціального стресу 1 типу (ХСС1)

Для ініціювання ХСС1 щурам застосовували трьохтижневу соціальну ізоляцію і тривалий психоемоційний вплив (ПЕВ), що вимагав перманентне проживання самок в “агресивному середовищі”, а саме через перфоровану перегородку в клітці, розміром 28x14x10см, з агресивним самцем, який щодня вступав в конфронтації з підсадженим до нього на 10 хвилин іншим самцем. Після взаємодії самців, агресора пересажували до наступної самки (в іншій клітці), відокремленою перегородкою. Самки протягом усього експерименту залишались на своїй території. Подібна тривалість досліду була обрана з урахуванням експериментальних даних, отриманих в дослідженнях [1, 2, 42, 74, 112, 213].

2.3.2. Моделювання хронічного соціального стресу 2 типу (ХСС2)

Ініціювання ХСС2 у щурів проводили шляхом утримання тварин у перенаселених клітках (20 щурів на клітку) впродовж 3 тижнів із щоденною зміною угруповання, при якому піддослідну самку кожний день поміщали до нової збалансованої та перенаселеної колонії. Використана модель практично виключає додатковий вплив на піддослідну тварину з боку дослідника, що обумовлює доцільність її використання у тварин.

З численних літературних даних відомо, що у тварин в умовах використовуваних нами моделей ХСС формувався патологічний стан, який характеризувався вираженою тривожністю, зниженням дослідної та рухової активності, комунікативності і больової чутливості, порушеннями астрального циклу, статевого/соціального розпізнавання, розвитком депресивності [1, 2, 42, 286].

Крім того, у таких тварин спостерігався весь спектр властивих стрес-реакційних змін, а саме, підвищення маси надниркових залоз, рівня адреналіну, норадреналіну, моноаміноксидази, тирозингідроксилази, вивільнення кортикостерону, гіпертензивні реакції та ін. [143]. Використані моделі ХСС також призводять до посилення продукції прозапальних цитокінів TNF α , ІЛ-6 [116, 173, 213] та розвитку тривоги і депресії, які, в свою чергу, ще збільшують прозапальну сигналізацію [3, 95].

2.3.3. Визначення рівня емоційно-поведінкової активності та депресивності у експериментальних тварин

Дизайн поведінкових експериментів включав в себе 3 тести: поведінковий тест “Відкрите поле”, тест Порсолта і тест “Перегородка”.

Поведінковий тест “Відкрите поле”. Рівень емоційно-поведінкової активності встановлювали у тесті “відкрите поле” (поле розміром 80x80 см, розкреслене на квадрати 10x10 см і освітлене яскравим світлом (100 Вт) на відстані 1 м від поверхні поля). У піддослідних щурів фіксували число пересічених квадратів, реєстрували горизонтальну (пробіжки по різних траєкторіях, аж до кружляння навколо одного місця, де основним критерієм для ідентифікації даної форми поведінки є участь у переміщенні тваринами всіх чотирьох лап) і вертикальну (двома видами стійок: задні лапи тварини залишаються на підлозі асени, а передні впираються в стінку поля – Climbing, або залишаються на вазі – Rearing) рухову активність, час і число грумінгів, обнюхування отворів, акти дефекації за 5 хвилин тесту.

Реєстрована в тесті відкритого поля рухова активність тварини - горизонтальна (амбулація) та вертикальна (вставання на задні лапи) знаходяться в певній залежності від емоційності і відображають також орієнтовно-дослідницьку активність [85, 233]. Так, згідно з уявленнями ряду авторів, фактор емоційності у відкритому полі проявляється через локомоторну активність щурів, а вертикальні стійки і грумінг можуть розглядатись як неспецифічний прояв орієнтовно-

дослідницької активності. Крім того, підвищену емоційну реактивність пов'язують із низькою руховою активністю та підвищеною дефекацією і ряд інших дослідників [85]. Щурів, які продемонстрували найвищий рівень рухової активності (30% перших) виключали з подальшого експерименту, як найбільш резистентних до стресу.

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”) для мишей (з незначними модифікаціями, які враховували великі розміри тварин, використаних в цьому дослідженні) [227]. 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 опиратись 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 (рис. 2.1).

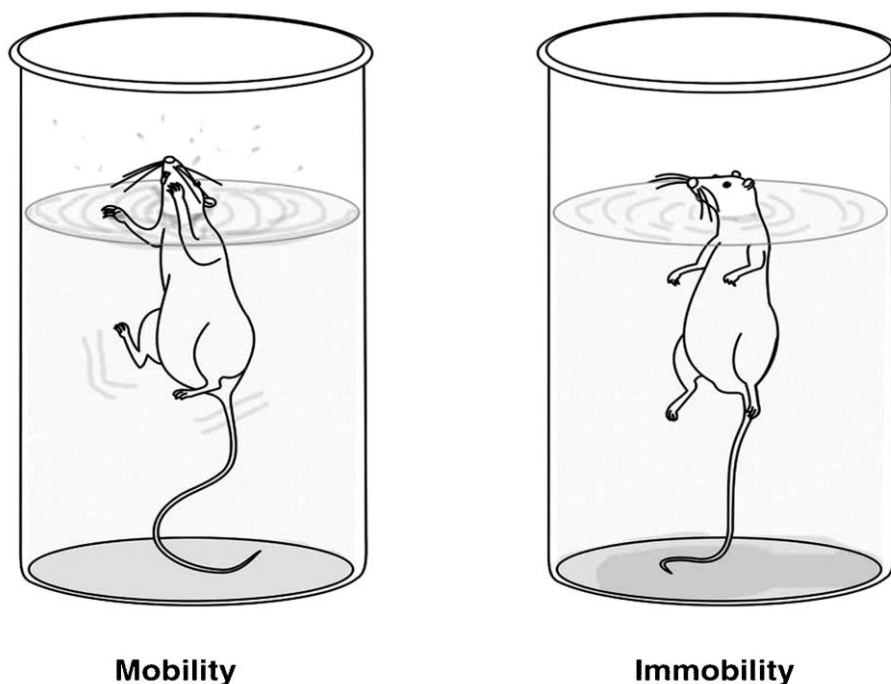


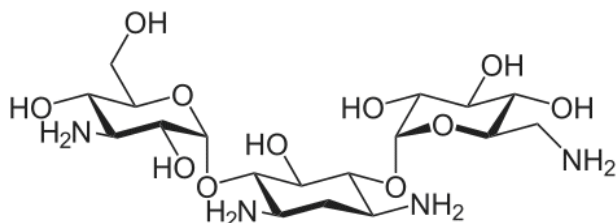
Рис. 2.1. Поведінковий тест Порсолта.

Поведінковий тест “Перегородка”. Тест “Перегородка” [18, 33] кількісно оцінює рівень комунікативної поведінки та спілкування, а також розвиток тривожності щурів з поведінкової активності біля прозорої перфорованої перегородки, що розділяє на дві половини загальну клітку в реакції на партнера в сусідньому відсіку. В даному тесті (тривалість – 5 хв.) оцінювали наступні поведінкові параметри: число підходів до перегородки, за якою знаходився агресивний самець; загальний час, проведений біля перегородки, коли експериментальна тварина торкається її лапками або носом, реагуючи на партнера в сусідньому відсіку. Також враховували вираженість орієнтовно-дослідницької та рухової активності тварин: вертикальні стійки, грумінг та фрізінг (замирання).

2.3.4. Модуляція складу кишкової мікрофлори

Мікрофлора кишківнику відіграє центральну роль у формуванні КАЛТ, а зміни її складу впливають на загальний рівень лігандів для ПРР і наступну активацію адаптивної ланки імунітету. Для модуляції складу кишкової мікрофлори у експериментальних тварин використовували аміноглікозидний (АГ) антибіотик *Канаміцина моносульфат (Кан)* та пробіотик *Лактобактерін (Лб)*.

Кан продукується *Streptomyces kanamyceticus*, абсорбція антибіотику при внутрішньому прийомі незначна, він практично не всмоктується в шлунково-кишковому тракті і має місцеву дію, а також не має кумулятивного ефекту.



Введення *Кан* (C₁₈H₃₆N₄O₁₁) (Sigma-Aldrich, USA) здійснювали внутрішлунково (в/ш) впродовж 7 діб щоденно, починаючи з 3-го тижня моделювання ХСС в дозі – 15мг/кг. Вибір доз для введення визначався на підставі аналізу літературних даних з дослідження введення зазначених речовин тваринам

[212, 247]. Використовувані дози препаратів відповідали рекомендованим терапевтичним дозам, переліченим з урахуванням співвідношення поверхні біологічного об'єкта і його маси за загально прийнятою формулою міжвидового переносу доз із застосуванням коефіцієнту перерахунку в залежності від маси тіла. Оскільки дія препаратів може змінюватися під впливом ряду фізіологічних факторів, всі дослідження проводилися в один і той же час доби. Наш вибір був обумовлений можливістю АГ як опосередковано, через зміни складу кишкової мікрофлори [266], так і напряму, як полікатіонів, стимулювати утворення нових М-клітин (microfold cells), які розташовані не в зоні фолікуло-асоційованого епітелію, а на поверхні кишкових ворсинок (так званих ворсинчастих М-клітин, villous M cell) [266] і таким чином впливати на рівень інвазії антигенів. Ми припускаємо, що поява нових М-клітин є процесом індукційним, і одним з таких індукторів їх утворення є саме АГ.

Модуляцію складу кишкової мікрофлори здійснювали також шляхом внутрішлункового (в/ш) введення пробіотику *Лактобактеріну* (*Lb*, *Лб*, суміш живих ліофільно висушених лактобактерій *L. plantarum* штам 8Р-А3 і *L. fermentum* штам 90Т-С4, виробник ВАТ “Біофарма”, Україна) впродовж 3-х тижнів у дозі $4 \cdot 10^8$ КУО. Вибір пробіотика був обумовлений не лише “класичними” ефектами лактобактерій, а, насамперед, їх здатністю впливати на кількість основних регуляторів диференціювання наївних Т-клітин у прозапальні Th17-клітини - сегментарні ниткоподібні бактерії (*segmented filamentous bacteria*, *SFB*) та *Bacteroides fragilis*, які стимулюють утворення Т-регуляторних клітин і продукцію супресорного цитокіну ІЛ-10 [136], тобто є одними з важливих регуляторів балансу Th17/T_{reg} в КАЛТ.

2.4. Методи дослідження клітинних субпопуляцій КАЛТ

2.4.1. Вивчення особливостей структурно-функціональної організації ЗЛВ

Структуру популяції лімфоцитів у так званих заповнених лімфоцитами ворсинках (Lymphocyte-filled villi, LFV, ЗЛВ), які є окремим компартментом КАЛТ щурів та уявляють собою скупчення лімфоїдних клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок, вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротаційному мікроскопі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили серійні зрізи клубової кишки товщиною 5 ± 1 мкм, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4) і фарбували гематоксиліном-еозіном. Зображення, що отримувалось на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) вводилось у комп'ютер. Ідентифікація лімфоцитів в отриманому зображенні проводилось в ручному режимі за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Основними морфометричними характеристиками клітин були їх площа (AREA), периметр (PERIM), максимальний (Major) і мінімальний (Minor) еліптичні діаметри. Додатковими морфометричними характеристиками клітин були циркулярність (Circularity) та округлість (Roundness). Циркулярність обчислювалась за формулою $Circularity = 4\pi * AREA / PERIM^2$. Її значення було рівне 1 для ідеально круглих об'єктів і наближалось до 0 для максимально витягнутих. Округлість обчислювалась як відношення площі до максимального діаметра: $Roundness = 4 * Area / \pi * (Major\ axis)^2$. Денситометричними характеристиками клітин була їх інтегрована оптична щільність (Integrated density) = $\lg(D_i/D_0)$ (умовних одиниць оптичної щільності UO_{Opt}), де D_1 і D_0 - показники оптичної щільності клітини і міжклітинної речовини ("фону" препарату), відповідно.

Враховуючи інтенсивну експресію лімфоцитами ЗЛВ рецепторів до ІЛ-2 (CD25) додатково для візуалізації ЗЛВ ставили імуногістохімічну реакцію з первинними МКАТ до CD25 щура і вторинними антитілами mouse ImmunoCruz™ Staining system (Santa Cruz Biotechnology, США), кон'югованими з пероксидазою хрому.

Підраховували питому кількість ЗЛВ (на 100 ворсинок) та кількість лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ.

2.4.2. Дослідження експресії TLR2-, TLR4-рецепторів та транскрипційного фактору Nf-κB

Структуру популяції TLR2⁺-, TLR4⁺- та Nf-κB⁺ - клітин КАЛТ вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів клубової кишки і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для цього після декапітації під наркозом вилучали клубову кишку і поміщали в фіксатор Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після 2х-годинного відмивання пікринової кислоти в проточній холодній воді гістологічний матеріал проводили в висхідних концентраціях етанолу 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 % - 1, 100 % - 2, розчинах етанол 100 % + хлороформ 2:1, етанол 100 % + хлороформ 1:1, етанол 100 % + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 при 37°C, на 1 годину вміщували в рідкий парапласт (MkCormick, США) при 56°C і потім укладали в парапластові блоки. На ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили серійні зрізи клубової кишки товщиною 5±1 мкм, які потім депарафінували в ксилолі, проводили регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100 %, 96 %, 70 %), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (pH =7,4).

TLR2⁺ і TLR4⁺- лімфоцити виявляли прямим імунофлюоресцентним методом за допомогою мишиних антитіл до мембранних паттерн-розпізнавальних рецепторів TLR2 і TLR4 щура (NucultBiotech, Нідерланди), кон'югованих з флюоресцеїн ізотіоціанатом (FITC). Для цього гістологічні зрізи інкубували з антитілами впродовж 18 годин у вологій камері при 4°C. Після інкубації препарати тричі по 10

хвилин відмивали в 0,1 М фосфатному буфері (рН=7,4) і поміщали в суміш гліцерин/фосфатний буфер у співвідношенні 1:9. Для додаткової візуалізації імунопозитивних клітин зрізи дофарбовували гематоксином Майєра.

Для ідентифікації Nf-kB⁺-клітин використовували метод непрямой імунофлюоресценції. Для цього зрізи фарбували спочатку з первинними кролячими анти-Nf-kB антитілами (SantaCruzBiotechnology, США) впродовж 18 годин у вологій камері при 4⁰С. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин (37⁰С) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. В якості вторинних антитіл використовували козячі антитіла до повної молекули IgG кролика, кон'югованих з FITC (Santa Cruz Biotechnology, США).

Оброблені гістологічні зрізи вивчали з допомогою комп'ютерної програми ImageJ (НИН, США). Зображення, що отримувались на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) та AXIOSKOP (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) або 595 нм (Texas Red) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводились у комп'ютер. В автоматичному режимі визначались області зі статистично значущою флюоресценцією, характерною для клітин, які експресували TLR2, TLR4 та Nf-kB.

Досліджувані морфометричні показники імунопозитивних клітин наведені у розділі 2.4.1. Щільність відповідних Толл-подібних рецепторів та концентрацію транскрипційного фактору Nf-kB визначали враховуючи інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічну флюоресценцію препарату (так званий “фон”). На підставі цих показників обчислювалась коректована клітинна флюоресценція (в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції $UO_{I\Phi}$): Integrated Density (інтегрована щільність) – (площа виділених клітин * середню флюоресценцію фона).

В результаті класифікаційного аналізу ідентифікували TLR2⁺- і TLR4⁺-імунопозитивні лімфобласти; середні і малі лімфоцити, а також Nf-kB⁺-лімфоцити, - макрофаги і дендритні клітини, які відрізнялись своїми морфометричними (площа,

периметр та циркулярність) і денситометричними показниками. Це дозволило вирахувати абсолютну (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу) і відносну (%) щільність розподілу імунопозитивних клітин різних класів в досліджених зонах КАЛТ.

При фарбуванні МКАТ досліджували TLR2⁺-, TLR4⁺- та Nf-kB⁺ - клітини, розташовані у ЗЛВ, субепітеліальній зоні (СЗ) згрупованих лімфоїдних вузликів та лімфоїдних фолікулах (ЛФ) згрупованих лімфоїдних вузликів.

2.4.3. Дослідження експресії транскрипційних факторів T-bet, GATA3, Rorγt та Foxp3

Структуру популяції T-bet⁺ -, GATA3⁺-, Rorγt⁺- та Foxp3⁺-лімфоцитів вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик по методиці, наведеній у розділі 2.4.2. Для ідентифікації використовували метод непрямой імунофлюоресценції. Для цього зрізи фарбували спочатку з первинними кролячими моноклональними антитілами (МКАТ) до транскрипційних факторів T-bet, GATA3, Rorγt та Foxp3 щура (SantaCruzBiotechnology, США) протягом 18 годин у вологій камері при 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин при 37°C з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика (SantaCruzBiotechnology, США), кон'югованими з FITC.

Враховуючи інтенсивну експресію T-регуляторними клітинами не лише транскрипційного фактора Foxp3, а й рецептора до ІЛ-2 – молекули CD25, а також велику кількість активованих лімфоцитів у ЗЛВ, ми в цій зоні додатково вивчили розподіл CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів з використанням методу подвійної імунофлюоресценції. У такому випадку в якості вторинних антитіл для Foxp3 застосовували АТ, кон'юговані з Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США), а для візуалізації CD25⁺ - лімфоцитів використовували мишині МКАТ до молекули CD25 щура, кон'юговані з FITC (CaltagLaboratories, США).

Відомо, що функції Ror γ t реалізуються також за межами субпопуляції Th17-клітин. Так, його активна експресія, особливо у КАЛТ, можлива також і вродженими лімфоїдними клітинами, зокрема LT α -клітинами, ILC17, NCR22 і великої кількості інших IL-17A, IL-17F, IL-22-синтезуючих клітин, у тому числі й з ТКР гамма-дельта ($\gamma\delta$ T-лімфоцити), головною особливістю яких є експресія транскрипційного фактора Ror γ t, що обумовлює їх схожість з Th17. Але, на відміну від Th17-клітин, вроджені Ror γ t-клітини, як правило, не експресують маркер Т-хелперів CD4. Для виявлення саме таких клітин ми застосували метод подвійної імунофлюоресценції, що дозволило ідентифікувати клітини, ко-експресуючі Ror γ t і CD8-антигени. Враховуючи ко-експресію Ror γ t і CD8, із великою ймовірністю можна стверджувати, що частина з них це $\gamma\delta$ T-лімфоцити. Ще однією субпопуляцією Ror γ t-експресуючих лімфоцитів з фенотипом Ror γ t⁺CD8⁺ можуть бути так звані цитотоксичні IL-17-секретуючі лімфоцити (Tc17cell), які характеризуються інтенсивною продукцією IFN- γ , більш низьким рівнем синтезу гранзимів і перфोरину на відміну від “класичних” Т-кіллерів (Tc1 і Tc2), і здатними, які Th17-клітини, виступати в ролі тригерів запальних та АІЗ. Для ідентифікації Ror γ t⁺CD8⁺- лімфоцитів використовували метод подвійної імунофлюоресценції. В якості вторинних антитіл для Ror γ t використовували АТ, кон'юговані з Texas Red (Santa Cruz Biotechnology, США), а для візуалізації CD8⁺- лімфоцитів застосовували мишині МКАТ до молекули CD8 щура, кон'юговані з FITC (Beckman Coulter, США).

При фарбуванні МКАТ досліджували T-bet⁺ -, GATA3⁺-, Ror γ t⁺- та Foxp3⁺- лімфоцити, розташовані у ЗЛВ та у СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів. Визначали абсолютну (кількість клітин на 1 мм² площі зрізу) і відносну (%) щільність розподілу імунопозитивних клітин різних класів в досліджених зонах КАЛТ, концентрацію відповідних транскрипційних факторів в лімфоцитах.

2.4.4. Дослідження експресії LMP2-субодиниці імунопротеасоми та транскрипційного фактору ХВР1

Структуру популяції LMP2⁺ - та ХВР1⁺ - лімфоцитів КАЛТ вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних і денситометричних характеристик по методиці, наведеній у розділі 2.4.2.

Для ідентифікації використовували метод непрямой імунофлюоресценції. Для цього зрізи фарбували спочатку з первинними кролячими антитілами до LMP2 (SantaCruzBiotechnology, США) чи ХВР1 (BioLegend, США) щура протягом 18 годин у вологій камері при 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин при 37°C з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика (SantaCruzBiotechnology, США), кон'югованими з FITC.

При фарбуванні МКАТ досліджували LMP2⁺- та ХВР1⁺ - лімфоцити, розташовані у заповнених лімфоцитами ворсинках, субепітеліальній зоні та згрупованих лімфоїдних вузликів.

2.5. Методи молекулярно-генетичних досліджень

Об'єктом для молекулярно-генетичних досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) у експериментальних тварин були згруповані лімфоїдні вузлики клубової кишки, які поміщали у фіксатор Буена, проводили дегідратацію у висхідних концентраціях етанолу і укладали в парафінові блоки. Молекулярно-генетичні дослідження проведені на архівному матеріалі віком 3 роки. 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 товкачика, поміщали в пробірки "Ахуген" (США) і проводили додаткову

депарафінізацію і повторну регідратацію лімфоїдних тканин, згідно протоколу дослідження, який включав наступні етапи.

2.5.1. Депарафінізація лімфоїдних тканин, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін

1. У пробірку до гомогенізованого за допомогою ступки і товкачика зразка додавали 1 мл 100 % ксилолу та інкубували впродовж 5-ти хв. Вміст перемішували на вортексі і короткочасно (0,5-1 хв.) при максимальній швидкості центрифугували для осадження тканини. Супернатант зливали шляхом перевертання пробірки.

2. До зразку додавали 1 мл 100 % ксилолу і нагрівали впродовж 3 хв. при 50°C, щоб розплавити парафін. Центрифугували зразок 2 хв. при кімнатній температурі і максимальній швидкості (14000-16000 об/хв.) для осадження тканини. Видаляли ксилол, не порушуючи осаду.

3. Додавали 1 мл 100 % етанолу до зразку, інкубували 5 хв., перемішували на вортексі. Центрифугували зразок (14000-16000 об/хв.) 2 хв. при швидкості для осадження тканини. Етанол, що містив слідові кількості ксилолу, акуратно видаляли, не порушуючи осаду.

4. У пробірку зі зразком додавали 1 мл 96 % етанолу, інкубували 5 хв., перемішували на вортексі. Центрифугували зразок впродовж 2 хв. при максимальній швидкості (14000-16000 об/хв.) для осадження тканини. Акуратно видаляли супернатант, не порушуючи осаду.

5. Додавали 1 мл 70 % етанолу до зразку, інкубували 5 хв., перемішували на вортексі. Центрифугували зразок (14000-16000 об/хв.) 1-2 хв. для осадження тканини. Обережно видаляли супернатант, не порушуючи, осаду. Висушували на повітрі осад впродовж 15-30 хв. для видалення залишку етанолу.

2.5.2. Виділення тотальної РНК

Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору “Trizol RNA Prep 100” (Ізоген Lab., LTD, Росія). Набір містить *Trizol reagent* (лізуючий реагент, до складу якого входить денатуруючий агент гуанідинтіоціонат і фенол з рН = 4.0) та *ExtraGeneE* (суспензія суміші іонообмінників).

РНК виділяли відповідно протоколу до набору для виділення з виконанням наступних етапів:

1. Вносили у пробірки “Ахуген” (США) загальним об’ємом 1,5 мл по 100 мкл (мкг) подрібненої тканини, що досліджувалася, добавляли 1 мл *Trizol reagent* та інтенсивно перемішували вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубували пробірки при 4°C протягом 5 хв.

2. Додавали у пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішували вміст пробірок. Пробірки інкубували при 4°C 5 хв.

3. Центрифугували (центрифуга “СМ-50”, Латвія) пробірки з сумішшю 5 хв. при 14000 об/хв. для розділення фаз. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносили в стерильну пробірку загальним об’ємом 1,5 мл, намагаючись не зачепити пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

4. Додавали у пробірки 300 мкл ізопропанолу, після чого загальний об’єм у пробірці дорівнював 600 мкл.

5. Інтенсивно перемішували вміст пробірок та переносили пробірки у морозильну камеру (“LG”, Корея) при мінус 20°C на 30 хв.

6. Центрифугували пробірки з сумішшю 15 хвилин при 14000 об/хв. Повністю видаляли супернатант.

7. Додавали у пробірку 1 мл холодного 75% етилового спирту, перемішували вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугували пробірки з сумішшю 5 хв. при 14000 об/хв. та обережно видаляли супернатант.

8. Просушували осад при температурі 65°C 3 хв.

9. Додавали у пробірки 50-100 мкл реагенту *ExtraGeneE* (ЕкстраГенЕ слід відбирати від загального об’єму при постійному перемішуванні).

10. Суспендували вміст на вортексі 15-20 с та залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв. Потім ще раз суспендували вміст пробірок на вортексі.

Виділену РНК зберігали при температурі мінус 70°C або негайно використовували для роботи. Однак, перед використанням слід центрифугувати вміст пробірок впродовж 1 хв. при 14000 об/хв.

Концентрацію та якість виділеної тотальної РНК визначали на спектрофотометрі LibraS32PC (Biochrom Ltd., Англія). Для подальшої процедури зворотної транскрипції відбирали зразки РНК з наступними показниками (за співвідношенням оптичної щільності A260/A280): 260 нм/280 нм=1,8-2,2.

2.5.3. Зворотна транскрипція (виділення кДНК)

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували набір ОТ-1 фірми “Синтол” (Росія). Транскрипційну суміш готували відповідно до наступного протоколу:

1. Пробірки з реакційною сумішшю, праймерами і водою розморожували при кімнатній температурі. Пробірку з MMLV-RT вміщували у лід.

2. Необхідну кількість пробірок брали з розрахунку $N + 1$, де N - кількість досліджуваних зразків. Маркували пробірки відповідно до протоколу дослідження.

3. Готували наступну реакційну суміш у пробірці: 1 мкл Random-6 праймера і 2 мкл тотальної РНК. Додавали деіонізовану H_2O , очищену від нуклеаз, об'ємом 8,5 мкл. Загальний об'єм становив 11,5 мкл.

4. Додавали інші компоненти, необхідні для проведення реакції зворотної транскрипції з розрахунку в зазначеному порядку: 2,5-х реакційна суміш – 12,5 мкл, MMLV-RT – 1 мкл. Загальний об'єм у пробірці становив 25 мкл. Суміш обережно перемішували і центрифугували короткостроковим центрифугуванням для осадження рідини з кришок і стінок пробірок.

5. Інкубували суміш при температурі 45°C впродовж 45 хвилин.

6. Зупиняли реакцію (інактивація MMLV-RT) прогріванням впродовж 5 хв. при 92°C.

7. Переносили пробірки на лід.

Отриману кДНК зберігали при мінус 20°C до використання впродовж тижня.

2.5.4. Полімеразно-ланцюгова реакція у реальному часі

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального об’єму 25 мкл додаванням деіонізованої H₂O. 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) (табл. 2.2).

Таблиця 2.2.

Ген	Праймер	T _m , °C	Product length (bp)	Exon junction
<i>Nr3c1</i>	F = CACAGCTCACCCCTACCTTG R = GGGTTCAATCACCTCCAGCA	60 60	47	
<i>Adrb2</i>	F = ACAGACTACACAGGGGAGCA R = CTCCTGCCCCAGCTGATATG	60 60	45	
<i>Il17a</i>	F = CTGGACTCTGAGCCGCAATG R = TGCCTCCCAGATCACAGAAG	61 59	58	297/ 298
<i>Il1b</i>	F = TCTTTGAAGAAGAGCCCGTCC R = GGTCGTCATCATCCCACGAG	60 60	48	354/ 355
<i>Nlrp3</i>	F = AGCTAAGAAGGACCAGCCAG R = CGTGCATGCATCATCCACTC	59 60	40	713/ 714
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/ 826

Після початкової денатурації (10 хв., 95°C) ампліфікація складалась з 45-50 циклів та проводилась за таких умов: денатурація – 95°C, 15 с., отжиг – 59-61°C, 30-60 с., елонгація – 72°C, 30 с. 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 $\Delta\Delta C_t$. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В експеримент були включені негативні контролі: 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.

2.6. Методи статистичного аналізу

Всі одержані експериментальні дані імуногістохімічного дослідження обробляли на персональному комп'ютері пакетом прикладних і статистичних програм EXCEL з пакету MSOffice 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). 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. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

РОЗДІЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ ХСС НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ NR3C1- І ADRB2-РЕЦЕПТОРІВ, ПРОЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ ІЛ-1 β , ІЛ-17 α ТА NLRP3–ІНФЛАМАСОМИ У КАЛТ ЩУРІВ

У представленій главі наведені результати досліджень особливостей впливу хронічного соціального стресу на рухово-дослідну та емоційну активність щурів лінії Вістар, а також на рівень експресії мРНК Nr3c1- і Adr β 2-рецепторів, прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17 α та Nlrp3 – інфламасоми імунними клітинами КАЛТ у щурів. Виділення тотальної РНК проводили з допомогою “Trizol RNA Prep100” (Ізоген Lab., LTD, Росія); для проведення зворотної транскрипції і отримання кДНК використовували набір ОТ-1 “Синтол” (Росія). Для визначення рівня експресії мРНК генів *Nr3c1*, *Adr β 2*, *ІЛ-1 β* , *ІЛ-17 α* та *Nlrp3* проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США). Відносний рівень експресії вищевказаних генів оцінювали за методом $\Delta\Delta$ Ct, нормалізуючи за референс-геном *GAPDH*.

3.1. Дослідження соціальної поведінки експериментальних тварин

Відомо, що важливим фактором виникнення тривожно-депресивних станів є зовнішні впливи, зокрема, емоційні чинники [43, 66, 94], серед яких істотний вплив на людину і тварин забезпечують тривалі соціальні стреси [1, 2, 42, 43, 50, 74, 116]. Раніше було показано, що у тварин в умовах тривалого ПЕВ або соціальної ізоляції формується патологічний стан, який характеризується вираженою тривожністю, зниженням дослідної та рухової активності, комунікативності і больової чутливості, порушеннями естрального циклу, статевого/соціального розпізнавання, розвитком депресивності. Крім того, у таких тварин спостерігається весь спектр властивих

стресу реактивних змін, а саме, збільшення маси наднирників, рівня адреналіну і норадреналіну, вивільнення кортикостерону та ін. [1, 2].

Результати проведеного нами тестування експериментальних тварин у тесті “Відкрите поле” показали, що розвиток ХСС призводив до достовірного зниження основних показників рухово-дослідної та емоційної активності: горизонтальної рухової активності (на 25%, $p < 0,05$ (ХСС1) і 29%, $p < 0,05$ (ХСС2)), вертикальної рухової активності (на 38%, $p < 0,05$ (ХСС1) і 47%, $p < 0,05$ (ХСС2)) і дослідної активності (на 41%, $p < 0,05$ (ХСС1) і на 54%, $p < 0,05$ (ХСС2)). Отримані результати свідчили про прояв вираженої тривожності у щурів в умовах хронічного соціального стресу. Крім того, ХСС приводив до посилення грумінгу (на 75%, $p < 0,05$ (ХСС1) і на 92%, $p < 0,05$ (ХСС2)) та актів дефекації (болюси) (у 3,6 разів, $p < 0,05$ (ХСС1) і у 2,8 разів, $p < 0,05$ (ХСС2)) у порівнянні з контрольною групою щурів (табл. 3.1). Слід зазначити, що зниження рухової активності щурів на фоні помітно вирослого грумінгу, на думку ряду дослідників, свідчить про розвиток стресу і тривожно-депресивних змін поведінки.

Хронічний соціальний стрес викликав зміну поведінки щурів і в тесті Порсолта на визначення тривожності. Так, результати тестування експериментальних тварин за тестом ПП показали, що розвиток ХСС призводив до достовірного зниження тривалості активного плавання (на 39%, $p < 0,05$ (ХСС1) і на 42%, $p < 0,05$ (ХСС2)) та збільшенню стадії іммобілізації (на 25%, $p < 0,05$ (ХСС1) і на 32%, $p < 0,05$ (ХСС2)) у порівнянні з контролем (див. табл. 3.1). Отримані результати свідчили про формування депресивного стану у тварин.

Згідно отриманих результатів тестування експериментальних тварин в тесті “Перегородка” встановлено, що розвиток ХСС призводив до розвитку підвищеної тривожності у самок щурів, про що свідчило достовірне зниження числа підходів до перегородки (на 61% $p < 0,05$ (ХСС1) і на 52%, $p < 0,05$ (ХСС2)), середнього часу перебування біля перегородки (на 37%, $p < 0,05$ (ХСС1) і на 31%, $p < 0,05$ (ХСС2)) у порівнянні з контрольною групою (див. табл. 3.1). Крім того, було зафіксовано статистично значуще збільшення фрізінгу при ХСС2 (у 5 разів, $p < 0,05$). Слід

зазначити, за даними літератури, фрізінг - це реакція прояву найбільш сильного стресу [85, 233].

Таблиця 3.1.

Результати поведінкових тестів щурів, підданих дії ХСС

Серії	контроль	ХСС 1	ХСС 2
Тест "Відкрите поле"			
ГРА	62,9±3,6	47,0±5,2 ¹	44,5±3,6 ¹
ВРА: climbing	12,5±0,8	7,8±1,1 ¹	6,6±0,8 ¹
rearing	4,8±0,7	2,4±0,3	4,5±0,7
Грумінг: короткий	1,2±0,2	2,1±0,3 ¹	2,3±0,3 ¹
тривалий	1,0±0,2	0,9±0,1	0,8±0,1
Обстеження отворів	6,8±0,4	4,0±0,3 ¹	3,1±0,3 ¹
Рівень дефекації	0,5±0,3	1,8±0,4 ¹	1,4±0,2 ¹
Тест "Вимушене плавання"			
Активне плавання, сек.	121,6±9,3	73,5±11,2 ¹	70,2±8,5 ¹
Пасивне плавання, сек.	42±16,3	56±16,1	48,3±8,6
Імобілізація, сек.	136,4±10,2	170,5±8,5 ¹	179,5±8,7 ¹
Тест "Перегородка"			
Число підходів до перегородки, к-ть	5,4±0,8	2,1±0,2 ¹	2,6±0,3 ¹
Тривалість перебування, сек	53,9±6,4	33,9±3,7 ¹	37,3±5,2 ¹
Обнюхування, к-ть	5,7±0,7	5,3±1,1	4,3±0,8
Вставання на задні лапки, к-ть	3,8±0,5	4,2±1,0	4,7±0,8
Грумінг	3,1±0,4	2,6±0,3	2±0,4
Фрізінг (завмирання)	0,1±0,1	0,1±0,1	0,5±0,1 ¹

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹).

3.2. Дослідження експресії мРНК Nr3c1 і Adrβ2-рецепторів у КАЛТ щурів

Головними ефекторними гормонами під час стрес-реакції є глюкокортикоїди (ГК) та катехоламіни (КХ), а зміни рівня експресії їх рецепторів Nr3c1 і Adrβ2 можуть призводити до резистентності к ГК та КХ і пояснювати превалювання прозапальної сигналізації в умовах ХСС всупереч класичній парадигмі стресу. Відомо, що імунокомпетентні клітини мають рецептори до ГК і КХ, і завдяки цій обставині можливий прямий вплив цих гормонів на функціональні елементи як вродженого, так і адаптивного імунітету та їх участь у регуляції імунної відповіді в умовах ХСС [82, 90, 92, 93]. Крім того, Nr3c1 може функціонувати як транскрипційний фактор та зв'язуватися зі специфічними, чутливими до ГК ділянками ДНК (glucocorticoid-responsible elements, GRE), розташованими в промоторних областях генів і активувати їх транскрипцію, так може функціонувати і в якості регулятора активності інших транскрипційних факторів [145, 199].

Можливими причинами розвитку резистентності до ГК за умов ХСС є: 1) зниження рівня експресії мРНК Nr3c1; 2) генетичний поліморфізм гену Nr3c1, який може призводити до уповільнення транслокації рецептора в ядро, зниження його афінності до гормону чи ко-активаторам, нестабільності глюкокортикоїдного рецептора (ГР), зниження його трансактиваційної активності та ін.; 3) порушення формування гетерокомплексу ГР через зміни експресії шаперонів та ко-шаперонів, що входять до його складу, таких як Hsp90, Hsp70, Hsp56, імуномодулін, імпортін IPO13, зв'язуючих протеїнів імунофілінів FKBP51 і FKBP52, а також поліморфізм їх генів; 4) епігенетичні зміни рівня експресії мРНК ДНК-метилтрансфераз 3a і 3b, мРНК гістон-деацетилази HDAC, цілої низки мікро-РНК, зокрема мікроРНК-29b та мікроРНК-340 [144, 145, 199, 219]. Ці причини можуть нівелювати імуносупресивні ефекти ГК, посилювати прозапальну сигналізацію в кишківнику і ще у більшій мірі індукувати резистентність до ГК.

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 та у 10 разів ($p < 0,01$) на фоні ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів (Рис. 3.1).

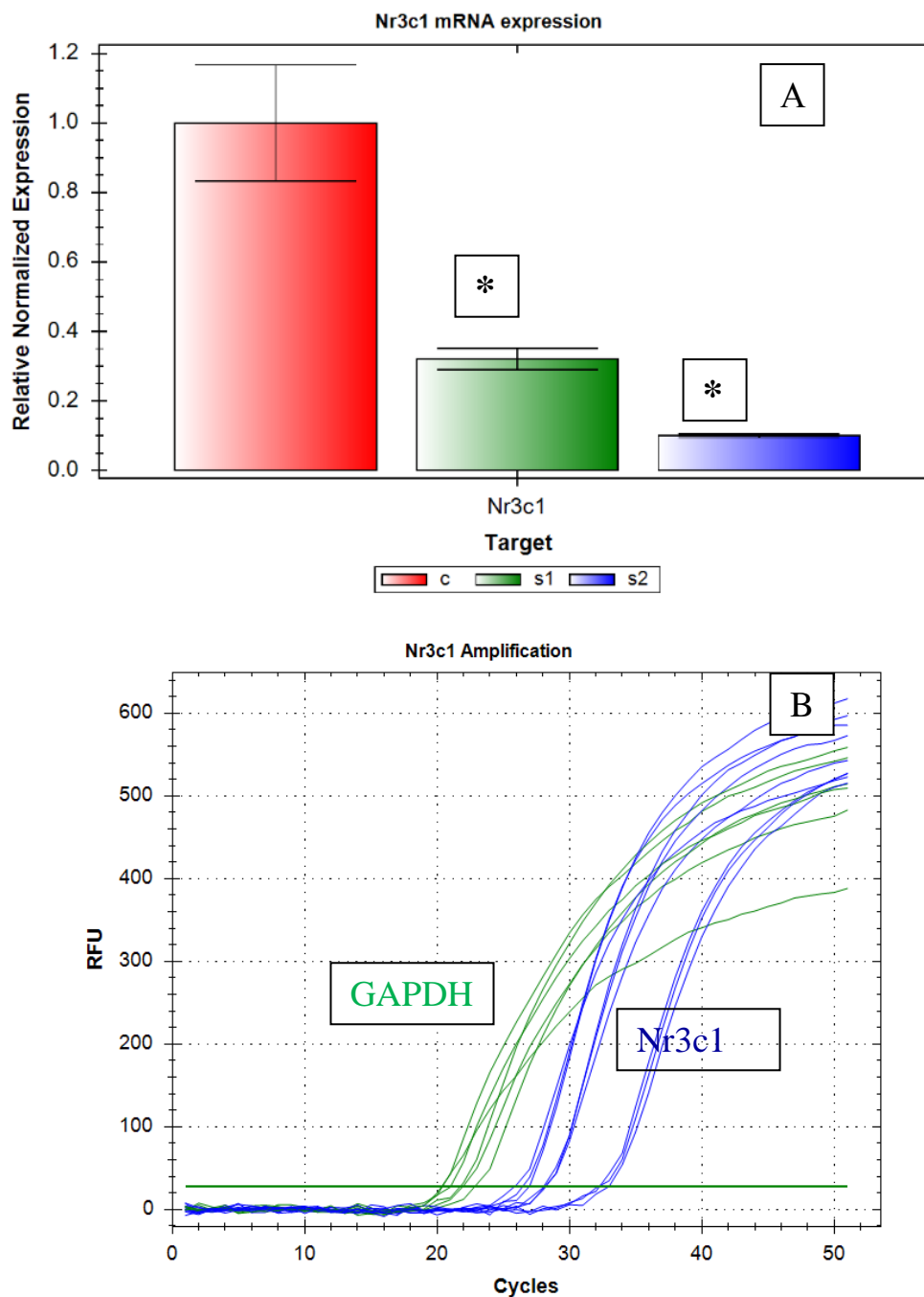


Рис. 3.1. Відносна нормалізована кількість кДНК гена глюкокортикоїдних Nr3c1-рецепторів (A) з графіками їх ампліфікації (B). Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном GAPDH.

Примітка: c – контроль; s1 – ХСС1; s2 – ХСС2.

Не менш важливими ефекторними гормонами під час стрес-реакції є КХ, а Т- і В-лімфоцити активно експресують β 2-адренергічні рецептори на різних стадіях диференціювання. Дослідження експресії *Adrb2* у КАЛТ клубової кишки показало, що розвиток ХСС призводив до зниження вмісту мРНК гену *Adrb2* – у 12,5 разів ($p < 0,02$) при ХСС1 та у 10,1 разів ($p < 0,01$) у випадку ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів (Рис. 3.2.).

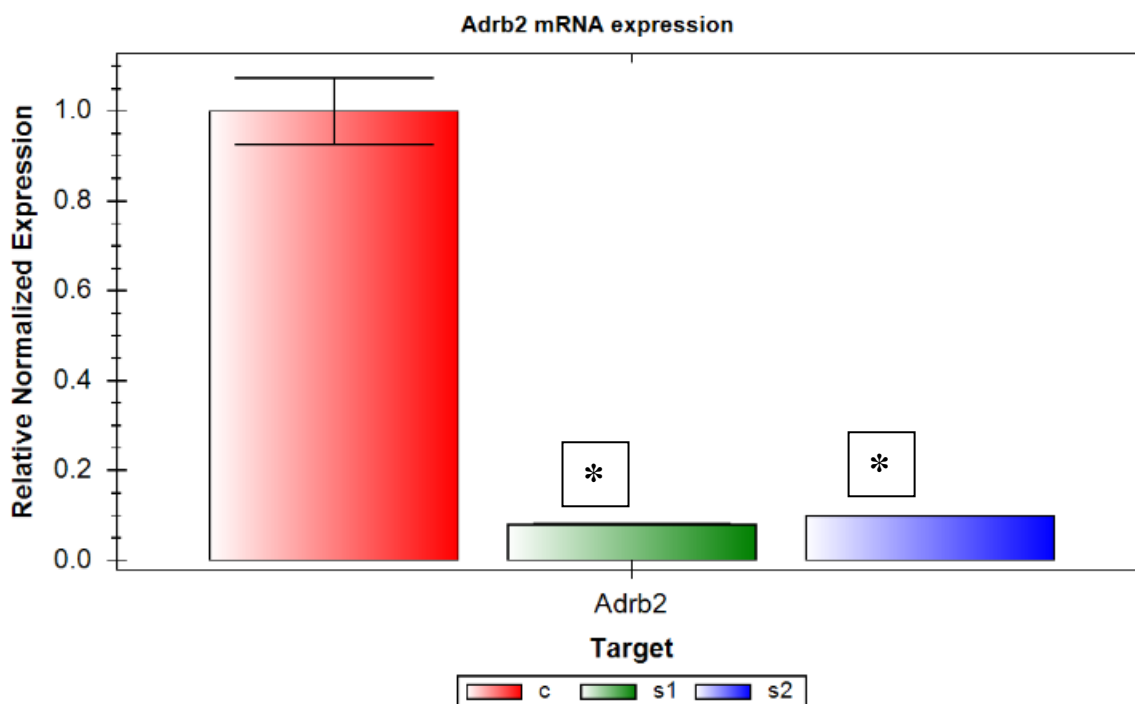


Рис. 3.2. Відносна нормалізована кількість кДНК гену β 2-адренергічних рецепторів *Adrb2* в клітинах КАЛТ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном GAPDH.

Примітка: c – контроль; s1 – ХСС1; s2 – ХСС2.

3.3. Дослідження експресії мРНК прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17 α та NLRP3-інфламасоми у КАЛТ щурів

На наступному етапі дослідження ми з'ясували рівень експресії в КАЛТ найбільш “агресивних” цитокінів ІЛ-1 β і ІЛ-17 α , а також Nlrp3- інфламасоми. Nlrp3 відповідальна за активацію каспази-1 та сприяє дозріванню найбільш активного

прозапального цитокіну ІЛ-1 β , а її підвищена експресія пов'язана з розвитком багатьох аутоімунних і запальних захворювань [64, 200, 202, 220]. Nlrp3-інфламасома через продукцію ІЛ-1 β і ІЛ-18 відіграє важливу роль не лише у розвитку запальних захворювань, а й впливає на диференціювання таких субпопуляцій CD4⁺T-клітин як Th1, Th2, Th17 і T_{reg} та в індукції адаптивного імунітету [102, 113, 200, 202].

У ході експерименту було виявлено, що ХСС супроводжується зростанням рівня мРНК Nlrp3-інфламасоми (у 17 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС2) у порівнянні з контрольною групою тварин (Рис. 3.3).

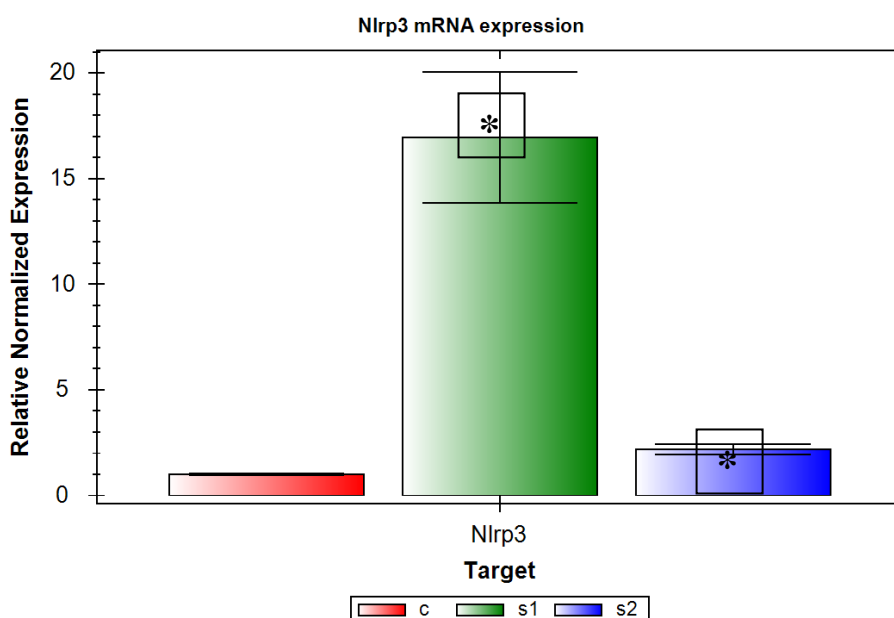


Рис. 3.3. Відносна нормалізована кількість кДНК гену Nlrp3-субодиниці інфламасоми в клітинах КАЛТ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном GAPDH.

Примітка: c – контроль; s1 – ХСС1; s2 – ХСС2.

Розвиток ХСС також супроводжується транскрипційною індукцією генів прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і ІЛ-17 α в КАЛТ щурів, більш виразною у випадку ХСС1. Зокрема, проведене дослідження встановило односпрямовану динаміку зростання транскрипційної активності генів ІЛ-1 β (у 6 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у

2,8 разів ($p < 0,05$) при ХСС2); ІЛ-17а (у 2,3 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 50% ($p < 0,05$) при ХСС2) у порівнянні з контрольною групою тварин (Рис. 3.4-3.5).

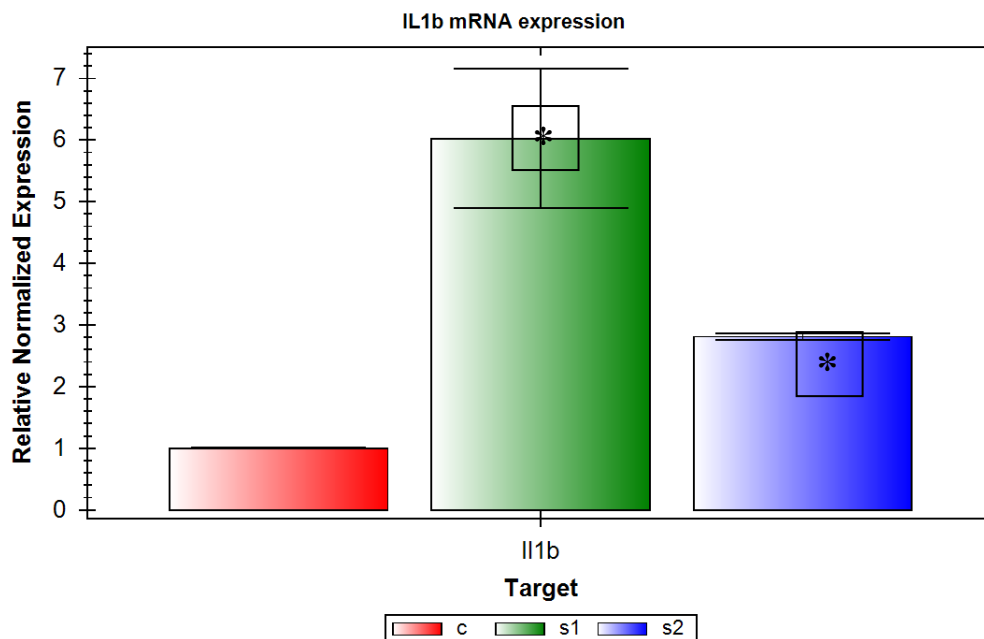


Рис. 3.4. Відносна нормалізована кількість кДНК гену ІЛ-1 β в клітинах КАЛТ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном GAPDH.

Примітка: с – контроль; s1 – ХСС1; s2 – ХСС2.

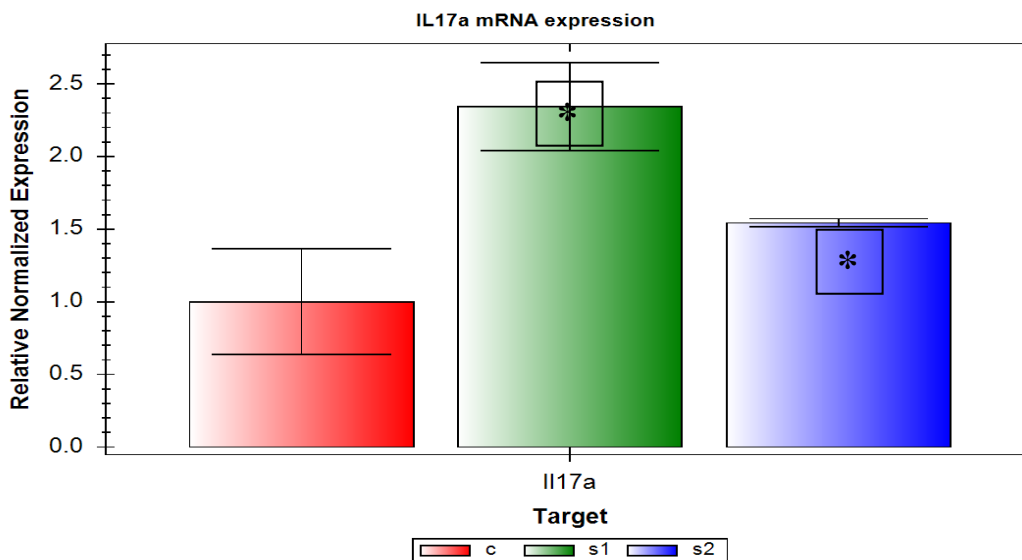


Рис. 3.5. Відносна нормалізована кількість кДНК гену ІЛ-17 α в клітинах КАЛТ. Нормалізація за методом $\Delta\Delta C_t$ з референс-геном GAPDH.

Примітка: с – контроль; s1 – ХСС1; s2 – ХСС2.

3.4. Висновки до Розділу 3.

Таким чином, результати даного дослідження свідчать, що розвиток ХСС призводить до зниження дослідної та рухової активності щурів, розвитку тривожності і депресивності. ХСС супроводжуються зниженням рівня експресії мРНК Nr3c1- і Adr β 2-рецепторів в імунних клітинах, що, відповідно, нівелює імуносупресивні ефекти ГК. Це підтверджується односпрямованою динамікою зростання транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17 α та Nlrp3–інфламасоми у КАЛТ щурів, більш виразною у випадку ХСС1.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані у наступних роботах [23, 24, 30, 275].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ ТА МОДУЛЯЦІЇ СКЛАДУ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ НА ЕКСПРЕСІЮ ВРОДЖЕНИХ КОМПОНЕНТІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ КАЛТ ЩУРІВ ЛІНІЇ ВІСТАР

У главі наведені результати досліджень особливостей впливу хронічного соціального стресу та модуляції складу кишкової мікрофлори на особливості структурно-функціональної організації LFV та експресію TLR2/4 типу і транскрипційного фактору Nf-kB у КАЛТ, для чого використовувались імуногістохімічні та імунофлюоресцентні методи. Вивчена особливість розподілу TLR2⁺-, TLR4⁺- і Nf-kB⁺ - клітин в різних морфофункціональних зонах КАЛТ, за допомогою програм AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (NIH, США) проведено аналіз морфометричних і денситометричних характеристик імунопозитивних клітин, при цьому досліджуваними параметрами були: щільність відповідних лімфоцитів на 1 мм² тканини та їх частка в структурі лімфоїдної популяції, щільність відповідних TLR на клітинній мембрані лімфоцитів, концентрація Nf-kB в цитоплазмі і ядрі.

4.1. Особливості структурно-функціональної організації заповнених лімфоцитами ворсинок при експериментальних впливах

Вивчення структурно-функціональної організації заповнених лімфоцитами ворсинок показало, що ЗЛВ у щурів більш широкі, ніж сусідні ворсинки і містять у власній пластинці велике число лімфоцитів (рис. 4.1). Кількість ЗЛВ у контрольних тварин (на 100 ворсинок) становила $1,2 \pm 0,1$. Розвиток ХСС супроводжувався достовірним збільшенням даного показника у 2,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Kan* і

Лб експериментальним тваринам не призводило до статистично значимої зміни кількості ЗЛВ (на 100 ворсинок) (табл. 4.1).

Враховуючи літературні дані про велику кількість ІЛ-2R⁺ клітин (CD25) у LFV, ми, крім класичного забарвлення гематоксином для додаткової візуалізації цих структур, застосовували імуногістохімічну реакцію з первинними МКАТ до CD25 щура і вторинними антитілами rabbit ImmunoCruz™. Загальна кількість лімфоцитів в LFV у контрольній групі щурів складала 72 ± 6. Розвиток ХСС призводив до достовірного збільшення числа лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки LFV (на 51,4% (p <0,05) при ХСС1 і на 58,3% (p <0,05) за умов ХСС2) у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* експериментальним щурам не призводило до достовірної зміни кількості лімфоцитів у ЗЛВ, тоді як введення *Лб* супроводжувалося зростанням їх числа (на 27,5% (p <0,05) при ХСС1 і на 25,4% (p <0,05) у випадку ХСС2) у порівнянні із стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Кількість LFV (на 100 ворсинок) та кількість лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки LFV (M ± m)

Серії	Кількість LFV/ 100 ворсинок	Кількість лімфоцитів в LFV
контроль	1,2±0,1	72±6
стрес 1	2,6±0,2 ¹	109±9 ¹
стрес 2	2,4±0,2 ¹	114±9 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	2,5±0,3 ¹	111±13 ¹
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	2,4±0,3 ¹	124±12 ¹
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	2,3±0,2 ¹	139±10 ^{1,2}
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	2,1±0,3	143±11 ^{1,3}

Примітка: достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1(²), до стресу 2(³).

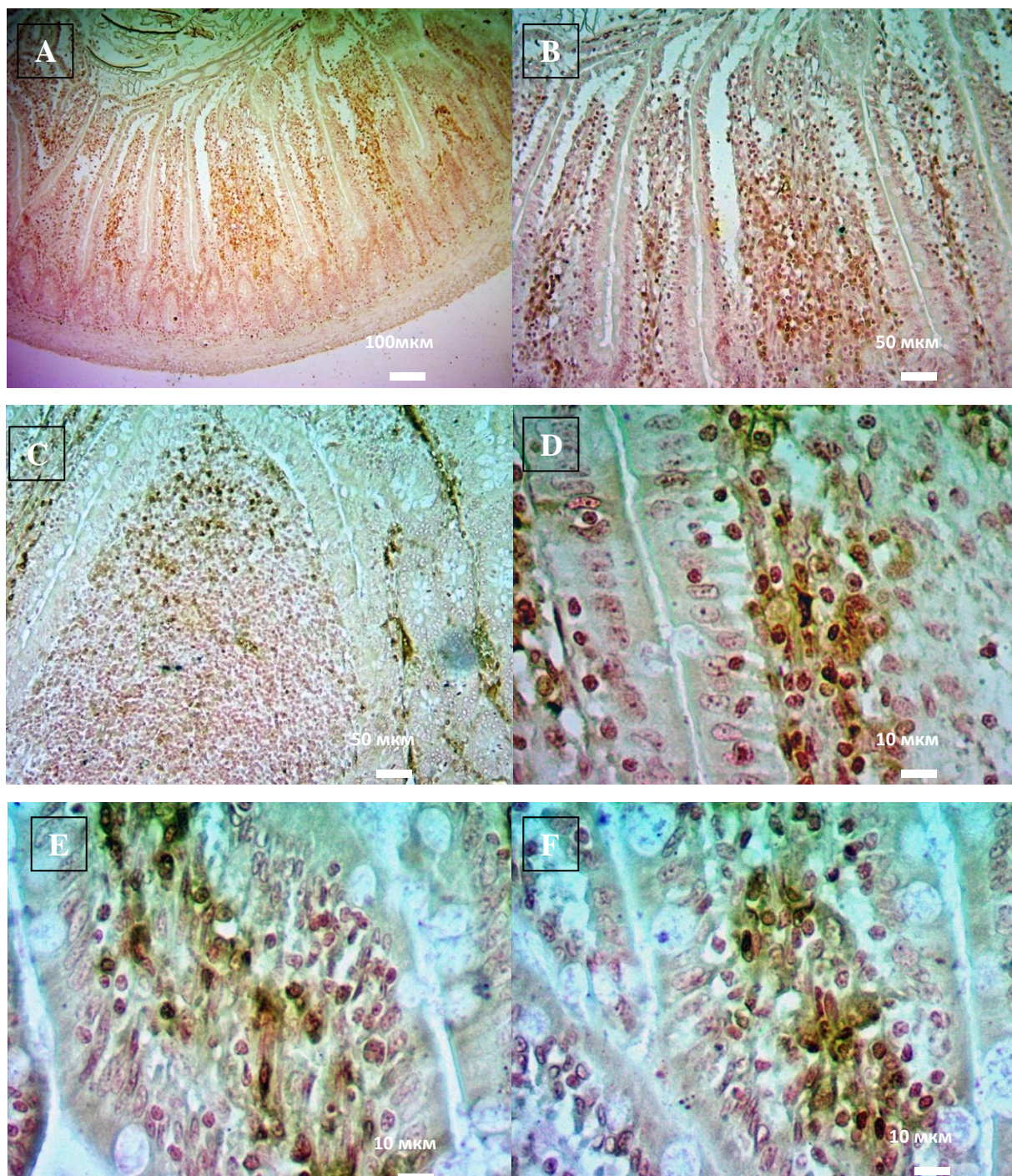


Рис. 4.1. Заповнені лімфоцитами ворсинки (ЗЛВ, LFV). CD25⁺ - клітини у власній пластинці слизової оболонки LFV у щурів лінії Вістар. Імуногістохімічна реакція з первинними МКАТ до CD25 щура і вторинними антитілами rabbit ImmunoCruz™ Staining system з наступною докраскою гематоксіліном: А-С - контроль; D-E - ХСС1; F - ХСС2.

4.2. Особливості експресії TLR2 лімфоцитами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Реалізація специфічності вродженої імунної системи лягає, значною мірою, на сімейство еволюційно консервативних рецепторів, відомих як Toll-подібні рецептори (TLR) [91, 105, 106, 150, 292], які відіграють вирішальну роль в розпізнаванні ПАМП і індукції імунної відповіді [70, 248, 267]. Тому, на наступному етапі роботи ми вивчили розподіл клітин, що експресують TLR2 і TLR4 типу у КАЛТ щурів.

У ході проведених досліджень серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів, попередньо інкубованих з МКАТ до досліджуваного TLR, нами встановлено, що сумарна щільності популяції (ЩП) TLR2⁺ - лімфоцитів у ЗЛВ склала 25 ± 5 на 1 мм^2 (рис. 4.2). Розвиток ХСС супроводжувався достовірним збільшенням загальної кількості TLR2⁺ - лімфоцитів. Зокрема, чисельність TLR2⁺ - клітин у ЗЛВ зросла у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,4 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2. У той же час, введення *Кан* експериментальним тваринам не впливало на щільність TLR2⁺ - лімфоцитів при ХСС1, проте достовірно призводило до зменшення загальної ЩП імунопозитивних клітин (на 31%, $p < 0,05$) при ХСС2. Такий же ефект спостерігався і при введенні *Лб* стресованим щурам, проте, на відміну від *Кан*, статистично значимий вплив на експресію TLR2⁺ - клітин надавав ХСС1. При цьому сумарна щільність TLR2⁺ - лімфоцитів у тварин зменшилась на 37% ($p < 0,05$) (табл. 4.2).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR2⁺ - клітин ЗЛВ у експериментальних тварин показало, що розвиток ХСС супроводжувався достовірним зростанням ЩП TLR2⁺ - лімфобластів у 3,7 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,5 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, TLR2⁺ - середніх лімфоцитів у 3 рази (ХСС1) – 2,2 рази (ХСС2), TLR 2⁺ - малих лімфоцитів у 2,9 разів (ХСС1) - 2,4 рази (ХСС2) ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою тварин.

Реакція стресованих щурів на введення *Кан* виражалась

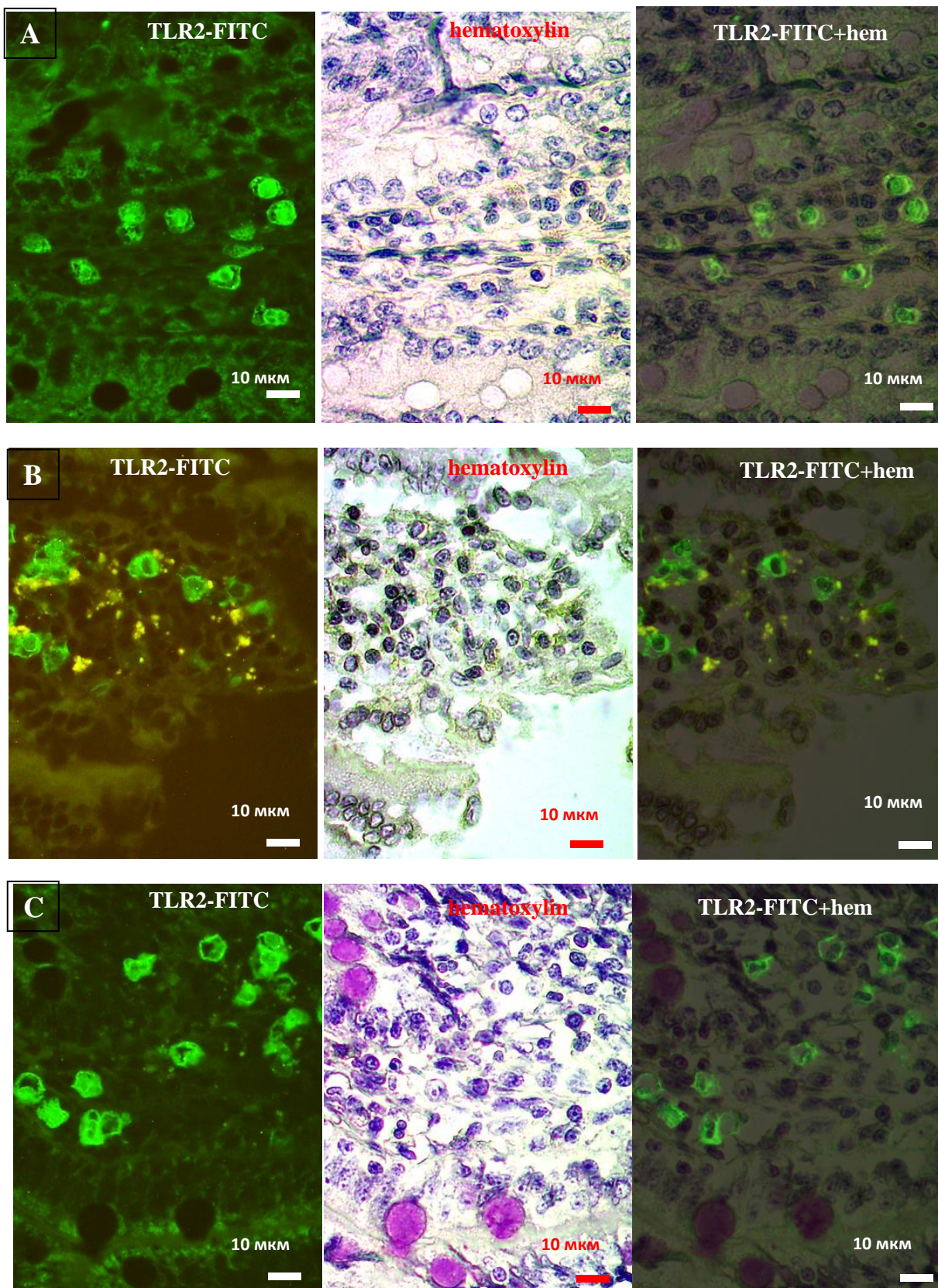


Рис. 4.2. TLR2⁺ - клітини у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ у щурів лінії Wistar. Реакція непрямой імунофлюоресценції з наступною докраскою гематоксилином: А - контроль; В - ХСС1; С - ХСС2.

у зменшенні числа TLR2⁺ - середніх лімфоцитів на 33% (p <0,05) при ХСС1 і у 2,2 рази (p <0,05) за умов ХСС2 (див. табл. 4.2).

На фоні введення *Лб* експериментальним тваринам також суттєво знижувалась ЩП TLR2⁺ - лімфобластів у 2,2 рази, (p<0,05) тільки при ХСС1, TLR2⁺ - середніх лімфоцитів на 42% (p<0,05) при ХСС1 і на 47% (p <0,05) у разі ХСС2, TLR2⁺ - малих лімфоцитів на 39% (p<0,05) тільки при впливі ХСС2. У всіх інших варіаціях статистично достовірних змін кількості лімфоцитів, що експресують TLR2, виявлено не було (див. табл. 4.2).

Таблиця 4.2.

Кількість TLR2⁺лімфоцитів в ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	TLR2 ⁺ -лімфобласти	TLR2 ⁺ середні лімфоцити	TLR2 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність TLR2 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{6 \pm 1}{25,2 \pm 5,8\%}$	$\frac{8 \pm 1}{30,9 \pm 5,8\%}$	$\frac{11 \pm 3}{43,9 \pm 11,5\%}$	25±5
стрес 1	$\frac{22 \pm 2^1}{28,4 \pm 2,8\%}$	$\frac{24 \pm 3^1}{30,6 \pm 3,3\%}$	$\frac{32 \pm 4^1}{41,0 \pm 4,7\%}$	78±5 ¹
стрес 2	$\frac{15 \pm 3^1}{25,4 \pm 4,7\%}$	$\frac{17 \pm 2^1}{29,3 \pm 4,1\%}$	$\frac{26 \pm 3^1}{45,3 \pm 5,0\%}$	58±6 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{19 \pm 3^1}{29,6 \pm 5,1\%}$	$\frac{16 \pm 3^{1,2}}{26,2 \pm 4,1\%}$	$\frac{28 \pm 6^1}{44,2 \pm 9,7\%}$	63±11 ¹
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{9 \pm 1}{21,9 \pm 3,2\%}$	$\frac{8 \pm 1^3}{19,1 \pm 2,9\%^3}$	$\frac{24 \pm 4^1}{59 \pm 10,5\%}$	41±4 ^{1,3}
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{10 \pm 1^2}{20,2 \pm 2,8\%^2}$	$\frac{14 \pm 2^{1,2}}{28,8 \pm 3,5\%}$	$\frac{25 \pm 3^1}{51,0 \pm 6,0\%}$	49±3 ^{1,2}
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{21 \pm 2^1}{46,2 \pm 4,0\%^{1,3}}$	$\frac{9 \pm 1^3}{19,4 \pm 2,1\%^3}$	$\frac{16 \pm 2^3}{34,4 \pm 4,6\%}$	46±4 ¹

Примітка: у чисельнику - щільність популяції TLR2⁺-лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів TLR2⁺-лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції TLR2⁺ - лімфоцитів, що відбиває щільність TLR2-рецепторів на поверхні імунопозитивних клітин, показало односпрямоване достовірне збільшення даного параметру у TLR2⁺ - лімфобластів (на 41%, $p < 0,05$) при ХСС1 і на 26%, ($p < 0,05$) у разі ХСС2, також спостерігалось зниження щільності експресії рецепторів у TLR2⁺ - малих лімфоцитів (на 10%, $p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* стресованим щурам лінії Вістар супроводжувалось достовірним збільшенням щільності TLR2-рецепторів у TLR2⁺- середніх лімфоцитів (на 8%, $p < 0,05$) при ХСС1 і зниженням даного показнику у TLR2⁺- малих лімфоцитів (на 12%, $p < 0,05$) у разі ХСС2, тоді як введення *Лб* характеризувалось зниженням щільності TLR2-рецепторів у TLR2⁺-лімфобластів (на 27%, $p < 0,05$) при ХСС1 і у TLR2⁺ - малих лімфоцитів (на 11%, $p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 4.3).

Таблиця 4.3.

**Щільність TLR2-рецепторів (УО₁₀) в ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар
($M \pm m$)**

Серії	TLR2 ⁺ лімфобласти	TLR2 ⁺ середні лімфоцити	TLR2 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,503±0,017	0,320±0,006	0,168±0,007
стрес 1	0,711±0,030 ¹	0,308±0,003	0,151±0,004 ¹
стрес 2	0,635±0,035 ¹	0,317±0,005	0,160±0,005
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	0,659±0,029 ¹	0,333±0,005 ²	0,144±0,004 ¹
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	0,578±0,026 ¹	0,327±0,006	0,141±0,005 ^{1,3}
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	0,517±0,016 ²	0,314±0,004	0,153±0,004
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	0,578±0,015 ¹	0,323±0,005	0,143±0,005 ^{1,3}

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

4.3. Особливості експресії TLR2 лімфоцитами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Дослідження серійних зрізів клубової кишки показало, що сумарна щільність TLR2⁺ - лімфоцитів у суб'епітеліальній зоні згрупованих лімфоїдних вузликів склала 29 ± 4 на 1 мм^2 . При цьому, у структурі популяції TLR2⁺ - клітин у досліджуваній морфофункціональній зоні переважали TLR2⁺ - малі лімфоцити, на частку яких припадало 43% від загальної кількості імунопозитивних клітин. При розвитку ХСС спостерігалась тенденція щодо збільшення сумарної ЩП TLR2⁺ - лімфоцитів у експериментальних тварин (у 2,4 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 86% ($p < 0,05$) при ХСС2). Введення *Кан* супроводжувалось статистично значущим зниженням кількості TLR2⁺ - лімфоцитів (на 37%, $p < 0,05$) тільки у разі ХСС2, тоді як реакція стресованих щурів на введення *Лб* виражалась у зменшенні сумарної ЩП TLR2⁺ - лімфоцитів на 23% ($p < 0,05$) у стані ХСС1 і не впливало на даний показник при ХСС2 (табл. 4.4).

Аналізуючи розподіл окремих класів і структури популяції TLR2⁺ - лімфоцитів в умовах ХСС, нами було встановлено достовірне зростання ЩП TLR2⁺ - лімфобластів у 3,4 рази, ($p < 0,05$) як при ХСС1, так і за умов ХСС2; TLR2⁺ - малих лімфоцитів у 2,3 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС1 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* щурам призводило до зниження кількості TLR2⁺ - середніх лімфоцитів на 40% ($p < 0,05$) тільки за умов ХСС2. Така ж тенденція простежувалась і при пероральному прийомі *Лб* експериментальним тваринам. Однак, достовірне зниження кількості лімфоцитів, що експресують TLR2, спостерігалось тільки у популяції TLR2⁺ - лімфобластів (у 2,2 рази, $p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами. У всіх інших варіаціях статистично достовірних змін до структури популяції лімфоцитів нами виявлено не було (див. табл. 4.4).

Таблиця 4.4.

Кількість TLR2⁺лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	TLR2 ⁻ -лімфобласти	TLR2 ⁺ середні лімфоцити	TLR2 ⁺ малі лімфоцити	ЩІТ TLR2 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{5 \pm 1}{18 \pm 3,8\%}$	$\frac{11 \pm 2}{38,7 \pm 6,5\%}$	$\frac{13 \pm 2}{43,3 \pm 7,0\%}$	29±4
стрес 1	$\frac{17 \pm 2^1}{28,7 \pm 3,4\%^1}$	$\frac{16 \pm 2}{26,3 \pm 2,8\%}$	$\frac{27 \pm 3^1}{45 \pm 4,4\%}$	60±4 ¹
стрес 2	$\frac{17 \pm 2^1}{30,7 \pm 3,8\%^1}$	$\frac{15 \pm 2}{28,0 \pm 3,8\%}$	$\frac{22 \pm 5}{41,3 \pm 9,5\%}$	54±6 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{11 \pm 2^1}{23 \pm 4,8\%}$	$\frac{16 \pm 2}{31 \pm 3,1\%}$	$\frac{23 \pm 5^1}{46,0 \pm 9,2\%}$	50±5 ¹
стрес 2 + канаміцин	$\frac{13 \pm 1^1}{37,6 \pm 3,8\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^3}{27,4 \pm 4,5\%}$	$\frac{12 \pm 2}{35,0 \pm 4,8\%}$	34±2 ³
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{8 \pm 1^{1,2}}{18,1 \pm 1,9\%^2}$	$\frac{16 \pm 1^1}{34,5 \pm 2,6\%^2}$	$\frac{22 \pm 2^1}{47,4 \pm 5,0\%}$	46±3 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{23 \pm 2^{1,3}}{47,6 \pm 4,9\%^{1,3}}$	$\frac{11 \pm 1}{21,8 \pm 2,9\%^1}$	$\frac{15 \pm 2}{30,6 \pm 4,0\%}$	49±3 ¹

Примітка: у чисельнику - щільність популяції TLR2⁺-лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів TLR2⁺-лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції TLR2⁺ - лімфоцитів, що відбиває щільність TLR2-рецепторів на клітинній мембрані, показало односпрямоване достовірне збільшення даного параметру у TLR2⁺ - лімфобластів на 28% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 19% ($p < 0,05$) у випадку ХСС2, однак, після прийому *Кан* було встановлено зниження експресії TLR2 - рецепторів тільки у TLR2⁺ - лимфобластів на 14% ($p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами. Введення *Лб* експериментальним тваринам статистично значущих зміни щільності рецепторів на поверхні імунних клітин у досліджуваній морфофункціональній зоні не викликало (див. табл. 4.5).

Таблиця 4.5.

**Щільність TLR2-рецепторів (УО_{1Ф}) в СЗ згрупованих
лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (М ± m)**

Серії	TLR2 ⁺ - лімфобласти	TLR2 ⁺ середні лімфоцити	TLR2 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,529±0,022	0,326±0,006	0,162±0,007
стрес 1	0,679±0,027 ¹	0,324±0,004	0,157±0,004
стрес 2	0,627±0,030 ¹	0,318±0,005	0,156±0,005
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	0,582±0,033 ²	0,326±0,005	0,146±0,005
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	0,567±0,018	0,319±0,008	0,145±0,006
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	0,612±0,028 ¹	0,316±0,003	0,161±0,004
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	0,625±0,018 ¹	0,316±0,005	0,153±0,005

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

4.4. Особливості експресії TLR2 лімфоцитами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості TLR2⁺ - лімфоцитів у ЛФ у 2,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 55,6% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до зменшення сумарної ЩП імунопозитивних клітин (на 21,6%, $p < 0,05$) при ХСС1 і збільшення даного показника (у 2,1 разів, $p < 0,05$) на фоні ХСС2. У той же час, введення *Лб* супроводжувалось зниженням загальної ЩП TLR2⁺ - клітин (на 33%, $p < 0,05$) тільки при ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 4.6).

Таблиця 4.6.

Кількість TLR2⁺ лімфоцитів в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	TLR2 ⁺ -лімфобласти	TLR2 ⁺ середні лімфоцити	TLR2 ⁺ малі лімфоцити	ЩІ TLR2 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{12 \pm 2}{34 \pm 5,6\%}$	$\frac{11 \pm 1}{31 \pm 3,4\%}$	$\frac{13 \pm 2}{35 \pm 5,8\%}$	36±4
стрес 1	$\frac{21 \pm 2^1}{26,6 \pm 2,4\%}$	$\frac{23 \pm 2^1}{28,7 \pm 2,3\%}$	$\frac{35 \pm 5^1}{44,7 \pm 6,0\%}$	79±5 ¹
стрес 2	$\frac{15 \pm 2}{27,2 \pm 3,7\%}$	$\frac{15 \pm 2}{26,5 \pm 3,6\%}$	$\frac{26 \pm 4^1}{46,3 \pm 7,7\%}$	56±7 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{13 \pm 2^2}{21,4 \pm 3,0\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{30,4 \pm 2,9\%}$	$\frac{30 \pm 3^1}{48,2 \pm 5,7\%}$	62±5 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	$\frac{28 \pm 5^{1,3}}{23,4 \pm 3,9\%}$	$\frac{24 \pm 3^{1,3}}{20,7 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{66 \pm 8^{1,3}}{55,9 \pm 6,6\%^1}$	118±12 ^{1,3}
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{13 \pm 1^2}{23,7 \pm 2,2\%}$	$\frac{16 \pm 1^{1,2}}{30,9 \pm 2,7\%}$	$\frac{24 \pm 3^{1,2}}{45,4 \pm 4,8\%}$	53±3 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{27 \pm 2^{1,3}}{45,4 \pm 4,4\%^3}$	$\frac{13 \pm 1}{22 \pm 2,1\%^1}$	$\frac{19 \pm 2^1}{32,6 \pm 3,6\%}$	59±3 ¹

Примітка: у чисельнику - щільність популяції TLR2⁺-лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів TLR2⁺-лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції TLR2⁺ - лімфоцитів у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС супроводжувався статистично значущим збільшенням ЩІ TLR2⁺ - лімфобластів на 75%, ($p < 0,05$) та TLR2⁺ - середніх лімфоцитів у 2,1 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, TLR2⁺ - малих лімфоцитів у 2,7 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. При введенні Кан стресованим щурам нами був встановлений однотипний ріст кількості TLR2⁺ - лімфобластів (на 86,7%, $p < 0,05$), TLR2⁺ - середніх лімфоцитів (на 60%, $p < 0,05$) TLR2⁺ - малих лімфоцитів (у 2,6 разів, $p < 0,05$) під впливом ХСС2 і достовірне зниження тільки числа TLR2⁺ - лімфобластів (на 38,1%, $p < 0,05$) при ХСС1. Введення Лб експериментальним

тваринам призводило до зменшення числа TLR2⁺-лімфобластів (на 38,1%, $p < 0,05$), TLR2⁺- середніх лімфоцитів (на 30,5%, $p < 0,05$), TLR2⁺- малих лімфоцитів (на 31,5%, $p < 0,05$) при ХСС1 і збільшувало кількість TLR2⁺- лімфобластів (на 80%, $p < 0,05$) при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 4.6).

Таблиця 4.7.

Щільність TLR2-рецепторів (УО_{1ф}) в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M ± m)

Серії	TLR2 ⁺ -лімфобласти	TLR2 ⁺ середні лімфоцити	TLR2 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,598±0,037	0,311±0,006	0,157±0,007
стрес 1	0,717±0,028 ¹	0,314±0,004	0,164±0,004
стрес 2	0,603±0,024	0,313±0,005	0,158±0,004
стрес 1 + канаміцин	0,676±0,043	0,319±0,004	0,155±0,004
стрес 2 + канаміцин	0,686±0,027 ³	0,323±0,004	0,150±0,003
стрес 1 + лактобактерин	0,570±0,023 ²	0,317±0,004	0,150±0,004 ²
стрес 2 + лактобактерин	0,594±0,016	0,329±0,004 ^{1,3}	0,155±0,004

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналіз щільності TLR2-рецепторів на поверхні імунопозитивних клітин показав підвищення даного показника тільки у TLR2⁺ - лімфобластів (на 19,9%, $p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 4.7). На фоні введення *Кан* стресованим щурам простежувалось достовірне збільшення щільності TLR2-рецепторів у TLR2⁺ - лімфобластів (на 13,8%, $p < 0,05$) при ХСС2, тоді як введення *Лб* характеризувалося різноспрямованою тенденцією - зниженням щільності TLR2 у TLR2⁺- лімфобластів і малих лімфоцитів у разі ХСС1 і збільшенням у середніх лімфоцитів (див. табл. 4.7).

4.5. Особливості експресії TLR4 лімфоцитами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Дослідження серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Вістар, попередньо інкубованих з АТ до TLR4, показало, що сумарна ЩП TLR4⁺ - лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки заповнених лімфоцитами ворсинок склала 34 ± 2 на 1 мм^2 (табл. 4.8, рис. 4.2.). Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості TLR4⁺ - лімфоцитів. Так, сумарна ЩП TLR4⁺ - клітин зросла на 58,9% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 41,2% ($p < 0,05$) за умов ХСС2. Введення *Кан* експериментальним тваринам не впливало на сумарну щільність TLR4⁺-лімфоцитів при ХСС1-2, тоді як введення *Лб* супроводжувалось збільшенням на 46% ($p < 0,05$) сумарна ЩП популяції TLR4⁺ - лімфоцитів при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 4.8).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції TLR4⁺ - клітин у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС супроводжувався достовірним значним зростанням ЩП TLR4⁺ - лімфобластів у 12 разів, ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 7 разів ($p < 0,05$) на фоні ХСС2; TLR4⁺ - середніх лімфоцитів на 62,5% ($p < 0,05$) і TLR4⁺ - малих лімфоцитів на 16% ($p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* експериментальним тваринам достовірно знижувало число TLR4⁺ - лімфобластів (на 58,4%, $p < 0,05$) при ХСС1, і приводило до значного зростання у 2,3 рази ($p < 0,05$) щільності даної популяції за умов ХСС2. При введенні *Лб* стресованим щурам спостерігалось достовірне збільшення кількості TLR4⁺ - лімфобластів у 2,5 рази ($p < 0,05$) і TLR4⁺ - середніх лімфоцитів у 2 рази ($p < 0,05$) тільки при ХСС2 (див. табл. 4.8).

Таблиця 4.8.

Кількість TLR4⁺ лімфоцитів у ЗЛВ клубової кишки щурів (M ± m)

Серії	TLR4 ⁺ лімфобласти	TLR4 ⁺ середні лімфоцити	TLR4 ⁺ малі лімфоцити	СІЦ TLR4 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{1 \pm 0}{4,0 \pm 1,3\%}$	$\frac{8 \pm 1}{22,9 \pm 3,5\%}$	$\frac{25 \pm 2}{73,1 \pm 6,6\%}$	34 ± 2
стрес 1	$\frac{12 \pm 2^1}{22,5 \pm 3,7\%^1}$	$\frac{13 \pm 2^1}{24,9 \pm 3,1\%}$	$\frac{29 \pm 4^1}{52,6 \pm 7,7\%}$	54 ± 5 ¹
стрес 2	$\frac{7 \pm 1^1}{13,7 \pm 2,9\%^1}$	$\frac{11 \pm 2}{23,8 \pm 4,3\%}$	$\frac{30 \pm 3}{62,5 \pm 6,7\%}$	48 ± 6 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{5 \pm 1^{1,2}}{10,1 \pm 1,7\%^{1,2}}$	$\frac{18 \pm 2^1}{33,9 \pm 3,3\%^{1,2}}$	$\frac{30 \pm 3}{56,0 \pm 5,4\%}$	53 ± 3 ¹
стрес 2 + канаміцин	$\frac{16 \pm 2^{1,3}}{38,3 \pm 4,0\%^{1,3}}$	$\frac{12 \pm 2}{28,3 \pm 5,0\%}$	$\frac{14 \pm 2^1}{33,4 \pm 4,8\%^{1,3}}$	42 ± 3 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{12 \pm 3^1}{21,6 \pm 4,8\%^1}$	$\frac{14 \pm 1^1}{26,2 \pm 2,7\%}$	$\frac{28 \pm 3}{52,2 \pm 5,7\%^1}$	54 ± 4 ¹
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{17 \pm 2^{1,3}}{24,9 \pm 3,8\%^{1,3}}$	$\frac{22 \pm 2^{1,3}}{31,4 \pm 4,6\%}$	$\frac{31 \pm 4}{43,7 \pm 8,1\%^1}$	70 ± 5 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику - щільність популяції TLR4⁺-лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів TLR4⁺-лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

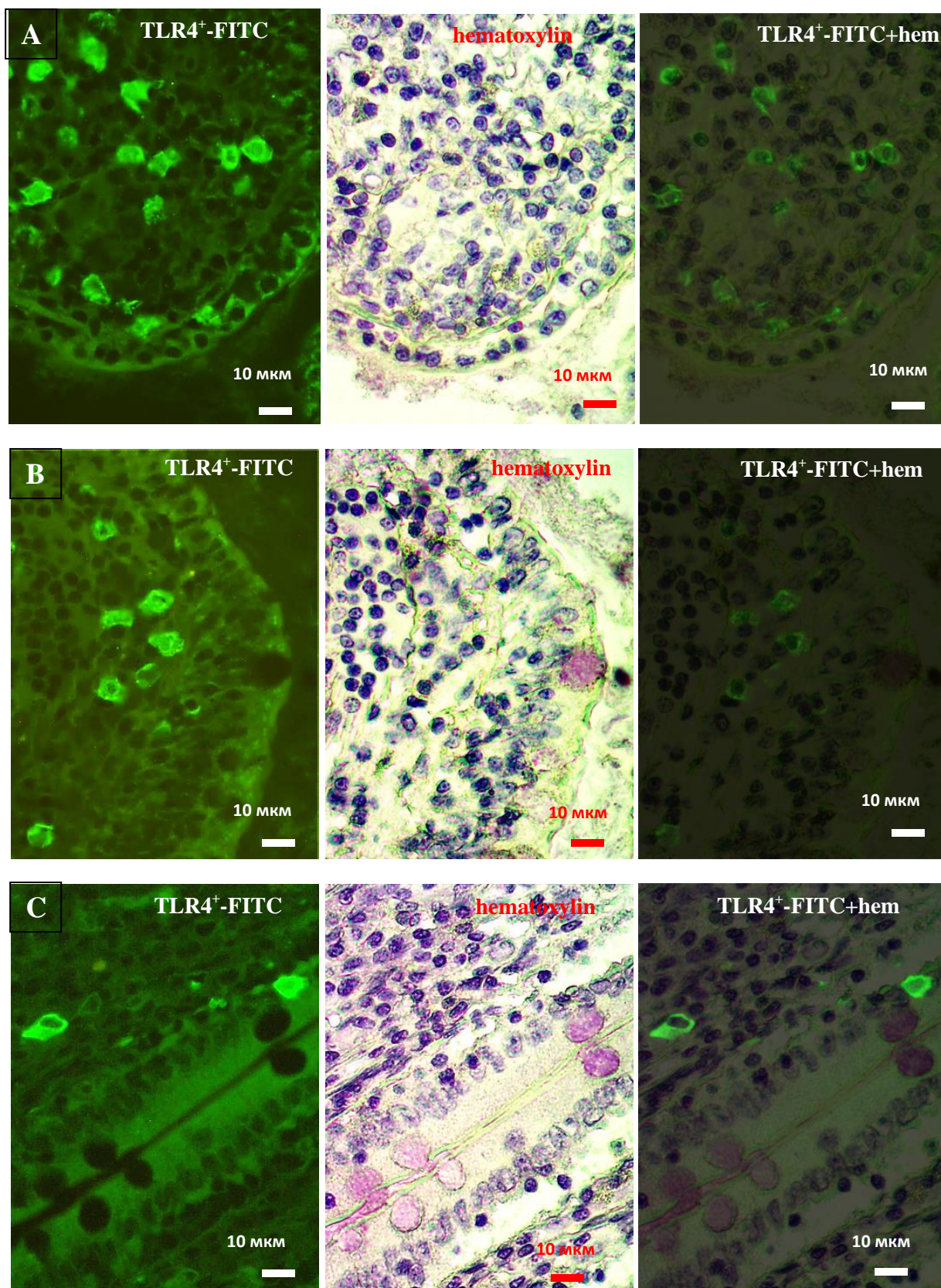


Рис. 4.2. TLR4⁺ - клітини у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ у щурів лінії Wistar. Реакція непрямой імунофлюоресценції з наступною докраскою гематоксиліном: А – ХСС1; В – ХСС2; С – контроль.

Вимірювання інтенсивності флюоресценції TLR4⁺ - лімфоцитів, що відбиває щільність TLR4 - рецепторів на поверхні імунних клітин, показало односпрямоване достовірне збільшення даного параметра у TLR4⁺ - лімфобластів на 24,1% при ХСС1 і на 39% (p <0,05) у разі ХСС2, у TLR4⁺ - середніх лімфоцитів на 7,1% (p <0,05) при ХСС1 і на 5,7% (p<0,05) при ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 4.9). Введення *Кан* викликало зниження щільності TLR4- рецепторів у TLR4⁺ - лімфобластів на 17,9% (p <0,05) при ХСС1 і на 20,1% (p <0,05) у разі ХСС2; у TLR4⁺ - середніх лімфоцитів у щурів з ХСС1 і спостерігалось підвищення щільності рецепторів у TLR4⁺ - малих лімфоцитів на 12,6% (p <0,05) при ХСС1. Після введення *Лб* було встановлено достовірне зниження щільності TLR4-рецепторів у TLR4⁺ - лимфобластів на 20,5% (p <0,05) і зростання щільності рецепторів у TLR4⁺ - малих лімфоцитів на 7,5% (p <0,05) тільки за умов ХСС2 (див. табл. 4.9).

Таблиця 4.9.

**Щільність TLR4-рецепторів (УО_{ІФ}) в ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар
(M ± m)**

Серії	TLR4 ⁺ лімфобласти	TLR4 ⁺ середні лімфоцити	TLR4 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,531±0,044	0,299±0,006	0,143±0,004
стрес 1	0,659±0,035 ¹	0,320±0,004 ¹	0,143±0,004
стрес 2	0,738±0,061 ¹	0,316±0,005 ¹	0,147±0,003
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	0,541±0,021 ²	0,302±0,003 ²	0,161±0,003 ^{1,2}
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	0,590±0,027 ³	0,318±0,005 ¹	0,153±0,007
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	0,592±0,035	0,332±0,012 ¹	0,153±0,004
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	0,587±0,027 ³	0,316±0,004 ¹	0,158±0,004 ^{1,3}

Примітка: достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

4.6. Особливості експресії TLR4 лімфоцитами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Сумарна щільність TLR4⁺ - лімфоцитів в суб'епітеліальній зоні згрупованих лімфоїдних вузликів у контрольних щурів склала 44 ± 3 на 1 мм^2 . При розвитку ХСС спостерігалось достовірне збільшення загальної кількості TLR4⁺- лімфоцитів тільки у випадку ХСС1 (на 50%, $p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 4.10).

Таблиця 4.10.

Кількість TLR4⁺лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар ($M \pm m$)

Серії	TLR4 ⁺ лімфобласти	TLR4 ⁺ середні лімфоцити	TLR4 ⁺ малі лімфоцити	СЦ TLR4 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{2 \pm 1}{5,0 \pm 1,4\%}$	$\frac{7 \pm 1}{15,5 \pm 2,8\%}$	$\frac{35 \pm 2}{79,5 \pm 5,1\%}$	44 ± 3
стрес 1	$\frac{22 \pm 4^1}{33,0 \pm 6,3\%^1}$	$\frac{13 \pm 2^1}{20,2 \pm 3,3\%}$	$\frac{31 \pm 4}{46,8 \pm 5,5\%^1}$	66 ± 8^1
стрес 2	$\frac{9 \pm 2^1}{14,9 \pm 3,0\%^1}$	$\frac{11 \pm 2}{18,4 \pm 3,2\%}$	$\frac{39 \pm 5}{66,7 \pm 8,8\%}$	59 ± 7
стрес 1 + канаміцин	$\frac{6 \pm 1^{1,2}}{13,7 \pm 1,8\%^{1,2}}$	$\frac{17 \pm 1^1}{36,0 \pm 3,1\%^{1,2}}$	$\frac{24 \pm 2^1}{50,3 \pm 3,6\%^1}$	47 ± 2^2
стрес 2 + канаміцин	$\frac{13 \pm 2^1}{19,7 \pm 2,5\%^1}$	$\frac{20 \pm 2^1}{29,8 \pm 2,7\%^{1,3}}$	$\frac{34 \pm 6}{50,5 \pm 8,7\%^1}$	67 ± 6^1
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{14 \pm 2^1}{23,6 \pm 2,7\%^1}$	$\frac{20 \pm 2^{1,2}}{34,0 \pm 3,7\%^{1,2}}$	$\frac{25 \pm 3^1}{42,4 \pm 5,1\%^1}$	59 ± 3^1
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{17 \pm 2^{1,3}}{24,9 \pm 3,4\%^{1,3}}$	$\frac{22 \pm 2^{1,3}}{31,4 \pm 4,1\%^{1,3}}$	$\frac{31 \pm 4}{43,7 \pm 7,3\%^{1,3}}$	70 ± 5^1

Примітка: у чисельнику - щільність популяції TLR4⁺- лімфоцитів (на 1 мм^2), у знаменнику – процентна частка окремих класів TLR4⁺- лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувалось зниженням сумарної ЩП TLR4⁺- лімфоцитів (на 28,8%, $p < 0,05$) при ХСС1, тоді як введення *Лб* не впливало на сумарну щільність TLR4⁺ - лімфоцитів.

Аналізуючи розподіл окремих класів і структури популяції TLR4⁺ - клітин, нами було доведено зростання ЩП молодих форм лімфоцитів: TLR4⁺ - лімфобластів у 11 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 4,5 рази ($p < 0,05$) у випадку ХСС2; TLR4⁺ - середніх лімфоцитів на 85,8%, $p < 0,05$ (ХСС1) у порівнянні з контролем. Введення *Кан* стресованим щурам супроводжувалось зниженням кількості TLR4⁺ - лімфобластів у 3,7 разів ($p < 0,05$) при ХСС1. Навпаки, реакція експериментальних тварин на введення *Лб* виражалась у збільшенні кількості TLR4⁺ - лімфобластів (на 89 %, $p < 0,05$) при ХСС2; TLR4⁺ - середніх лімфоцитів на 53,9 % ($p < 0,05$) при ХСС1 і в 2 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 (див. табл. 4.10).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції TLR4⁺- лімфоцитів показало збільшення щільності TLR4-рецепторів у TLR4⁺ - лімфобластів на 14,9% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 21,2% ($p < 0,05$) у разі ХСС2 (табл. 4.11).

Таблиця 4.11.

Щільність TLR4-рецепторів (УО_{1Ф}) в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (М ± m)

Серії	TLR4 ⁺ лімфобласти	TLR4 ⁺ середні лімфоцити	TLR4 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,552±0,030	0,305±0,006	0,148±0,003
стрес 1	0,634±0,025 ¹	0,317±0,006	0,143±0,004
стрес 2	0,669±0,047 ¹	0,311±0,005	0,149±0,003
стрес 1 + канаміцин	0,524±0,018 ²	0,315±0,004	0,163±0,004 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	0,706±0,045 ¹	0,322±0,005 ¹	0,144±0,004
стрес 1 + лактобактерин	0,573±0,019	0,314±0,004	0,158±0,004 ²
стрес 2 + лактобактерин	0,587±0,027	0,316±0,004	0,158±0,004

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Після прийому *Кан* було встановлено достовірне зниження рівня експресії рецепторів у TLR4⁺ - лімфобластів на 17,4% (p <0,05), але спостерігалось зростання щільності рецепторів у TLR4⁺ - малих лімфоцитів на 14% (p <0,05) тільки у разі ХСС1. Введення *Лб* експериментальним тваринам супроводжувалось підвищенням експресії TLR4-рецепторів у TLR4⁺ - малих лімфоцитів на 10,5% (p <0,05) тільки за умов ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 4.11).

4.7. Особливості експресії TLR4 лімфоцитами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів у щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Результати вивчення серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з АТ до досліджуваного TLR4, встановило, що сумарна щільність TLR4⁺ - лімфоцитів в лімфоїдних фолікулах згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки склала 41±3 на 1 мм². Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості TLR4⁺ - лімфоцитів. Так, СЩ TLR4⁺ - клітин зросла на 65,9% (p <0,05) при ХСС1 і на 43,9% (p <0,05) на фоні ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* експериментальним тваринам надавало більш виражений вплив на експресію TLR4 лімфоцитами при ХСС2, призводячи до збільшення СЩ TLR4⁺- клітин на 74,6% (p <0,05). При введенні *Лб* стресованим щурам спостерігалось зростання СЩ TLR4⁺ - лімфоцитів (на 42,7%, p <0,05 (ХСС1) і на 49,2% p <0,05 (ХСС2)) (табл. 4.12).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції TLR4⁺ - клітин у експериментальних тварин довів, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням ЩП TLR4⁺ - лімфобластів у 4,5 рази (p <0,05) при ХСС1 і у 3,5 рази (p <0,05) при ХСС2, TLR 2⁺ - середніх лімфоцитів на 78% (p <0,05) за умов ХСС1 у порівнянні з контролем (див. табл. 4.12). Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до достовірного зниження кількості TLR4⁺ - лімфобластів на 61,2% (p <0,05) у разі ХСС1 і зростанню TLR4⁺ - малих лімфоцитів у 2,1 рази (p <0,05) при ХСС2. Тоді як введення *Лб* експериментальним тваринам призводило до достовірного збільшення

числа TLR4⁺ - лімфобластів на 67% (p <0,05) і TLR4⁺ - середніх лімфоцитів на 87,5% (p <0,05) при ХСС1, TLR4⁺ - малих лімфоцитів на 40% (p <0,05) на фоні ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 4.12).

Таблиця 4.12.

Кількість TLR4⁺лімфоцитів в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	TLR4 ⁺ лімфобласти	TLR4 ⁺ середні лімфоцити	TLR4 ⁺ малі лімфоцити	СЦ TLR4 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{4 \pm 1}{8,9 \pm 1,9\%}$	$\frac{9 \pm 2}{21,2 \pm 4,3\%}$	$\frac{28 \pm 3}{69,9 \pm 6,7\%}$	41±3
стрес 1	$\frac{18 \pm 3^1}{26,1 \pm 4,7\%^1}$	$\frac{16 \pm 3^1}{23,9 \pm 4,1\%}$	$\frac{34 \pm 5}{50,0 \pm 7,9\%}$	68±11 ¹
стрес 2	$\frac{14 \pm 2^1}{23,7 \pm 3,8\%^1}$	$\frac{15 \pm 2}{24,9 \pm 4,3\%}$	$\frac{30 \pm 4}{51,4 \pm 6,9\%}$	59±8 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{7 \pm 1^{1,2}}{15,0 \pm 1,8\%^{1,2}}$	$\frac{19 \pm 1^1}{38,3 \pm 3,0\%^{1,2}}$	$\frac{23 \pm 2}{46,7 \pm 3,5\%^1}$	49±3
стрес 2 + канаміцин	$\frac{20 \pm 4^1}{19,2 \pm 3,5\%^1}$	$\frac{21 \pm 3^1}{20,9 \pm 2,7\%}$	$\frac{62 \pm 7^{1,3}}{59,9 \pm 7,2\%}$	103±10 ^{1,3}
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{30 \pm 4^{1,2}}{31,1 \pm 3,9\%^1}$	$\frac{30 \pm 3^{1,2}}{30,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{37 \pm 3^1}{38,2 \pm 3,2\%^1}$	97±7 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{23 \pm 4^1}{26,6 \pm 4,3\%^1}$	$\frac{23 \pm 3^1}{25,8 \pm 3,6\%}$	$\frac{42 \pm 4^{1,3}}{47,6 \pm 4,1\%^1}$	88±8 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику - щільність популяції TLR4⁺- лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів TLR4⁺- лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Розвиток ХСС у щурів лінії Вістар призводив до статистично значимого підвищення щільності TLR4 - рецепторів у TLR4⁺ - лімфобластів: на 39% (p <0,05) на фоні ХСС1 і на 25% (p <0,05) при ХСС2 у порівнянні з контрольною групою. Характерно, що введення *Кан* і *Лб* супроводжувалось достовірним незначним зниженням рівня експресії рецепторів також в даній популяції клітин (відповідно, на 21%, p <0,05 і на 1%, p <0,05) тільки за умов ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (табл. 4.13).

Таблиця 4.13.

Щільність TLR4-рецепторів (УО_{1Ф}) в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M ± m)

Серії	TLR4 ⁺ лімфобласти	TLR4 ⁺ середні лімфоцити	TLR4 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,528±0,025	0,311±0,005	0,152±0,003
стрес 1	0,736±0,032 ¹	0,318±0,004	0,149±0,003
стрес 2	0,659±0,027 ¹	0,311±0,004	0,149±0,003
стрес 1 + канаміцин	0,580±0,027 ²	0,317±0,003	0,154±0,003
стрес 2 + канаміцин	0,649±0,033 ¹	0,313±0,005	0,140±0,003 ¹
стрес 1 + лактобактерин	0,653±0,021 ^{1,2}	0,316±0,003	0,148±0,003
стрес 2 + лактобактерин	0,663±0,031 ¹	0,318±0,004	0,153±0,004

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

4.8. Особливості експресії транскрипційного фактора Nf-kB імунними клітинами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Як було описано вище, хронічний соціальний стрес суттєво впливає на рівень сигналізації через паттерн-розпізнаючі рецептори вродженого імунітету. Це закономірно повинно активізувати експресію ядерного фактору Nf-kB структурами КАЛТ [64]. Враховуючи, що цей фактор є основним стимулятором продукції прозапальних цитокінів та важливим регулятором процесів дозрівання, диференціювання й активації лімфоцитів, можна припустити, що зміни рівня експресії Nf-kB є одним із факторів ризику розвитку в подальшому запальних та аутоімунних захворювань [108, 120, 282]. Тому, на наступному етапі ми вивчили розподіл Nf-kB⁺ - клітин у КАЛТ щурів.

Вивчення серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Вістар, попередньо інкубованих з АТ до транскрипційного фактору Nf-kB, показало, що ЩП Nf-kB⁺ - клітин у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ становила 78 ± 15 на 1 мм^2 . При розвитку хронічного соціального стресу спостерігалось збільшення у 2 рази ($p < 0,05$) ЩП Nf-kB⁺ - клітин експериментальних тварин тільки у випадку ХСС1 у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Кан* призводило до статистично значимого зниження на 25,5% ($p < 0,05$) сумарної ЩП Nf-kB⁺ - клітин також тільки при ХСС1. Реакція стресованих щурів на введення *Лб* виражалася у зменшенні сумарної ЩП Nf-kB⁺ - клітин на 46,3% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 43,1% ($p < 0,05$) у разі ХСС2 (табл. 4.14).

Таблиця 4.14.

Кількість Nf-kB⁺-клітин в ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар ($M \pm m$).

Серії	Nf-kB ⁺ -макрофаги	Nf-kB ⁺ -дендритні клітини	Nf-kB ⁺ -лімфоцити	Сумарна щільність Nf-kB ⁺ -клітин
контроль	$\frac{11 \pm 3}{14,4 \pm 4,1\%}$	$\frac{8 \pm 2}{10,4 \pm 2,5\%}$	$\frac{59 \pm 11}{75,2 \pm 14,1\%}$	78 ± 15
стрес 1	$\frac{14 \pm 4}{9,6 \pm 2,6\%}$	$\frac{23 \pm 4^1}{15,5 \pm 2,6\%}$	$\frac{112 \pm 9^1}{74,9 \pm 6,2\%}$	149 ± 14^1
стрес 2	$\frac{28 \pm 8}{20,4 \pm 5,7\%}$	$\frac{12 \pm 2}{8,7 \pm 1,4\%}$	$\frac{97 \pm 17}{70,9 \pm 12,6\%}$	137 ± 25
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{13 \pm 2}{11,5 \pm 2,0\%}$	$\frac{10 \pm 2^2}{8,9 \pm 1,8\%^2}$	$\frac{88 \pm 7^{1,2}}{79,6 \pm 6,3\%}$	111 ± 8^2
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{9 \pm 2^3}{9,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{8 \pm 1}{8,0 \pm 1,1\%}$	$\frac{85 \pm 8}{83,0 \pm 7,9\%}$	102 ± 9
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{13 \pm 2}{15,9 \pm 2,4\%}$	$\frac{15 \pm 2^1}{19,3 \pm 2,6\%^1}$	$\frac{52 \pm 6^2}{64,8 \pm 6,9\%}$	80 ± 7^2
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{13 \pm 2}{17,0 \pm 2,2\%}$	$\frac{6 \pm 1^3}{7,4 \pm 1,4\%}$	$\frac{59 \pm 5^3}{75,6 \pm 6,1\%}$	78 ± 5^3

Примітка: у чисельнику - щільність популяції Nf-kB⁺ - клітин (на 1 мм^2), у знаменнику - процентна частка окремих класів Nf-kB⁺ - клітин; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналізуючи розподіл окремих класів і структури популяції Nf-kB⁺ - клітин, нами був встановлений однотипний достовірний ріст ЩП Nf-kB⁺ - лімфоцитів на 90% (p <0,05), Nf-kB⁺ - дендритних клітин у 2,9 разів (p <0,05) тільки за умов ХСС1 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* щурам супроводжувалось зменшенням кількості Nf-kB⁺ - лімфоцитів (на 21,5 %, p <0,05) Nf-kB⁺ - дендритних клітин (на 56,6 %, p <0,05) при ХСС1 і зниженням кількості Nf-kB⁺ - макрофагів (у 3,2 рази, p <0,05) на фоні ХСС2. Прийом *Лб* тваринами також призводив до значного зниження ЩП Nf-kB⁺ - лімфоцитів (у 2,2 рази при ХСС1 і на 39,2 % на фоні ХСС2, p <0,05), Nf-kB⁺ - дендритних клітин (у 2 рази, p <0,05) тільки за умов ХСС2. Однак, в інших випадках проведені дослідження з виявлення щільності популяції і процентної частки Nf-kB⁺ - клітин статистичного значення не мали (див. табл. 4.14).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції Nf-kB⁺-клітин показало збільшення концентрації транскрипційного фактора Nf-kB тільки в Nf-kB⁺ - лімфоцитах (на 11%, p <0,05) при ХСС2 у порівнянні з контролем.

Таблиця 4.15.

Концентрація білка Nf-kB (УО_{1ф}) в клітинах ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар (M ± m)

Серії	Nf-kB ⁺ -макрофаги	Nf-kB ⁺ -дендритні клітини	Nf-kB ⁺ -лімфоцити
контроль	0,423±0,099	0,513±0,026	0,157±0,003
стрес 1	0,420±0,012	0,484±0,015	0,154±0,002
стрес 2	0,437±0,011	0,484±0,018	0,174±0,002 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	0,391±0,009 ¹	0,506±0,035	0,154±0,003
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	0,404±0,017	0,500±0,036	0,159±0,002 ³
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	0,473±0,017 ^{1,2}	0,529±0,019	0,152±0,003
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	0,423±0,010	0,534±0,038	0,161±0,003 ³

Примітка: достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Однак, після модуляції складу кишкової мікрофлори спостерігалась різноспрямована тенденція: *Кан* достовірно спричиняв зниження концентрації Nf-kB- білку тільки у Nf-kB⁺ - лімфоцитів (на 9%, p<0,05) при ХСС2; тоді як *Лб* призводив до збільшення концентрації досліджуваного білку у Nf-kB⁺ - макрофагів (на 12,7%, p<0,05) у разі ХСС1 і до зниження даного параметра у Nf-kB⁺ - лімфоцитів (на 7,5%, p<0,05) при ХСС2 (табл. 4.15). В інших випадках у експериментальних тварин статистично значущої зміни концентрації Nf-kB в імунних клітинах у досліджуваній нами морфофункціональній зоні не спостерігалось.

4.9. Особливості експресії транскрипційного фактора Nf-kB імунними клітинами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Сумарна щільність Nf-kB⁺ - клітин в суб'епітеліальній зоні згрупованих лімфоїдних вузликів склала 33 ± 2 на 1 мм². Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості Nf-kB⁺ - клітин. Так, сумарна ЩП Nf-kB⁺ - клітин зросла на 91% (p <0,05) при ХСС1 і на 52% (p <0,05) на фоні ХСС2. При введенні *Кан* експериментальним тваринам простежувалась різноспрямованість в отриманих результатах. Так, його пероральний прийом знижував ЩП Nf-kB⁺ - клітин на 33,4% (p <0,05) при ХСС1 і збільшував цей показник на 54% (p <0,05) у щурів з ХСС2. Введення *Лб* тваринам на фоні ХСС супроводжувалось статистично значущим зростанням ЩП Nf-kB⁺ - клітин (на 29%, p <0,05) тільки за умов ХСС1 у порівнянні зі стресованими щурами (табл. 4.16).

Вивчення розподілу окремих класів і структури популяції Nf-kB⁺ - клітин у експериментальних тварин виявило достовірне зростання ЩП Nf-kB⁺ - лімфоцитів на 87,5% (p <0,05) при ХСС1 і на 50% (p <0,05) у разі ХСС2; Nf-kB⁺ - дендритних клітин на 75% (p <0,05) при ХСС1 і у 2,5 рази (p <0,05) на фоні ХСС2; Nf-kB⁺ - макрофагів у 2,2 рази (p <0,05) тільки за умов ХСС1 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувалось різноспрямованістю

отриманих результатів. Так, кількість Nf-kB⁺ - лімфоцитів знижувалась на 35,6% (p<0,05) при ХСС1 і збільшувалась на 61,2% (p <0,05) на фоні ХСС2; кількість Nf-kB⁺ - дендритних клітин знижувалась на 75% (p <0,05) тільки у разі ХСС1; тоді як кількість Nf-kB⁺ - макрофагів збільшувалась у 3 рази (p <0,05) тільки при ХСС2. Пероральний прийом *Лб* щурами на фоні ХСС призводив до росту кількості Nf-kB⁺ - лімфоцитів (на 24,5%, p <0,05) і Nf-kB⁺ - дендритних клітин (на 85,8%, p <0,05) при ХСС1 і значного зниження кількості Nf-kB⁺ - дендритних клітин (у 2,5 рази, p <0,05) у щурів з ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 4.16).

Таблиця 4.16.

Кількість Nf-kB⁺-клітин в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	Nf-kB ⁺ -макрофаги	Nf-kB ⁺ -дендритні клітини	Nf-kB ⁺ -лімфоцити	СЦ Nf-kB ⁺ -клітин
контроль	$\frac{5 \pm 1}{14,4 \pm 2,5\%}$	$\frac{4 \pm 1}{11,8 \pm 1,9\%}$	$\frac{24 \pm 2}{73,8 \pm 6,4\%}$	33±2
стрес 1	$\frac{11 \pm 1^1}{17,1 \pm 1,7\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{11,3 \pm 1,6\%}$	$\frac{45 \pm 3^1}{71,6 \pm 5,1\%}$	63±3 ¹
стрес 2	$\frac{4 \pm 1}{8,0 \pm 1,4\%^1}$	$\frac{10 \pm 2^1}{19,3 \pm 3,1\%^1}$	$\frac{36 \pm 3^1}{72,7 \pm 6,0\%}$	50±4 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{9 \pm 1^1}{22,7 \pm 2,6\%^1}$	$\frac{4 \pm 1^2}{8,8 \pm 1,8\%}$	$\frac{29 \pm 2^2}{68,5 \pm 4,9\%}$	42±2 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	$\frac{12 \pm 2^{1,3}}{15,5 \pm 2,6\%^3}$	$\frac{7 \pm 1}{8,5 \pm 1,6\%^3}$	$\frac{58 \pm 4^{1,3}}{76,0 \pm 5,6\%}$	77±5 ^{1,3}
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{12 \pm 1^1}{14,7 \pm 1,5\%}$	$\frac{13 \pm 1^{1,2}}{15,7 \pm 1,8\%}$	$\frac{56 \pm 4^{1,2}}{69,6 \pm 4,4\%}$	81±4 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{5 \pm 1}{11,5 \pm 1,1\%^3}$	$\frac{4 \pm 1^3}{8,4 \pm 1,0\%^3}$	$\frac{36 \pm 2^1}{80,1 \pm 2,8\%}$	45±3 ¹

Примітка: у чисельнику - щільність популяції Nf-kB⁺ - клітин (на 1 мм²), у знаменнику - процентна частка окремих класів Nf-kB⁺ - клітин; достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Концентрацію Nf-kB зростала у Nf-kB⁺ - макрофагів на 14,7% (p <0,05) тільки при ХСС1 у порівнянні з контролем (табл. 4.17). Введення *Кан* призводило до підвищення концентрації досліджуваного білку у Nf-kB⁺ - макрофагів і дендритних клітин лише в умовах ХСС2. Однак, введення *Лб* супроводжувалось достовірним зниженням концентрації білка Nf-kB лише у Nf-kB⁺ - макрофагів також при ХСС2 (див. табл. 4.17).

Таблиця 4.17.

Концентрація білку Nf-kB (УО_{ІФ}) в клітинах СЗ (M ± m).

Серії	Nf-kB ⁺ - макрофаги	Nf-kB ⁺ -дендритні клітини	Nf-kB ⁺ - лімфоцити
контроль	0,389±0,014	0,542±0,038	0,166±0,004
стрес 1	0,446±0,021 ¹	0,575±0,045	0,169±0,004
стрес 2	0,368±0,012	0,456±0,021	0,171±0,004
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	0,415±0,017	0,538±0,046	0,170±0,004
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	0,443±0,020 ^{1,3}	0,629±0,071 ³	0,175±0,004
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	0,414±0,013	0,628±0,033	0,170±0,003
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	0,336±0,006 ^{1,3}	0,561±0,048	0,166±0,003

Примітка: достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

4.10. Особливості експресії транскрипційного фактора Nf-kB імунними клітинами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості Nf-kB⁺ - клітин в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки на 88,6% (p <0,05) при ХСС1 і на 91,5% (p <0,05) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Кан* і *Лб* експериментальним тваринам призводило до зниження

сумарної ЩП Nf-kB⁺ - клітин на 27,3%, (p <0,05) - ХСС1 і на 16,5%, (p <0,05) - ХСС2, відповідно, у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 4.18).

Таблиця 4.18.

Кількість Nf-kB⁺ - клітин в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	Nf-kB ⁺ -макрофаги	Nf-kB ⁺ -дендритні клітини	Nf-kB ⁺ -лімфоцити	Сумарна щільність Nf-kB ⁺ - клітин
контроль	$\frac{6 \pm 1}{18,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{2 \pm 1}{6,8 \pm 1,3\%}$	$\frac{27 \pm 2}{75,2 \pm 4,7\%}$	35±2
стрес 1	$\frac{16 \pm 2^1}{24,6 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{6 \pm 1^1}{8,0 \pm 1,6\%}$	$\frac{44 \pm 4^1}{67,4 \pm 5,9\%}$	66±4 ¹
стрес 2	$\frac{8 \pm 1}{11,5 \pm 1,5\%^1}$	$\frac{15 \pm 2^1}{22,7 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{44 \pm 3^1}{65,8 \pm 3,9\%}$	67±3 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{13 \pm 1^1}{27,8 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{6 \pm 1^1}{12,0 \pm 1,8\%^1}$	$\frac{29 \pm 2^2}{60,2 \pm 4,6\%^1}$	48±3 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	$\frac{11 \pm 2^1}{18,4 \pm 2,8\%^3}$	$\frac{6 \pm 1^{1,3}}{8,7 \pm 2,1\%^3}$	$\frac{43 \pm 6^1}{72,9 \pm 9,9\%}$	60±8 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{25 \pm 1^{1,2}}{36,6 \pm 1,7\%^{1,2}}$	$\frac{7 \pm 1^1}{11,0 \pm 1,2\%^1}$	$\frac{35 \pm 2^{1,2}}{52,4 \pm 3,2\%^{1,2}}$	67±4 ¹
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{3 \pm 1^{1,3}}{6,0 \pm 1,0\%^{1,3}}$	$\frac{7 \pm 1^{1,3}}{12,5 \pm 1,5\%^{1,3}}$	$\frac{46 \pm 2^1}{81,5 \pm 2,9\%^3}$	56±2 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику - щільність популяції Nf-kB⁺ - клітин (на 1 мм²), у знаменнику - процентна частка окремих класів Nf-kB⁺ - клітин; достовірність відмінностей параметрів p <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції Nf-kB⁺ - клітин у експериментальних тварин встановив, що розвиток ХСС супроводжувався статистично значущим збільшенням ЩП Nf-kB⁺ - лімфоцитів на 63% (p <0,05) і при ХСС1, і у випадку ХСС2; Nf-kB⁺ - дендритних клітин у 3 рази (p <0,05) при ХСС1 і у 7,5 разів (p <0,05) за умов ХСС2; Nf-kB⁺ - макрофагів у 2,7 разів (p <0,05) тільки при ХСС1 у порівнянні з контролем. Введення Кан щурам з ХСС призводило до достовірного зниження ЩП і процентної частки Nf-kB⁺ - лімфоцитів на 34,1% (p

<0,05) при ХСС1, Nf-kB⁺ - дендритних клітин у 2,5 рази (р <0,05) при ХСС2. Введення *Лб* експериментальним тваринам зменшувало кількість Nf-kB⁺ - лімфоцитів на 20,5% (р <0,05) при ХСС1, Nf-kB⁺ - дендритних клітин у 2,2 рази (р <0,05) і Nf-kB⁺ - макрофагів у 2,7 разів (р <0,05) за умов ХСС2, тоді як кількість Nf-kB⁺ - макрофагів збільшувалась на 56,3% (р <0,05) при ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 4.18).

Статистично значуще підвищення концентрації білка Nf-kB в імунних клітинах реєструвалось при введенні *Кан* у Nf-kB⁺ - дендритних клітинах (на 64,9%, р <0,05) і у Nf-kB⁺ - макрофагах (на 33,9%, р <0,05) тільки при ХСС2.

Таблиця 4.19.

Концентрація білка Nf-kB (УО₁₀) в клітинах ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (М ± m)

Серії	Nf-kB ⁺ - макрофаги	Nf-kB ⁺ - дендритні клітини	Nf-kB ⁺ - лімфоцити
контроль	0,428±0,022	0,427±0,026	0,175±0,004
стрес 1	0,493±0,025	0,551±0,058	0,166±0,004
стрес 2	0,381±0,011	0,449±0,016	0,173±0,003
стрес 1 + канаміцин	0,509±0,016 ¹	0,491±0,027	0,173±0,004
стрес 2 + канаміцин	0,510±0,028 ^{1,3}	0,740±0,090 ³	0,175±0,004
стрес 1 + лактобактерин	0,615±0,014 ^{1,2}	0,687±0,033 ^{1,2}	0,174±0,003
стрес 2 + лактобактерин	0,368±0,011 ¹	0,490±0,028	0,169±0,003

Примітка: достовірність відмінностей параметрів р <0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

При введенні *Лб* спостерігався той же самий ефект: ми виявили зростання концентрації білка у Nf-kB⁺ - дендритних клітинах (на 24,7% (р <0,05) і у Nf-kB⁺ - макрофагах (на 24,8%, р <0,05) тільки у разі ХСС1 (табл. 4.19). У інших випадках достовірної зміни досліджуваного параметра нами не спостерігалось.

4.11. Висновки до розділу 4.

Узагальнюючи наведені у даній главі результати, можна зазначити, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості лімфоцитів, які експресують TLR2 і 4 типу у КАЛТ щурів, найбільш вираженим у ЗЛВ (TLR2⁺ - лімфоцити) і у ЛФ (TLR4⁺ - лімфоцити). ХСС призводив до зростання кількості Nf-kB⁺ - клітин: в ЗЛВ – у 1,8-2 рази (p <0,05); в СЗ – на 52-91% (p <0,05); в ЛФ – на 89-92% (p <0,05), а також впливав на щільність TLR2, TLR4 і концентрацію Nf-kB в імунопозитивних клітинах. Зміни складу кишкової мікрофлори шляхом введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувались загальною тенденцією до зниження кількості TLR2⁺ -, TLR4⁺ - і Nf-kB⁺ - клітин за винятком ЛФ при ХСС2, де загальне число TLR2⁺ - і TLR4⁺ - лімфоцитів збільшувалось на 75% - у 2,1 рази (p <0,05), а також в СЗ при ХСС2, де чисельність Nf-kB⁺ - клітин зростала на 54% (p <0,05).

Введення *Лб* стресованим тваринам приводило до зниження сумарної ЩП TLR2⁺ - лімфоцитів при розвитку ХСС1 і не впливало на їх чисельність у разі ХСС2, тоді як загальна кількість TLR4⁺ - лімфоцитів переважно зростала (в ЗЛВ - на 46% в умовах ХСС2; в ЛФ - на 43% і на 49%, відповідно при ХСС1 і ХСС2). При пероральному прийомі *Лб* тваринами також спостерігалось зниження кількості Nf-kB⁺ - клітин (в ЗЛВ – на 46% при ХСС1 і на 50% за умов ХСС2; в ЛФ - на 17%, ХСС2) за винятком СЗ, де їх кількість при ХСС1 достовірно збільшувалась (на 29%) і різноспрямовано впливала на концентрацію Nf-kB в імунопозитивних клітинах.

Таким чином, отримані нами дані демонструють, що ХСС призводить до значної активації вродженої імунної системи і посилення про-запальної сигналізації в КАЛТ. Це, в свою чергу, може суттєво впливати на рівень активації адаптивної імунної відповіді, продукцію прозапальних цитокінів, диференціювання субпопуляцій хелперних Т-клітин та ініціювати розвиток запальних захворювань кишківнику та АІЗ.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані у наступних роботах [8, 11, 13, 151, 152, 273, 278].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ ТА МОДУЛЯЦІЇ СКЛАДУ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ НА ЕКСПРЕСІЮ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ РЕГУЛЯТОРІВ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ Т-ЛІМФОЦИТІВ В КИШКОВО-АСОЦІЙОВАНОЇ ЛІМФОЇДНОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ

У представленій главі наведені результати досліджень особливостей експресії транскрипційних регуляторів диференціювання Т-лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. Під час дослідження використовували високочутливі і високо специфічні імуногістохімічні та імунофлюоресцентні методи з використанням моно- та поліклональних антитіл, що дозволило достовірно візуалізувати імунопозитивні клітини в різних морфофункціональних зонах гістологічних зрізів КАЛТ. Вивчена особливість розподілу CD25⁺-, Foxp3⁺-, CD25⁺ Foxp3⁺-, Rorγt⁺-, CD8⁺ Rorγt⁺-, T-bet⁺- і GATA3⁺- клітин за допомогою програм AxioVision4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (NIH, США), проведено аналіз морфометричних і денситометричних характеристик імунних клітин, при цьому досліджуваними параметрами були: щільність відповідних імунопозитивних лімфоцитів на 1 мм² тканини, їх частка в структурі лімфоїдної популяції та концентрація Foxp3, Rorγt, T-bet і GATA3 в цитоплазмі і ядрі клітин.

5.1. Особливості розподілу T-bet⁺-лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

У багатьох клінічних та експериментальних дослідженнях було показано, що порушення диференціювання різних субпопуляцій Т-лімфоцитів, зокрема при розвитку ХСС, може проявлятися як неконтрольованим зростанням (експансією),

так і зниженням активності ефекторних або регуляторних субпопуляцій, і є патогенетичним фактором багатьох соціально-значущих захворювань. Згідно сучасним уявленням, ряд аутоімунних і запальних захворювань обумовлений дисбалансом Th1/Th2 і T_{reg}/Th17-клітин, який характеризується, як правило, надмірною функцією Th1-, Th2-, Th17- і зниженням активності T-регуляторної ланки імунітету [34, 79, 129, 131, 141].

При вивченні серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з АГ до транскрипційного фактора T-bet, нами встановлено, що сумарна ЩП T-bet⁺- клітин у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ становила 26±3 на 1 мм². Розвиток ХСС у експериментальних тварин супроводжувався достовірним збільшенням ЩП T-bet⁺ - клітин на 46% (p<0,05) при ХСС1 і на 92% (p <0,05) у разі ХСС2. Застосування *Кан* щурами з ХСС призводило до достовірного зростання загальної кількості T-bet⁺ - лімфоцитів (на 87%, p <0,05), тоді як пероральний прийом *Лб* тваринами супроводжувався зниженням загальної ЩП T-bet⁺ - лімфоцитів на 24% (p <0,05) при ХСС1 і на 30% (p <0,05) за умов ХСС2 (табл. 5.1).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції T-bet⁺ - клітин показав, що розвиток ХСС супроводжувався достовірним зростанням ЩП T-bet⁺ - лімфобластів (у 3,5 рази (p <0,05) при ХСС1 і у 2 рази (p <0,05) у разі ХСС2), а також T-bet⁺ - середніх лімфоцитів у 2,4 рази (p <0,05) і T-bet⁺ - малих лімфоцитів на 64 % (p <0,05) при ХСС2 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до зростання кількості T-bet⁺ - середніх лімфоцитів у 2,3 рази (p <0,05) при ХСС1, T-bet⁺ - малих лімфоцитів у 2,5 рази (p<0,05) на фоні ХСС2. Навпаки, реакція стресованих щурів на прийом *Лб* виражалась у зменшенні T-bet⁺ - лімфобластів (у 4,7 рази, p <0,05 при ХСС1), T-bet⁺ - середніх лімфоцитів (на 42% p<0,05, при ХСС2), T-bet⁺ - малих лімфоцитів (на 35%, p<0,05 при ХСС2) у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 5.1).

Таблиця 5.1.

Кількість T-bet⁺-лімфоцитів в ЗЛВ клубової кишки щурів (M± m)

Серії	T-bet ⁺ -лімфобласти	T-bet ⁺ середні лімфоцити	T-bet ⁺ малі лімфоцити	СЩ T-bet ⁺ лімфоцитів
контроль	4±1 15,7±2,5%	8±1 29,7±3,9%	14±2 54,6±6,7%	26±3
стрес 1	14±1 ¹ 36,4±3,6% ¹	9±1 23,9±2,5%	15±1 39,7±3,7%	38±3 ¹
стрес 2	8±1 ¹ 15,9±1,9%	19±2 ¹ 39,1±3,1%	23±2 ¹ 45±3,2%	50±3 ¹
стрес 1 + канаміцин	13±1 ¹ 18,8±1,5% ²	21±1 ^{1,2} 29,5±1,9%	37±3 ^{1,2} 51,7±3,7% ²	71±4 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	10±1 ¹ 21,9±2,2% ³	16±1 ¹ 36,8±3,3%	18±2 41,3±4,0%	44±2 ¹
стрес 1 + лактобактерин	3±1 ² 10,7±1,8% ²	10±1 34,6±3,4% ²	16±2 54,7±5,4% ²	29±3 ²
стрес 2 + лактобактерин	9±1 ¹ 25,3±4,0% ^{1,3}	11±1 ^{1,3} 32,7±4,3%	15±2 ³ 42,0±6,3%	35±4 ³

Примітка: у чисельнику - щільність популяції T-bet⁺-лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів T-bet⁺-лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

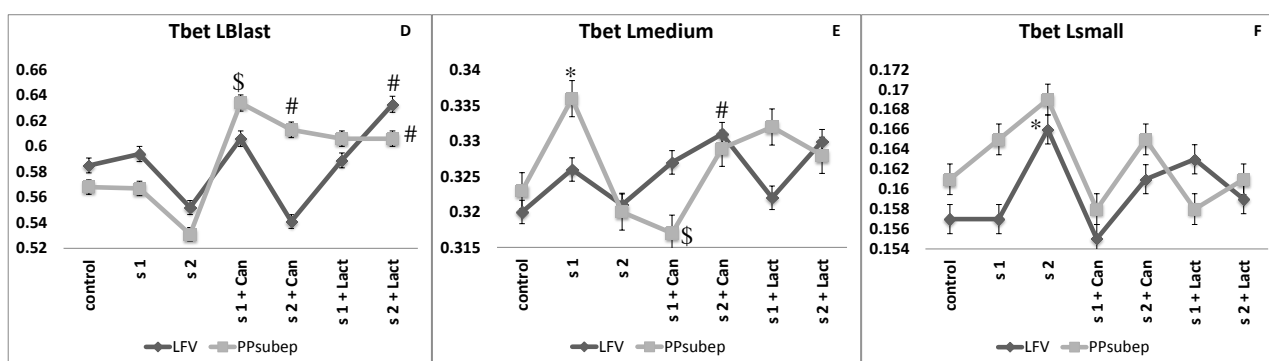


Рис. 5.1. Концентрація транскрипційного фактору T-bet в T-bet⁺-лімфоцитах у ЗЛВ (LFV) та СЗ (PP Subep).

Примітка: * - $P < 0,05$ по відношенню до контролю, \$ - $P < 0,05$ по відношенню до стресу 1 (s1), # - $P < 0,05$ по відношенню до стресу 2 (s2).

При вимірюванні інтенсивності флюоресценції T-bet⁺-клітин встановлено збільшення концентрації транскрипційного фактора T-bet лише у T-bet⁺ - малих лімфоцитів при ХСС2 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до підвищення концентрації T-bet у T-bet⁺- середніх лімфоцитів при ХСС2, такий же ефект надавав пероральний прийом *Лб* і супроводжувався збільшенням концентрації досліджуваного білку у T-bet⁺ - лімфобластів на 15% ($p < 0,05$) також за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами. В інших випадках у експериментальних тварин статистично значущої зміни концентрації T-bet в імунних клітинах у досліджуваній нами морфофункціональній зоні не спостерігалось (рис. 5.1).

5.2. Особливості розподілу T-bet⁺-лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції складу кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС у експериментальних тварин супроводжувався збільшенням загальної щільності T-bet⁺ - лімфоцитів у СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів на 39% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 57% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до достовірного підвищення ЩП T-bet⁺ - клітин на 94% ($p < 0,05$) при ХСС1, такий же ефект надавало і введення *Лб*, що призводило до зростання ЩП T-bet⁺ - клітин на 50% ($p < 0,05$) у разі ХСС1 і на 25% ($p < 0,05$) при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 5.2).

Вивчення розподілу окремих класів і структури популяції T-bet⁺ - клітин у експериментальних тварин показало, що розвиток ХСС супроводжувався достовірним зростанням ЩП T-bet⁺ - лімфобластів у 2,6 разів ($p < 0,05$) при ХСС1; T-bet⁺ - середніх лімфоцитів на 29% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 1,9 разів ($p < 0,05$) за умов ХСС2; T-bet⁺ - малих лімфоцитів на 64% ($p < 0,05$) тільки на фоні ХСС2 у порівнянні з контролем, а також змінами їх процентної частки. Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до збільшення кількості T-bet⁺ - середніх

лімфоцитів у 2,2 рази ($p < 0,05$) і T-bet⁺ - малих лімфоцитів у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, а також зменшенню кількості T-bet⁺ - малих лімфоцитів на 22% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами. Застосування Лб щурами з ХСС супроводжувалось збільшенням кількості T-bet⁺ - лімфобластів у 2,4 рази ($p < 0,05$) при ХСС2; T-bet⁺ - середніх лімфоцитів на 78% ($p < 0,05$) і T-bet⁻ малих лімфоцитів у 2,1 разів ($p < 0,05$) за умов ХСС1 (див. табл. 5.2).

Таблиця 5.2.

Кількість T-bet⁺ лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	T-bet ⁺ лімфобласти	T-bet ⁺ середні лімфоцити	T-bet ⁺ малі лімфоцити	СЩ T-bet ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{5 \pm 1}{21,4 \pm 2,4\%}$	$\frac{7 \pm 1}{28,5 \pm 2,8\%}$	$\frac{11 \pm 3}{50,1 \pm 4,5\%}$	23±2
стрес 1	$\frac{13 \pm 1^1}{40,6 \pm 3,3\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^1}{28,9 \pm 2,1\%}$	$\frac{10 \pm 3}{30,5 \pm 2,6\%^1}$	32±2 ¹
стрес 2	$\frac{5 \pm 1}{14,4 \pm 1,7\%^1}$	$\frac{13 \pm 1^1}{35,9 \pm 3,2\%}$	$\frac{18 \pm 1^1}{49,7 \pm 4,0\%}$	36±2 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{10 \pm 1^1}{16,5 \pm 1,9\%^2}$	$\frac{20 \pm 2^{1,2}}{31,5 \pm 3,0\%}$	$\frac{32 \pm 4^{1,2}}{52,0 \pm 7,1\%^2}$	62±5 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	$\frac{6 \pm 1}{19,4 \pm 2,3\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{39,3 \pm 2,5\%^1}$	$\frac{14 \pm 1^3}{41,4 \pm 3,9\%^1}$	33±2 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{11 \pm 1^1}{21,8 \pm 1,9\%^2}$	$\frac{16 \pm 1^{1,2}}{33,9 \pm 2,9\%}$	$\frac{21 \pm 2^{1,2}}{44,3 \pm 4,2\%^2}$	48±3 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{12 \pm 1^{1,3}}{27,3 \pm 1,9\%^3}$	$\frac{14 \pm 1^1}{31,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{41,5 \pm 3,2\%}$	45±2 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику - щільність популяції T-bet⁺ лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів T-bet⁺ лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналіз концентрації транскрипційного фактору T-bet в імунопозитивних клітинах показав збільшення даного параметра лише у T-bet⁺ - середніх лімфоцитів тільки при ХСС1 у порівнянні з контролем. Введення Кан щурам з ХСС призводило до підвищення концентрації T-bet у T-bet⁺ - лімфобластів на 12% ($p < 0,05$) при ХСС1

і на 15% ($p < 0,05$) за умов ХСС2, а також зниження даного параметра у $Tbet^+$ - середніх лімфоцитів при ХСС1. Після прийому *Лб* було встановлено достовірне зростання концентрації білка T-bet тільки у $Tbet^+$ - лімфобластів на 14% ($p < 0,05$) при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. рис. 5.1).

5.3. Особливості розподілу $GATA3^+$ -лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції складу кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням сумарної ЩП $GATA3^+$ - клітин у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ на 61,3% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 74,2% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин.

Таблиця 5.3.

Кількість $GATA3^+$ лімфоцитів в ЗЛВ клубової кишки щурів ($M \pm m$)

Серії	$GATA3^+$ -лімфобласти	$GATA3^+$ середні лімфоцити	$GATA3^+$ малі лімфоцити	ЩП $GATA3^+$ лімфоцитів
контроль	$\frac{4 \pm 1}{12,9 \pm 1,8\%}$	$\frac{12 \pm 1}{37,5 \pm 2,9\%}$	$\frac{15 \pm 1}{49,6 \pm 4,2\%}$	31 ± 2
стрес 1	$\frac{8 \pm 1^1}{15,3 \pm 1,9\%}$	$\frac{18 \pm 1^1}{36,7 \pm 2,3\%}$	$\frac{24 \pm 2^1}{48 \pm 4,0\%}$	50 ± 2^1
стрес 2	$\frac{5 \pm 1}{9,9 \pm 1,3\%}$	$\frac{19 \pm 1^1}{35,3 \pm 2,5\%}$	$\frac{30 \pm 2^1}{54,8 \pm 4,4\%}$	54 ± 3^1
стрес 1 + канаміцин	$\frac{4 \pm 1^2}{9,1 \pm 1,3\%^2}$	$\frac{11 \pm 1^2}{24,9 \pm 2,3\%^{1,2}}$	$\frac{30 \pm 2^{1,2}}{66,0 \pm 4,7\%^{1,2}}$	45 ± 2^1
стрес 2 + канаміцин	$\frac{16 \pm 1^{1,3}}{28,4 \pm 2,1\%^{1,3}}$	$\frac{15 \pm 1^{1,3}}{27,4 \pm 2,3\%^{1,3}}$	$\frac{25 \pm 2^1}{44,2 \pm 3,6\%}$	56 ± 3^1
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{3 \pm 1^2}{7,0 \pm 1,0\%^{1,2}}$	$\frac{9 \pm 1^{1,2}}{18,2 \pm 2,2\%^{1,2}}$	$\frac{35 \pm 2^{1,2}}{74,8 \pm 5,1\%^{1,2}}$	47 ± 3^1
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{11 \pm 1^{1,3}}{21,4 \pm 1,7\%^{1,3}}$	$\frac{18 \pm 1^1}{34,5 \pm 2,3\%}$	$\frac{24 \pm 1^{1,3}}{44,1 \pm 3,1\%}$	53 ± 2^1

Примітка: у чисельнику - щільність популяції $GATA3^+$ лімфоцитів (на 1 mm^2), у знаменнику – процентна частка окремих класів $GATA3^+$ - лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Введення *Кан* і *Лб* не впливали на загальну кількість $GATA3^+$ - лімфоцитів у досліджуваній зоні (табл. 5.3).

Вивченням розподілу окремих класів і структури популяції $GATA3^+$ - клітин ЗЛВ у експериментальних тварин встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався зростанням ЩП $GATA3^+$ - лімфобластів у 2 рази, ($p < 0,05$) при ХСС1; $GATA3^+$ - середніх лімфоцитів на 50 % ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 58,3 % ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, $GATA3^+$ - малих лімфоцитів на 60 % ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* знижувало чисельність $GATA3^+$ - лімфобластів у 2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, $GATA3^+$ - середніх лімфоцитів на 38,9% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 21% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, $GATA3^+$ - малих лімфоцитів на 17% ($p < 0,05$) за умов ХСС2; з іншого боку, призводило до значного зростання кількості $GATA3^+$ - лімфобластів - у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС2, $GATA3^+$ - малих лімфоцитів на 25% ($p < 0,05$) за умов ХСС1, впливало на процентну частку окремих класів $GATA3^+$ - лімфоцитів (див. табл. 5.3).

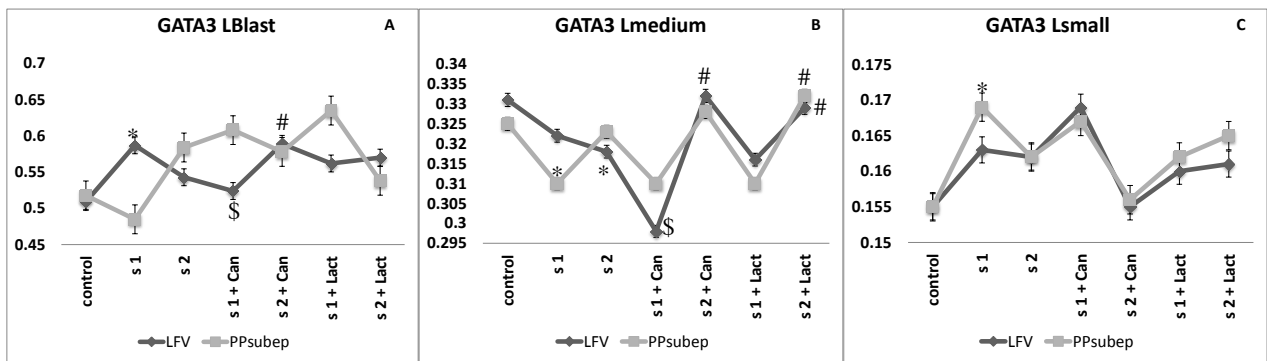


Рис. 5.2. Концентрація транскрипційного фактору $GATA3$ в $GATA3^+$ - лімфоцитах у ЗЛВ (LFV) та СЗ (PP Subep).

Примітка: * - $P < 0,05$ по відношенню до контролю, \$ - $P < 0,05$ по відношенню до стресу 1, # - $P < 0,05$ по відношенню до стресу 2.

Введення *Лб* щурам з ХСС призводило до зниження щільності $GATA3^+$ - лімфобластів у 2,7 разів ($p < 0,05$) при ХСС1; $GATA3^+$ - середніх лімфоцитів у 2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1; $GATA3^+$ - малих лімфоцитів на 20% ($p < 0,05$) за умов ХСС2; з

іншого боку, до достовірного збільшення кількості GATA3⁺ - лімфобластів у 2,2 рази (p <0,05) при ХСС2, GATA3⁺ - малих лімфоцитів на 45,8% (p <0,05) на фоні ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 5.3).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції GATA3⁺- лімфоцитів продемонструвало збільшення концентрації транскрипційного фактора GATA3 у GATA3⁺ - лімфобластів на 15% (p <0,05) при ХСС1 і зниження у GATA3⁺ - середніх лімфоцитів за умов ХСС2 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувалось зниженням концентрації досліджуваного білку у GATA3⁺ - лімфобластів на 11% (p<0,05) і у GATA3⁺ - середніх лімфоцитів на 8% (p<0,05) при ХСС1 та спостерігалось підвищення концентрації даного параметра у GATA3⁺ - лімфобластів і GATA3⁺ - середніх лімфоцитів на фоні ХСС2. Пероральний прийом *Лб* щурами з ХСС призводив до підвищення концентрації GATA3 лише у GATA3⁺ - середніх лімфоцитів при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. рис. 5.2).

5.4. Особливості розподілу GATA3⁺- лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС у експериментальних тварин супроводжувався достовірним зменшенням сумарної щільності GATA3⁺ - лімфоцитів у СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів тільки у випадку ХСС1 (на 21%, p <0,05) у порівнянні з контрольною групою. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до збільшення сумарної ЩП популяції GATA3⁺ - лімфоцитів на 42% (p <0,05) також тільки при ХСС1, тоді як введення *Лб* взагалі не впливало на цей показник (табл. 5.4).

Аналіз розподілу окремих класів і структуру популяції GATA3⁺ - клітин встановив достовірне зниження ЩП і процентної частки GATA3⁺-лімфобластів і середніх лімфоцитів за умов ХСС1 у порівнянні з контролем, а також зростання відсотка GATA3⁺-малих лімфоцитів. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до

збільшення кількості GATA3⁺ - лімфобластів у 3,1 разів (p < 0,05) при ХСС1 і на 43% (p < 0,05) на фоні ХСС2, GATA3⁺ - середніх лімфоцитів на 57% (p < 0,05) при ХСС1.

Таблиця 5.4.

Кількість GATA3⁺ лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M ± m)

Серії	GATA3 ⁺ лімфобласти	GATA3 ⁺ середні лімфоцити	GATA3 ⁺ малі лімфоцити	СЦ GATA3 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{6 \pm 1}{14,6 \pm 1,7\%}$	$\frac{15 \pm 1}{39,7 \pm 2,4\%}$	$\frac{18 \pm 1}{45,7 \pm 3,8\%}$	39 ± 2
стрес 1	$\frac{2 \pm 1^1}{6,2 \pm 1,5\%^1}$	$\frac{7 \pm 1^1}{23,1 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{22 \pm 2}{70,7 \pm 5,2\%^1}$	31 ± 2 ¹
стрес 2	$\frac{7 \pm 1}{17,1 \pm 1,7\%}$	$\frac{16 \pm 1}{38,1 \pm 2,4\%}$	$\frac{19 \pm 1}{44,8 \pm 3,4\%}$	42 ± 2
стрес 1 + канаміцин	$\frac{7 \pm 1^2}{15,4 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{11 \pm 1^{1,2}}{25,7 \pm 2,2\%^1}$	$\frac{26 \pm 2^1}{58,9 \pm 3,8\%^1}$	44 ± 3 ²
стрес 2 + канаміцин	$\frac{10 \pm 1^{1,3}}{22,0 \pm 2,0\%^1}$	$\frac{15 \pm 1}{33,2 \pm 2,5\%}$	$\frac{20 \pm 1}{44,8 \pm 3,1\%}$	45 ± 2 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{6 \pm 1^2}{17,9 \pm 2,0\%^2}$	$\frac{12 \pm 1^{1,2}}{32,6 \pm 3,4\%^2}$	$\frac{18 \pm 1}{49,5 \pm 4,2\%^2}$	36 ± 2
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{7 \pm 1}{15,7 \pm 2,0\%}$	$\frac{12 \pm 1^{1,3}}{29,6 \pm 2,8\%^{1,3}}$	$\frac{23 \pm 2^1}{54,6 \pm 4,9\%}$	42 ± 2

Примітка: у чисельнику - щільність популяції GATA3⁺ лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів GATA3⁺ лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Реакція стресованих щурів на введення Лб виражалась у збільшенні кількості GATA3⁺- лімфобластів і GATA3⁺- середніх лімфоцитів при ХСС1 і зменшенні щільності популяції GATA3⁺ - середніх лімфоцитів на 25% (p < 0,05) на фоні ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 5.4).

Аналіз змін концентрації GATA3 в імунних клітинах продемонстрував збільшення даного параметра у GATA3⁺ - лімфобластів на 13% (p < 0,05) при ХСС2, а в умовах ХСС1 – зниження концентрації білку у GATA3⁺- середніх лімфоцитів та

його підвищення у $GATA3^+$ - малих лімфоцитів на 9% ($p < 0,05$). Введення *Кан* супроводжувалось достовірним збільшенням концентрації білка $GATA3$ тільки у $GATA3^+$ - лімфобластів на 25% ($p < 0,05$) у разі ХСС1. При введенні *Лб* експериментальним тваринам було встановлено зростання концентрації $GATA3$ у $GATA3^+$ - лімфобластів на 31% ($p < 0,05$) при ХСС1. У тварин з ХСС2 виявлено підвищення даного показнику у $GATA3^+$ - середніх лімфоцитів і зниження у $GATA3^+$ - лімфобластів у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (рис. 5.2).

5.5. Особливості розподілу $Roryt^+$ - і $Roryt^+CD8^+$ - лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори.

Незважаючи на велику кількість молекул, які експресуються $Th17$ -клітинами і претендують на роль їх маркерів, найбільш надійними з них є транскрипційні фактори, пов'язані з ядерним orphan-рецептором (Retinoic acid-related orphan receptors, RORs), зокрема $Roryt$ [14, 157, 184]. Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Вістар, попередньо інкубованих з МКАТ до $Roryt$, показав, що сумарна щільність $Roryt^+$ лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ становила 82 ± 7 на 1 мм^2 . Розвиток ХСС1 супроводжувався збільшенням сумарної щільності $Roryt^+$ - лімфоцитів у 2,1 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 94 % ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до зниження ЩП $Roryt^+$ - лімфоцитів на 53 % ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 47 % ($p < 0,05$) за умов ХСС2. Таку ж дію чинило і введення *Лб* стресованим щурам, при цьому ЩП $Roryt^+$ - лімфоцитів достовірно зменшувалась на 63 % ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 38,4 % ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 (табл. 5.5).

При вивченні розподілу окремих класів і структури популяції $Roryt^+$ -лімфоцитів у експериментальних тварин лінії Вістар було встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався зростанням ЩП $Roryt^+$ - середніх лімфоцитів на 78 % ($p < 0,05$) і $Roryt^+$ - малих лімфоцитів у 2,9 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, та збільшенням

останньої групи лімфоцитів у 2,3 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин (див. табл. 5.5).

Таблиця 5.5.

Кількість $Ror\gamma^+$ лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар ($M \pm m$)

Серії	$Ror\gamma^+$ лімфобласти	$Ror\gamma^+$ середні лімфоцити	$Ror\gamma^+$ малі лімфоцити	СЦ $Ror\gamma^+$ лімфоцитів
контроль	$\frac{18 \pm 4}{22,4 \pm 5,4\%}$	$\frac{23 \pm 4}{27,8 \pm 5,4\%}$	$\frac{41 \pm 4}{49,8 \pm 5,5\%}$	82 ± 7
стрес 1	$\frac{13 \pm 2}{7,7 \pm 1,3\%}^1$	$\frac{41 \pm 7^1}{23,8 \pm 4,2\%}$	$\frac{120 \pm 14^1}{68,5 \pm 8,3\%}$	174 ± 23^1
стрес 2	$\frac{22 \pm 4}{13,7 \pm 2,8\%}$	$\frac{35 \pm 5}{21,8 \pm 3,2\%}$	$\frac{102 \pm 11^1}{64,5 \pm 7,2\%}$	159 ± 19^1
стрес 1 + канаміцин	$\frac{6 \pm 2^{1,2}}{6,9 \pm 1,9\%}$	$\frac{14 \pm 2^2}{17,0 \pm 2,5\%}$	$\frac{62 \pm 4^{1,2}}{76,1 \pm 4,7\%}^1$	82 ± 5^2
стрес 2 + канаміцин	$\frac{4 \pm 1^{1,3}}{5,1 \pm 1,4\%}^{1,3}$	$\frac{22 \pm 3^3}{26,8 \pm 3,5\%}$	$\frac{57 \pm 4^{1,3}}{68,1 \pm 4,7\%}^1$	84 ± 5^3
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{6 \pm 1^{1,2}}{9,6 \pm 2,3\%}^1$	$\frac{15 \pm 4^2}{23,3 \pm 5,5\%}$	$\frac{43 \pm 5^2}{67,1 \pm 7,6\%}$	64 ± 7^2
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{20 \pm 4}{20,7 \pm 6,1\%}$	$\frac{24 \pm 3}{24,1 \pm 4,0\%}$	$\frac{54 \pm 6^3}{55,2 \pm 10,1\%}$	98 ± 9^3

Примітка: у чисельнику - щільність популяції $Ror\gamma^+$ -лімфоцитів (на 1 мм^2), у знаменнику – процентна частка окремих класів $Ror\gamma^+$ -лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Введення *Кан* стресованим щурам з ХСС1 супроводжувалось зменшенням кількості $Ror\gamma^+$ -лімфобластів у 2 рази ($p < 0,05$), $Ror\gamma^+$ -середніх лімфоцитів в 3 рази ($p < 0,05$), $Ror\gamma^+$ -малих лімфоцитів в 2 рази ($p < 0,05$). У той же час при ХСС2 зменшення відповідних показників відбувалось у 5,5 разів ($p < 0,05$), на 37% ($p < 0,05$) і на 44% ($p < 0,05$). Введення *Лб* надавало такий же ефект на кількість і структуру популяції $Ror\gamma^+$ -лімфоцитів і знижувало число $Ror\gamma^+$ -лімфобластів у 2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, $Ror\gamma^+$ -середніх лімфоцитів у 2,7 разів ($p < 0,05$) при ХСС1, $Ror\gamma^+$ -

малих лімфоцитів в 2,8 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 47% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 5.5).

Таблиця 5.6.

Концентрація білку Ror γ t (УО_{1ф}) у лімфоцитах власної пластинки слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Вістар (M \pm m)

Серії	Ror γ t ⁺ лімфобласти	Ror γ t ⁺ середні лімфоцити	Ror γ t ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,189 \pm 0,014	0,131 \pm 0,009	0,113 \pm 0,003
стрес 1	0,566 \pm 0,027 ¹	0,306 \pm 0,004 ¹	0,148 \pm 0,002 ¹
стрес 2	0,537 \pm 0,013 ¹	0,325 \pm 0,003 ¹	0,144 \pm 0,002 ¹
стрес 1 + канаміцин	0,529 \pm 0,028 ¹	0,260 \pm 0,011 ^{1,2}	0,091 \pm 0,003 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	0,223 \pm 0,035 ³	0,143 \pm 0,009 ³	0,099 \pm 0,003 ^{1,3}
стрес 1 + лактобактерин	0,415 \pm 0,079 ¹	0,171 \pm 0,015 ^{1,2}	0,128 \pm 0,004 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	0,408 \pm 0,022 ^{1,3}	0,308 \pm 0,006 ^{1,3}	0,140 \pm 0,003 ¹

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Розвиток ХСС призводив до зростання концентрації транскрипційного фактору Ror γ t у Ror γ t⁺- лімфобластів у 3 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,8 разів ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, у Ror γ t⁺- середніх лімфоцитів у 2,3 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,5 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2, у Ror γ t⁺ малих лімфоцитів - на 31% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 27,4% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні з контролем. Модуляція складу кишкової мікрофлори супроводжувалася достовірним зниженням концентрації Ror γ t в лімфоцитах ЗЛВ (табл. 5.6).

Функції Ror γ t реалізуються також за межами субпопуляції Th17-клітин. Зокрема, значний інтерес викликають і так звані вроджені лімфоїдні клітини (ВЛК) - гетерогенна група клітин вродженої імунної системи [81, 259, 264], які диференціюються із загального лімфоїдного попередника. Група 3 ВЛК, згідно з

сучасною класифікацією, складається із LTі-клітин, ILC17, NCR22 і великої кількості інших IL-17A, IL-17F, IL-22- синтезуючих клітин, у тому числі й з ТКР гамма-дельта ($\gamma\delta$ T-лімфоцити), головною особливістю яких є експресія транскрипційного фактора Ror γ t, що обумовлює їх схожість з Th17 [81, 264, 284]. Але, на відміну від Th17-клітин, вроджені Ror γ t-клітини, як правило, не експресують маркер Т-хелперів CD4. Для виявлення саме таких клітин ми застосували метод подвійної імунофлюоресценції, що дозволило ідентифікувати клітини, ко-експресуючі Ror γ t і CD8-антигени. Враховуючи ко-експресію Ror γ t і CD8, із великою ймовірністю можна стверджувати, що частина з них це $\gamma\delta$ T - лімфоцити - мінорна МНС - нерестріктована популяція лімфоцитів, яка, на відміну від $\alpha\beta$ T-клітин, не активується пептидними антигенами, що презентуються молекулами МНСІ і МНСІІ класів, але здатна відповідати на небілкові антигени. Ще однією субпопуляцією Ror γ t - експресуючих лімфоцитів з фенотипом Ror γ t⁺CD8⁺ можуть бути так звані цитотоксичні IL-17-секретуючі лімфоцити (Tc17cell), які характеризуються інтенсивною продукцією IFN γ , більш низьким рівнем синтезу гранзимів і перфорину на відміну від “класичних” Т-кіллерів (Tc1 і Tc2), та здатні, як і Th17-клітини, виступати у ролі тригерів запальних та АІЗ [157, 249, 260].

З допомогою методу подвійної імунофлюоресценції ми виявили, що 44% Ror γ t⁺- клітин є ще й імунопозитивними по CD8, сумарна щільність таких Ror γ t⁺CD8⁺- лімфоцитів у ЗЛВ контрольних щурів становила 36 \pm 7 на 1 мм² (рис. 5.2). Розвиток як ХСС1, так і ХСС2 супроводжувався достовірним збільшенням сумарної щільності Ror γ t⁺CD8⁺- лімфоцитів (у 2,1 – 2,3 рази відповідно, p<0,05). Введення *Кан* і *Лб* експериментальним тваринам статистично значущої зміни чисельності цих клітин у досліджуваній нами морфофункціональній зоні не викликала (табл. 5.7).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції Ror γ t⁺CD8⁺- клітин встановив, що розвиток ХСС супроводжувався зростанням ЩП Ror γ t⁺CD8⁺- середніх лімфоцитів (у 2,4 рази (p <0,05) при ХСС1 і у 2,3 рази (p <0,05) у разі ХСС2) і Ror γ t⁺CD8⁺- малих лімфоцитів (у 2,1 разів (p <0,05) при ХСС1 і у 2,6 разів (p <0,05) на фоні ХСС2) у порівнянні з контролем при стабільності їх відсоткової долі в

структурі популяції (див. табл. 5.7). У всіх інших варіаціях статистично достовірних змін у структурі популяції лімфоцитів нами виявлено не було.

Таблиця 5.7.

Кількість CD8⁺Roryt⁺ лімфоцитів у ЗЛВ клубової кишки щурів (M± m)

Серії	CD8 ⁺ Roryt ⁺ лімфобласти	CD8 ⁺ Roryt ⁺ середні лімфоцити	CD8 ⁺ Roryt ⁺ малі лімфоцити	ЩП CD8 ⁺ Roryt ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{13 \pm 3}{35,6 \pm 8,2\%}$	$\frac{9 \pm 2}{26,1 \pm 5,5\%}$	$\frac{14 \pm 2}{38,3 \pm 7,2\%}$	36±7
стрес 1	$\frac{25 \pm 7}{31,9 \pm 9,0\%}$	$\frac{22 \pm 6}{28,9 \pm 7,3\%}$	$\frac{30 \pm 7}{39,2 \pm 8,9\%}$	77±19 ¹
стрес 2	$\frac{25 \pm 6}{30,2 \pm 7,1\%}$	$\frac{21 \pm 5}{25,6 \pm 6,1\%}$	$\frac{37 \pm 9}{44,1 \pm 10,7\%}$	83±19 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{12 \pm 2}{21,1 \pm 3,3\%}$	$\frac{16 \pm 2}{27,5 \pm 3,6\%}$	$\frac{30 \pm 4^1}{51,4 \pm 6,7\%}$	57±7 ¹
стрес 2 + канаміцин	$\frac{23 \pm 3}{31,9 \pm 4,8\%}$	$\frac{18 \pm 2^1}{25,1 \pm 3,0\%}$	$\frac{30 \pm 4^1}{43,0 \pm 5,3\%}$	71±8 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{17 \pm 3}{29,8 \pm 5,9\%}$	$\frac{16 \pm 3}{28,4 \pm 5,1\%}$	$\frac{23 \pm 4}{41,8 \pm 7,0\%}$	56±9
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{28 \pm 3^1}{30,9 \pm 5,4\%}$	$\frac{27 \pm 2^{1,3}}{30,4 \pm 4,3\%}$	$\frac{35 \pm 3^1}{38,7 \pm 5,0\%}$	89±6 ¹

Примітка: у чисельнику - щільність популяції CD8⁺Roryt⁺- лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів CD8⁺Roryt⁺- лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

5.6. Особливості розподілу Roryt⁺ - лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням кількості Roryt⁺- лімфоцитів у СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у 2,3 рази ($p < 0,05$) лише за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення Кан щурам з ХСС не супроводжувалось достовірною зміною сумарної ЩП Roryt⁺- лімфоцитів при ХСС1,

однак, призводило до зниження у 2,1 рази ($p < 0,05$) у разі ХСС2. Введення *Лб* експериментальним тваринам супроводжувалось зменшенням ЩП Roryt^+ - клітин на 28% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 3,1 разів ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (табл. 5.8).

В процесі вивчення розподілу окремих класів і структури популяції Roryt^+ - клітин у експериментальних тварин було показано, що розвиток ХСС супроводжувався зростанням ЩП Roryt^+ - лімфобластів на 83% ($p < 0,05$), Roryt^+ - середніх лімфоцитів на 38% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,4 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, Roryt^+ - малих лімфоцитів у 2,4 рази ($p < 0,05$) тільки за умов ХСС2 у порівнянні з контролем (див. табл. 5.8). Введення *Кан* експериментальним тваринам знижувало кількість Roryt^+ - лімфобластів на 36%, Roryt^+ - середніх лімфоцитів у 2,1 рази ($p < 0,05$) і Roryt^+ - малих лімфоцитів у 2,3 рази ($p < 0,05$) тільки у випадку ХСС2.

Таблиця 5.8.

Кількість Roryt^+ - клітин в СЗ ($M \pm m$).

Серії	Roryt^+ -лімфобласти	Roryt^+ -середні лімфоцити	Roryt^+ -мали лімфоцити	ЩП Roryt^+ -клітин
контроль	$\frac{6 \pm 1}{19,4 \pm 2,7\%}$	$\frac{8 \pm 1}{23,5 \pm 3,1\%}$	$\frac{19 \pm 3}{57,1 \pm 8,9\%}$	33 ± 2
стрес 1	$\frac{11 \pm 1^1}{25,2 \pm 2,4\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{25,1 \pm 2,4\%}$	$\frac{21 \pm 2}{49,7 \pm 5,2\%}$	43 ± 3
стрес 2	$\frac{11 \pm 1^1}{14,3 \pm 1,7\%}$	$\frac{19 \pm 1^1}{25,3 \pm 1,6\%}$	$\frac{45 \pm 3^1}{60,4 \pm 4,5\%}$	75 ± 5^1
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{9 \pm 1}{21,1 \pm 2,9\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{29,5 \pm 3,3\%}$	$\frac{21 \pm 2}{49,4 \pm 4,9\%}$	43 ± 4
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{7 \pm 1^3}{18,6 \pm 2,2\%}$	$\frac{9 \pm 1^3}{24,4 \pm 2,2\%}$	$\frac{20 \pm 2^3}{57,0 \pm 4,8\%}$	35 ± 2^3
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{8 \pm 1^2}{24,1 \pm 2,4\%}$	$\frac{9 \pm 1}{29,1 \pm 3,3\%}$	$\frac{15 \pm 2^2}{46,8 \pm 5,2\%}$	31 ± 3^2
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{2 \pm 0^{1,3}}{8,2 \pm 1,1\%^{1}}$	$\frac{6 \pm 1^3}{25,7 \pm 2,0\%}$	$\frac{16 \pm 1^3}{66,1 \pm 4,3\%}$	24 ± 2^3

Примітка: у чисельнику - щільність популяції Roryt^+ - клітин (на 1 мм^2), у знаменнику – процентна частка; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналогічний ефект спостерігався і при введенні *Лб* щурам з ХСС і супроводжувався зниженням кількості $\text{Ror}\gamma^+$ - лімфобластів на 27,3% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 5,5 разів ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, $\text{Ror}\gamma^+$ - середніх лімфоцитів у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС2, $\text{Ror}\gamma^+$ - малих лімфоцитів на 29% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,8 разів ($p < 0,05$) у разі ХСС2 порівняно зі стресованими тваринами (див. табл. 5.8).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції $\text{Ror}\gamma^+$ - клітин показало достовірне зниження даного параметра у $\text{Ror}\gamma^+$ - лімфобластів на 18% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 26% на фоні ХСС2, у $\text{Ror}\gamma^+$ - середніх і малих лімфоцитів у тварин з ХСС2 (табл. 5.9).

Таблиця 5.9.

Концентрація білку $\text{Ror}\gamma$ ($\text{УО}_{\text{I}\omega}$) в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар ($\text{M} \pm \text{m}$)

Серії	$\text{Ror}\gamma^+$ -лімфобласти	$\text{Ror}\gamma^+$ -середні лімфоцити	$\text{Ror}\gamma^+$ - малі лімфоцити
контроль	0,754±0,035	0,330±0,003	0,143±0,002
стрес 1	0,615±0,025 ¹	0,329±0,004	0,147±0,003
стрес 2	0,559±0,015 ¹	0,318±0,003 ¹	0,152±0,002 ¹
стрес 1 + канаміцин	0,689±0,034	0,330±0,004	0,160±0,003 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	0,650±0,031 ^{1,3}	0,325±0,004	0,143±0,003 ³
стрес 1 + лактобактерин	0,678±0,033	0,327±0,004	0,145±0,003
стрес 2 + лактобактерин	0,692±0,046 ³	0,322±0,004	0,152±0,003 ¹

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

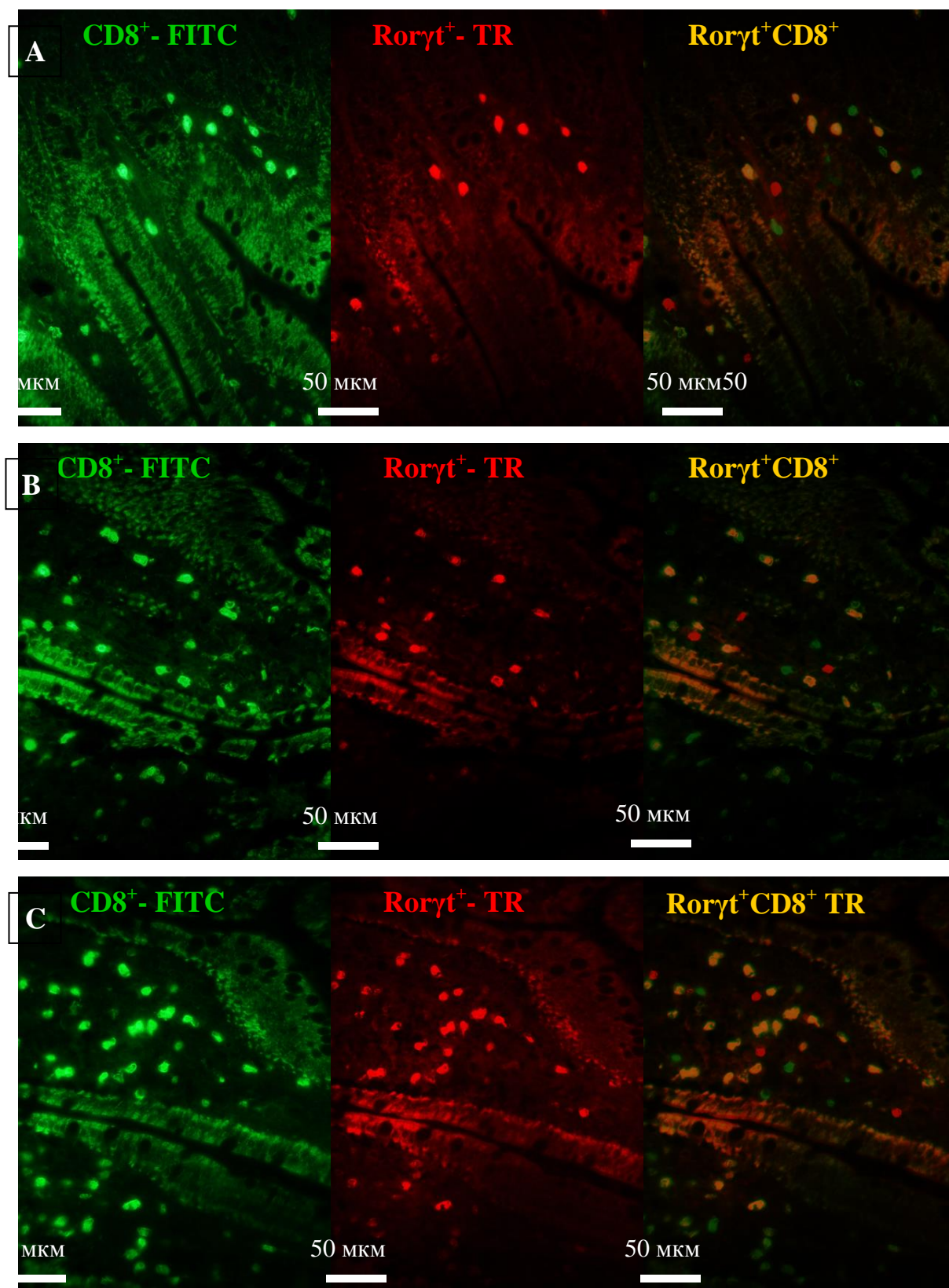


Рис. 5.2. Roryt⁺CD8⁺- клітини в LFV (ЗЛВ) шурів лінії Вістар. Реакція подвійної імунофлюоресценції: Roryt⁺ - Texas Red, CD8⁺ - FITC (A - контроль; B - XCC1; C - XCC2).

Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до підвищення концентрації Rorγt-білку у Rorγt⁺ лімфобластів на 16% (p <0,05) при ХСС2, Rorγt⁺ - малих лімфоцитів на 9% (p <0,05) при ХСС1 і зниження даного параметра у Rorγt⁺ - малих лімфоцитів на 6% (p <0,05) у разі ХСС2, тоді як пероральний прийом *Лб* супроводжувався збільшенням концентрації досліджуваного білку у Rorγt⁺ - лімфобластів на 24% (p<0,05) тільки за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 5.9).

5.7. Особливості розподілу CD25⁺- лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Важливу роль у забезпеченні імунологічної толерантності та протидії патологічним імунним і запальним реакціям в кишківнику відіграють супресорні T-регуляторні клітини (T_{reg}) [16, 20, 41, 178, 188, 243, 280]. Одним з перших відкритих і найбільш відомим маркером T_{reg} є CD25 (α-ланцюг рецептора ІЛ-2, ІЛ-2Rα), тому на наступному етапі нашого дослідження були вивчені особливості розподілу CD25⁺- клітин в КАЛТ щурів. Нами встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням ЩП CD25⁺ лімфоцитів у 2,1 рази (p <0,05) при ХСС1 і на 44% (p <0,05) у разі ХСС2 у порівнянні с контрольною групою щурів. У той же час, введення *Кан* тваринам з ХСС призводило до достовірного збільшення загальної кількості CD25⁺ лімфоцитів на 63% (p <0,05) тільки у випадку ХСС1 у порівнянні зі стресованими щурами. Також відзначалася динаміка до збільшення загальної ЩП CD25⁺ лімфоцитів (на 93%, p <0,05 при ХСС1 і на 40%, p <0,05 на фоні ХСС2) і при введенні *Лб* експериментальним тваринам (табл. 5.10).

Вивченням розподілу окремих класів і структури популяції CD25⁺- лімфоцитів у експериментальних тварин доведено, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням ЩП CD25⁺ лімфобластів (у 3 рази, p <0,05, при ХСС1 і на 41%, p <0,05, у випадку ХСС2), CD25⁺ середніх лімфоцитів (на 29%, p <0,05 тільки при ХСС1),

CD25⁺ малих лімфоцитів (у 2,2 рази, $p < 0,05$, при ХСС1 і у 2 рази, $p < 0,05$, на фоні ХСС2).

Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до зростання кількості CD25⁺- лімфобластів у 3,5 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, CD25⁺ малих лімфоцитів - на 52% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 43% ($p < 0,05$) за умов ХСС2.

Таблиця 5.10.

Кількість CD25⁺ лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар (M ± m)

Серії	CD25 ⁺ лімфобласти	CD25 ⁺ середні лімфоцити	CD25 ⁺ малі лімфоцити	СЦ CD25 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{39 \pm 5}{19,3 \pm 2,3\%}$	$\frac{41 \pm 5}{20,5 \pm 2,5\%}$	$\frac{122 \pm 9}{60,2 \pm 4,4\%}$	202 ± 14
стрес 1	$\frac{13 \pm 2^1}{13,5 \pm 2,0\%}$	$\frac{29 \pm 2^1}{30,3 \pm 2,2\%^1}$	$\frac{54 \pm 3^1}{56,2 \pm 3,1\%}$	96 ± 4 ¹
стрес 2	$\frac{23 \pm 2^1}{20,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{31 \pm 2}{26,9 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{60 \pm 3^1}{53,0 \pm 3,1\%}$	114 ± 5 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{46 \pm 4^2}{29,3 \pm 2,5\%^{1,2}}$	$\frac{28 \pm 2^1}{17,8 \pm 1,4\%^2}$	$\frac{82 \pm 5^{1,2}}{52,8 \pm 3,5\%}$	156 ± 7 ^{1,2}
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{24 \pm 3^1}{17,8 \pm 2,4\%}$	$\frac{26 \pm 3^1}{19,1 \pm 2,1\%^3}$	$\frac{86 \pm 8^{1,3}}{63,0 \pm 6,0\%}$	137 ± 11 ¹
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{30 \pm 4^2}{16,5 \pm 2,3\%}$	$\frac{36 \pm 4}{19,7 \pm 2,1\%^2}$	$\frac{118 \pm 9^2}{63,8 \pm 5,0\%}$	185 ± 15 ²
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{27 \pm 4}{17,1 \pm 2,3\%}$	$\frac{27 \pm 3^1}{17,0 \pm 1,7\%^{1,3}}$	$\frac{105 \pm 8^3}{65,9 \pm 4,4\%^{1,3}}$	160 ± 12 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику - щільність популяції CD25⁺ - лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів CD25⁺ - лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Той же самий ефект спостерігався і при прийомі *Лб* щурами з ХСС і супроводжувався збільшенням кількості CD25⁺ - лімфобластів у 2,3 рази ($p < 0,05$) тільки при ХСС1, CD25⁺ - малих лімфоцитів - у 2,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 75% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами. Це

супроводжувалось також змінами процентної частки окремих класів CD25⁺ лімфоцитів (див. табл. 5.10).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції CD25⁺ - лімфоцитів, що відбиває щільність CD25-рецепторів у CD25⁺ - лімфоцитів на клітинній мембрані показало вірогідне зростання даного параметру у CD25⁺ - лімфобластів тільки у випадку ХСС1, у CD25⁺ - малих лімфоцитів при ХСС1 і у разі ХСС2 у порівнянні з контролем (табл. 5.11).

Таблиця 5.11.

Щільність CD-рецепторів (УО₁₀) CD25⁺ - лімфоцитів у ЗЛВ клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	CD25 ⁺ лімфобласти	CD25 ⁺ середні лімфоцити	CD25 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,528±0,007	0,326±0,002	0,141±0,002
стрес 1	0,587±0,021 ¹	0,327±0,003	0,149±0,002 ¹
стрес 2	0,541±0,011	0,321±0,003	0,150±0,002 ¹
стрес 1 + канаміцин	0,595±0,009 ¹	0,327±0,003	0,139±0,002 ²
стрес 2 + канаміцин	0,581±0,013 ^{1,3}	0,325±0,003	0,136±0,002 ³
стрес 1 + лактобактерин	0,538±0,008 ²	0,327±0,002	0,136±0,001 ^{1,2}
стрес 2 + лактобактерин	0,598±0,014 ^{1,3}	0,326±0,003	0,135±0,002 ^{1,3}

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

При введенні *Кан* експериментальним тваринам спостерігалось зниження щільності CD25 - рецепторів у CD25⁺ - малих лімфоцитів при ХСС1 і ХСС2 та достовірне збільшення даного параметру у CD25⁺ - лімфобластів при ХСС2. Таку ж дію виявило введення *Лб*, що супроводжувалось достовірним зниженням щільності CD25-рецепторів у CD25⁺ - малих лімфоцитів на 9% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 10% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, у CD25⁺ - лімфобластів на 8% ($p < 0,05$) при ХСС1 і статистично значущим підвищенням досліджуваного параметра у CD25⁺-

лімфобластів на 11% ($p < 0,05$) при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 5.11).

5.8. Особливості розподілу Foxp3⁺- і CD25⁺Foxp3⁺- лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

CD25 тривалий час вважався одним з характерних маркерів T_{reg}, однак він експресується і на будь-яких інших Т-клітинах після їх активації. У 2003 р. був описаний ген, локалізований у хромосомі X, Foxp3 (fork head box P3). Продукт гену *FOXP3*, транскрипційний фактор Foxp3 (білок скурфін) у даний час вважається одним з найбільш специфічних внутрішньоклітинних маркерів для T_{reg}-клітин. Експериментальна трансдукція Foxp3 в нерегуляторні Foxp3⁻CD25⁻CD4 “наївні” Т-клітини людини або мишей присвоює останнім функціональні властивості та фенотип T_{reg}, а за відсутністю функціонального Foxp3 регуляторні Т-клітини не продукуються, і такі миші гинуть впродовж перших 3 тижнів життя від важких лімфопроліферативних порушень.

Вивчення серійних зрізів клубової кишки щурів лінії Вістар, попередньо інкубованих з АТ до антигену Foxp3⁺, надало нам можливість встановити, що розвиток ХСС супроводжувався зменшенням у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ ЩП популяції Foxp3⁺ лімфоцитів на 49% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 44% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до достовірного збільшення загальної СЩ Foxp3⁺- лімфоцитів на 38% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 43% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2. Пероральний прийом *Лб* також супроводжувався збільшенням кількості Foxp3⁺ лімфоцитів на 84% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 50% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами.

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції Foxp3⁺ - лімфоцитів у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС призводив до зниження ЩП Foxp3⁺ - лімфобластів (у 2,3 рази, $p < 0,05$) тільки у випадку ХСС1, Foxp3⁺ - середніх лімфоцитів (у 2,1 рази, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 41 %, $p < 0,05$ на фоні ХСС2), Foxp3⁺

малих лімфоцитів (на 47%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 49%, $p < 0,05$ у випадку ХСС2) у порівнянні з контролем (табл. 5.12).

Таблиця 5.12.

Кількість Foxp3^+ лімфоцитів у ЗЛВ клубової кишки щурів ($M \pm m$)

Серії	Foxp3^+ лімфобласти	Foxp3^+ середні лімфоцити	Foxp3^+ малі лімфоцити	Сумарна щільність Foxp3^+ лімфоцитів
контроль	$\frac{16 \pm 2}{11,0 \pm 1,4\%}$	$\frac{39 \pm 3}{27,1 \pm 2,2\%}$	$\frac{88 \pm 7}{61,9 \pm 4,6\%}$	143 ± 9
стрес 1	$\frac{7 \pm 1^1}{9,3 \pm 1,2\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{25,6 \pm 3,1\%}$	$\frac{47 \pm 3^1}{64,1 \pm 4,9\%}$	73 ± 5^1
стрес 2	$\frac{12 \pm 2}{15,4 \pm 2,0\%}$	$\frac{23 \pm 2^1}{29,2 \pm 2,8\%}$	$\frac{44 \pm 3^1}{55,4 \pm 3,9\%}$	80 ± 4^1
стрес 1 + канаміцин	$\frac{21 \pm 3^2}{21,4 \pm 2,7\%^{1,2}}$	$\frac{27 \pm 2^{1,2}}{27,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{52 \pm 5^1}{51,7 \pm 4,5\%}$	$101 \pm 7^{1,2}$
стрес 2 + канаміцин	$\frac{15 \pm 2}{13,3 \pm 2,1\%}$	$\frac{23 \pm 2^1}{19,9 \pm 2,2\%^{1,3}}$	$\frac{76 \pm 10^3}{66,7 \pm 8,9\%}$	114 ± 13^3
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{18 \pm 2^2}{13,4 \pm 1,6\%^2}$	$\frac{30 \pm 3^2}{22,6 \pm 2,1\%}$	$\frac{86 \pm 7^2}{64,0 \pm 5,3\%}$	134 ± 10^2
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{17 \pm 3}{14,4 \pm 2,1\%}$	$\frac{23 \pm 3^1}{19,3 \pm 2,0\%^{1,3}}$	$\frac{79 \pm 6^3}{66,3 \pm 4,7\%}$	120 ± 10^3

Примітка: у чисельнику - щільність популяції Foxp3^+ - лімфоцитів (на 1 мм^2), у знаменнику – процентна частка окремих класів Foxp3^+ - лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Введення *Кан* щурам з ХСС супроводжувалось зростанням кількості Foxp3^+ лімфобластів у 3 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС1, Foxp3^+ - середніх лімфоцитів на 42% ($p < 0,05$) при ХСС1 і Foxp3^+ - малих лімфоцитів на 69% ($p < 0,05$) тільки у випадку ХСС2. Таку ж дію виявило і введення *Лб* – кількість Foxp3^+ - лімфоцитів зростає: Foxp3^+ - лімфобластів у 2,6 разів ($p < 0,05$) і Foxp3^+ - середніх лімфоцитів на 58% ($p < 0,05$) при ХСС1, Foxp3^+ - малих лімфоцитів на 83% ($p < 0,05$) у випадку ХСС1 і на 50%, $p < 0,05$ при ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 5.12).

Таблиця 5.13.

Концентрація білку Foxp3 (УО_{1Ф}) в ЗЛВ слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m).

Серії	Foxp3 ⁺ лімфобласти	Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ малі лімфоцити
контроль	0,533±0,012	0,322±0,002	0,141±0,002
стрес 1	0,467±0,038	0,224±0,010 ¹	0,129±0,003 ¹
стрес 2	0,460±0,033 ¹	0,238±0,009 ¹	0,131±0,003 ¹
стрес 1 + канаміцин	0,522±0,013	0,326±0,003 ²	0,144±0,003 ²
стрес 2 + канаміцин	0,557±0,015 ³	0,322±0,003 ³	0,139±0,002 ³
стрес 1 + лактобактерин	0,555±0,013 ²	0,326±0,003 ²	0,138±0,002 ²
стрес 2 + лактобактерин	0,599±0,020 ^{1,3}	0,325±0,003 ³	0,133±0,002 ¹

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Вивчення інтенсивності флюоресценції Foxp3⁺ - лімфоцитів встановило достовірне зниження концентрації Foxp3 у Foxp3⁺ - лімфобластів на 14% ($p < 0,05$) при ХСС2, у Foxp3⁺ - середніх лімфоцитів на 30% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 26% ($p < 0,05$) у разі ХСС2, у Foxp3⁺ - малих лімфоцитів на 9% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 7% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувалось зростанням концентрації білку у Foxp3⁺ - лімфобластів на 21% ($p < 0,05$) при ХСС2, у Foxp3⁺ - середніх лімфоцитів на 46% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 35% ($p < 0,05$) за умов ХСС2, у Foxp3⁺ - малих лімфоцитів на 12% ($p < 0,05$) на фоні ХСС1 і на 6% ($p < 0,05$) при ХСС2. Також при введенні *Лб* щурам, підданих дії стресу, спостерігалась тенденція до зростання концентрації білку Foxp3 у Foxp3⁺ - лімфобластів (на 19%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 30%, $p < 0,05$ за умов ХСС2), у Foxp3⁺ - середніх лімфоцитів (на 46%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 37 %, $p < 0,05$ на фоні ХСС2), Foxp3⁺ - малих лімфоцитів (на 7%, $p < 0,05$ тільки при ХСС1) у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 5.13).

Використання методу подвійної імуофлюоресценції для виявлення клітин ко-експресуючих CD25 і Foxp3 показало, що ЩП CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ складала 114±8 на 1 мм² (табл. 5.14, рис. 5.3). При розвитку ХСС спостерігалось зниження ЩП CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів, більш вираженою у випадку ХСС2 (на 51%, $p < 0,05$). Пероральний прийом *Кан* не впливав на загальну кількість CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів, а введення *Лб* призводило до підвищення ЩП CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів на 33% (ХСС1) – 66% (ХСС2) ($p < 0,05$) у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 5.14).

Таблиця 5.14.

Кількість CD25⁺Foxp3⁺ лімфоцитів у ЗЛВ клубової кишки щурів (M± m)

Серії	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ лімфобласти	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ середні лімфоцити	CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна ЩП CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{19 \pm 3}{16,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{38 \pm 4}{33,5 \pm 3,4\%}$	$\frac{57 \pm 4}{49,7 \pm 3,7\%}$	114±8
стрес 1	$\frac{16 \pm 2}{22,4 \pm 2,3\%}$	$\frac{21 \pm 2^1}{28,5 \pm 2,8\%}$	$\frac{36 \pm 3^1}{49,1 \pm 4,2\%}$	72±5 ¹
стрес 2	$\frac{15 \pm 2}{27,3 \pm 3,5\%}^1$	$\frac{18 \pm 2^1}{31,9 \pm 3,0\%}$	$\frac{23 \pm 3^1}{40,8 \pm 4,8\%}$	56±4 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{20 \pm 3}{25,4 \pm 3,8\%}$	$\frac{24 \pm 3^1}{31,0 \pm 3,5\%}$	$\frac{34 \pm 4^1}{43,5 \pm 4,8\%}$	78±8 ¹
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{18 \pm 2}{30,0 \pm 4,0\%}^1$	$\frac{16 \pm 2^1}{27,8 \pm 4,0\%}$	$\frac{25 \pm 3^1}{42,2 \pm 5,1\%}$	59±6 ¹
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{22 \pm 3}{23,1 \pm 3,3\%}$	$\frac{27 \pm 3^1}{28,1 \pm 3,0\%}$	$\frac{47 \pm 4^2}{48,7 \pm 3,7\%}$	97±7 ²
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{20 \pm 3}{21,8 \pm 3,0\%}$	$\frac{31 \pm 3^3}{33,1 \pm 3,4\%}$	$\frac{42 \pm 3^{1,3}}{45,1 \pm 3,2\%}$	93±7 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику – ЩП CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику - процентна частка CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів; достовірність відзнак параметрів $p < 0,05$ відносно контролю (1), стресу 1 (2), стресу 2 (3).

Згідно аналізу розподілу окремих класів і структури популяції клітин, що ко-експресують CD25 і Foxp3, нами було встановлено, що розвиток ХСС призводив до зниження ЩП CD25⁺Foxp3⁺-середніх лімфоцитів на 45% (ХСС1) – 53% (ХСС2)

($p < 0,05$), $CD25^+Foxp3^+$ - малих лімфоцитів на 37% (ХСС1) – 60% (ХСС2) ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем при відносній стабільності їх процентної долі в структурі популяції. Введення *Кан* стресованим щурам не впливало на загальну кількість $CD25^+Foxp3^+$ - лімфоцитів і структуру їх популяції, тоді як, введення *Лб* відзначалось достовірним збільшенням ЩП $CD25^+Foxp3^+$ -середніх лімфоцитів на 29% (ХСС1) – 72% (ХСС2) ($p < 0,05$), $CD25^+Foxp3^+$ -малих лімфоцитів на 31% (ХСС1) – 83% (ХСС2) ($p < 0,05$) у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 5.14).

5.9. Особливості розподілу $Foxp3^+$ - лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори.

Розвиток ХСС супроводжувався зменшенням ЩП $Foxp3^+$ - лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів на 20% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 39 % ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* щурам з ХСС не супроводжувалось достовірною зміною ЩП $Foxp3^+$ - лімфоцитів, тоді як введення *Лб* призводило до достовірного зростання ЩП $Foxp3^+$ - клітин на 84% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 5.15).

Вивченням розподілу окремих класів і структури популяції $Foxp3^+$ - лімфоцитів у експериментальних тварин встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням ЩП $Foxp3^+$ - середніх лімфоцитів (на 29 %, $p < 0,05$ при ХСС1 і у 2,3 рази, $p < 0,05$ на фоні ХСС2), $Foxp3^+$ - малих лімфоцитів (на 31%, $p < 0,05$) тільки у випадку ХСС2 у порівнянні з контролем.

Введення *Кан* стресованим щурам не впливало на загальну кількість $Foxp3^+$ - лімфоцитів і структуру їх популяції, тоді як, прийом *Лб* відзначався збільшенням ЩП $Foxp3^+$ - малих лімфоцитів на 48% (ХСС1) – 73% (ХСС2) ($p < 0,05$) у порівнянні зі стресованими тваринами, яким вводили фізіологічний розчин (див. табл. 5.15).

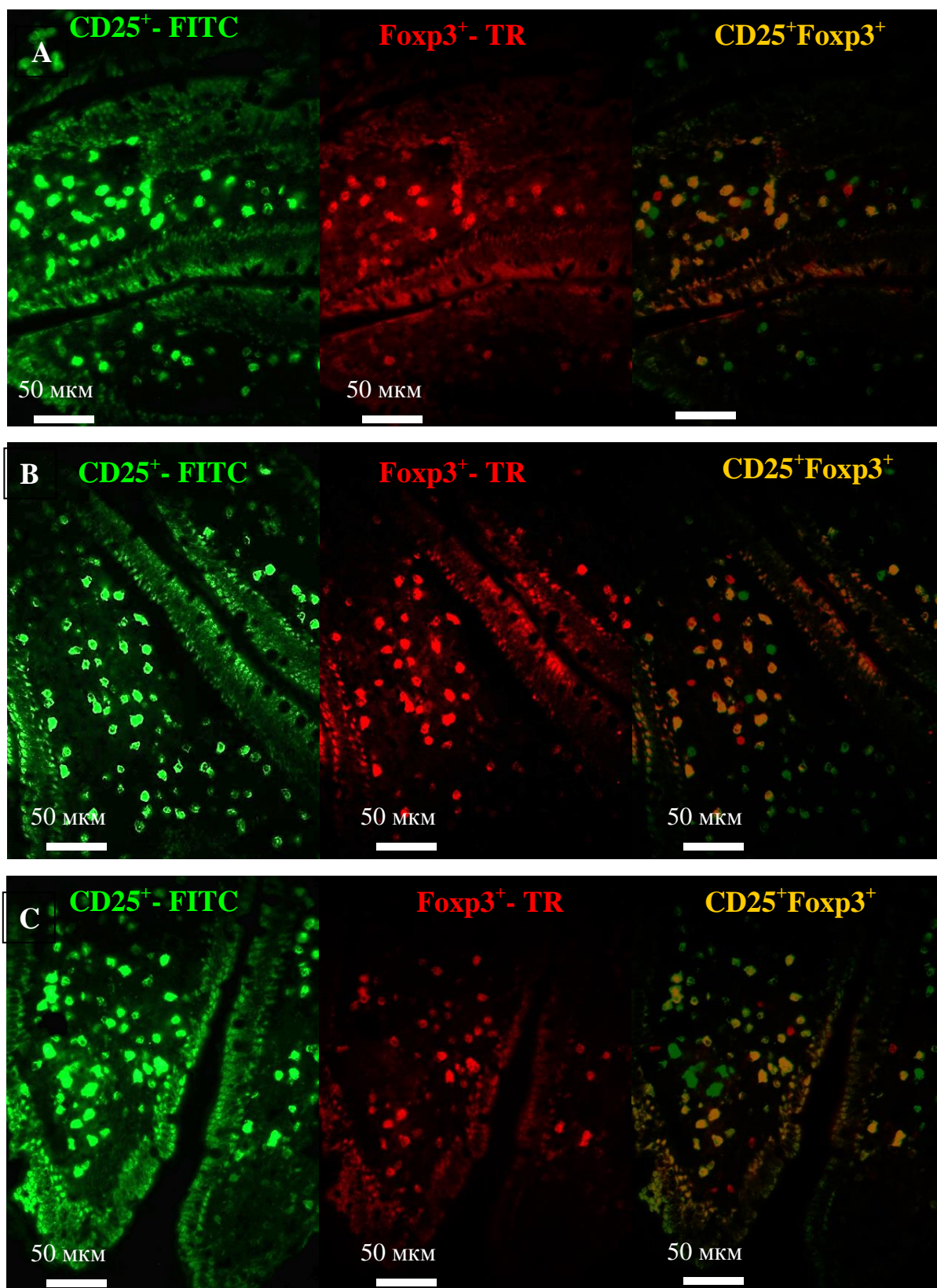


Рис. 5.3. CD25⁺Foxp3⁺ - клітини в LFV (ЗЛВ) щурів лінії Вістар. Реакція подвійної імунофлюоресценції: CD25⁺ - FITC, Foxp3⁺ - Texas Red (A - контроль; B - XCC1; C - XCC2).

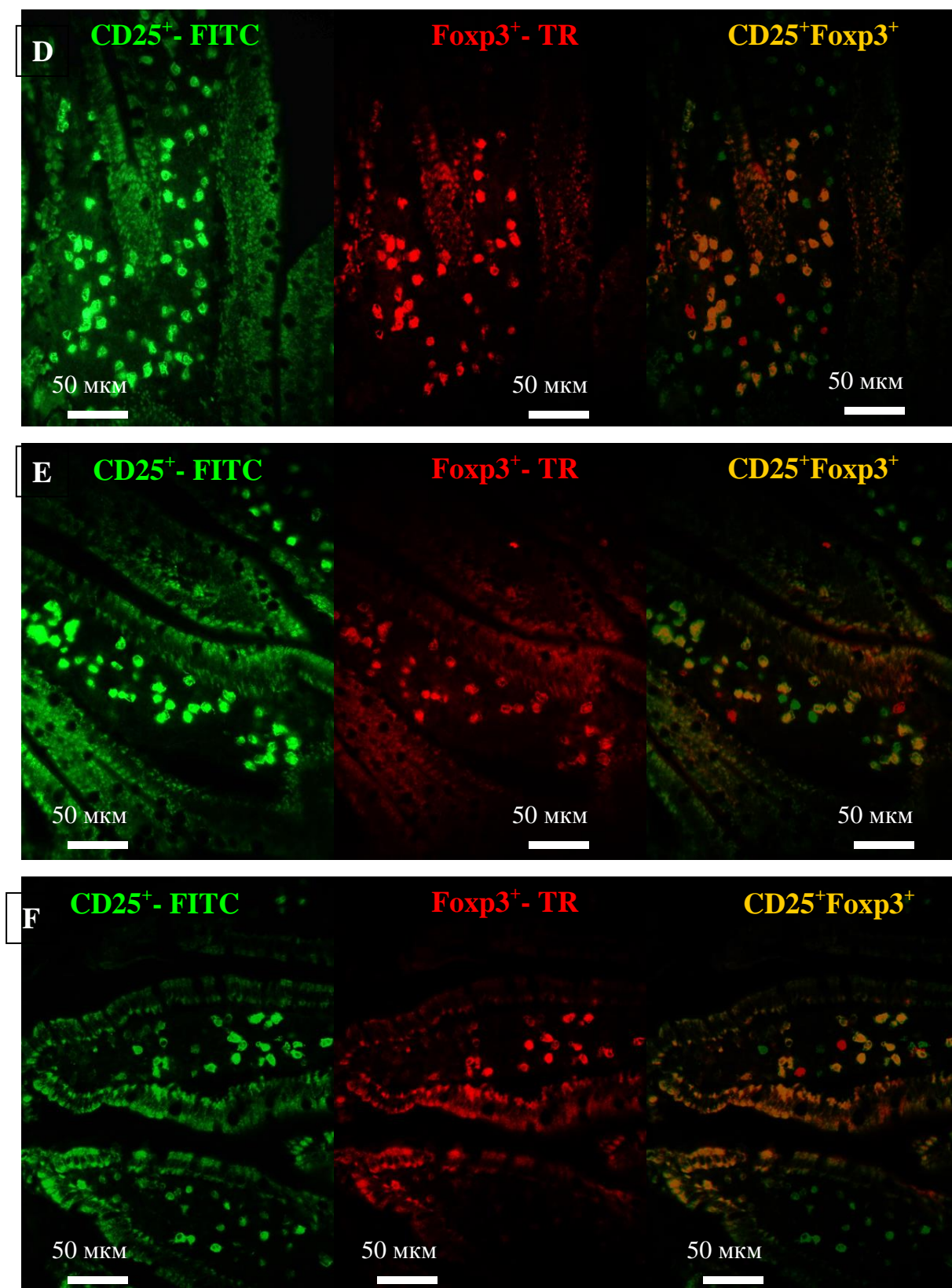


Рис. 5.3 (продовження). CD25⁺Foxp3⁺ - клітини в LFV (ЗЛВ) шурів лінії Вістар. Реакція подвійної імунофлюоресценції: CD25⁺ - FITC, Foxp3⁺ - Texas Red (D - XCC1 + Лб; E - XCC1+ Кан; F - XCC2 + Кан).

Таблиця 5.15.

Кількість Foxp3⁺- клітин в СЗ клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m).

Серії	Foxp3 ⁺ - лімфобласти	Foxp3 ⁺ - середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ - малі лімфоцити	СЩ Foxp3 ⁺ - клітин
контроль	$\frac{5 \pm 1}{9,0 \pm 1,5\%}$	$\frac{14 \pm 1}{27,5 \pm 2,4\%}$	$\frac{32 \pm 3}{63,5 \pm 4,9\%}$	51±3
стрес 1	$\frac{4 \pm 1}{9,5 \pm 1,6\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{25,0 \pm 2,0\%}$	$\frac{27 \pm 2}{65,5 \pm 4,4\%}$	41±2 ¹
стрес 2	$\frac{3 \pm 1}{10,9 \pm 2,3\%}$	$\frac{6 \pm 1^1}{19,2 \pm 4,3\%}$	$\frac{22 \pm 3^1}{69,9 \pm 9,5\%}$	31±4 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{3 \pm 1}{9,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{24,8 \pm 2,7\%}$	$\frac{23 \pm 2^1}{66,2 \pm 6,2\%}$	35±3 ¹
стрес 2 + канаміцин	$\frac{2 \pm 0^1}{8,3 \pm 1,5\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{27,4 \pm 3,4\%}$	$\frac{15 \pm 2^1}{64,3 \pm 7,3\%}$	24±3 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{3 \pm 1^1}{5,2 \pm 1,1\%^{1,2}}$	$\frac{9 \pm 1^1}{17,0 \pm 2,0\%^{1,2}}$	$\frac{40 \pm 3^2}{77,8 \pm 6,3\%}$	52±4
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{5 \pm 1}{9,5 \pm 1,9\%}$	$\frac{14 \pm 1^3}{24,8 \pm 2,0\%}$	$\frac{38 \pm 3^3}{65,7 \pm 5,4\%}$	57±4 ³

Примітка: у чисельнику - щільність популяції Foxp3⁺ - клітин (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів Foxp3⁺ - клітин; достовірність відмінностей параметрів p<0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

При вивченні інтенсивності флюоресценції Foxp3⁺ - лімфоцитів було показано достовірне зниження концентрації Foxp3 у Foxp3⁺- лімфобластів на 56 % (p <0,05) при ХСС1 і на 37% (p <0,05) у випадку ХСС2; у Foxp3⁺ - середніх лімфоцитів у 2,6 разів (p <0,05) при ХСС1 і у 2,3 рази (p <0,05) на фоні ХСС2 та підвищення даного показника у Foxp3⁺ - малих лімфоцитів у 3,8 разів (p<0,05) при ХСС1 і у 4,5 рази (p<0,05) за умов ХСС2 у порівнянні з контролем (табл. 5.16). Введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувалось зростанням концентрації Foxp3 у Foxp3⁺ - лімфобластів у 2,6 разів (p<0,05) при ХСС1 и на 57% (p <0,05) за умов ХСС2, у Foxp3⁺ - середніх лімфоцитів у 2,6 разів (p<0,05) при ХСС1 і у 2,3 рази

($p < 0,05$) на фоні ХСС2 та зниженням даного параметра у Foxp3⁺- малих лімфоцитів у 3,8 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 4,3 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2. При введенні Лб щурам, підданих дії стресу, спостерігалась тенденція до зростання концентрації Foxp3-білку у Foxp3⁺- лімфобластів (у 2,2 рази, $p < 0,05$), у Foxp3⁺- середніх лімфоцитів (у 2,5 рази, $p < 0,05$) тільки при ХСС1 та зменшення даного параметру у Foxp3⁺- лімфобластів (на 26%, $p < 0,05$), у Foxp3⁺- середніх лімфоцитів (на 15%, $p < 0,05$) тільки у випадку ХСС2, у Foxp3⁺- малих лімфоцитів у 3,7 раз ($p < 0,05$) при ХСС1 и на 18% ($p < 0,05$) за умов ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 5.16).

Таблиця 5.16.

**Концентрація білку Foxp3 (УО₁₀) в СЗ клубової кишки
щурів лінії Вістар (M± m).**

Серії	Foxp3 ⁺ - лімфобласти	Foxp3 ⁺ -середні лімфоцити	Foxp3 ⁺ -малі лімфоцити
контроль	0,539±0,036	0,302±0,003	0,144±0,003
стрес 1	0,239±0,015 ¹	0,117±0,002 ¹	0,547±0,001 ¹
стрес 2	0,342±0,038 ¹	0,131±0,004 ¹	0,644±0,002 ¹
стрес 1 + канаміцин	0,628±0,039 ²	0,303±0,004 ²	0,142±0,003 ²
стрес 2 + канаміцин	0,536±0,024 ³	0,303±0,004 ³	0,148±0,003 ³
стрес 1 + лактобактерин	0,534±0,028 ²	0,290±0,004 ^{1,2}	0,148±0,002 ²
стрес 2 + лактобактерин	0,252±0,016 ^{1,3}	0,111±0,001 ^{1,3}	0,531±0,001 ^{1,3}

Примітка: достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

5.10. Висновки до розділу 5.

Таким чином, отримані у даному розділі результати свідчать, що розвиток стресу супроводжується 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%, $p < 0,05$), переважним підвищенням концентрації T-bet і GATA3 у лімфоцитах. Розвиток ХСС призводить до збільшення кількості Ror γ ⁺ - лімфоцитів (на 94 % - у 2,1 рази у ЗЛВ, у 2,3 рази у СЗ тільки на фоні ХСС2) та Ror γ ⁺CD8⁺ - лімфоцитів (у 2,1 - 2,3 рази в ЗЛВ) у порівнянні з контролем і супроводжується зростанням концентрації Ror γ . Ці зміни відбуваються 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 свідчать про домінування в умовах ХСС Th1- і Th17- диференціювання та підвищення рівня про-запальної сигналізації в кишечнику.

Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до зростання кількості T-bet⁺- і GATA3⁺- лімфоцитів у випадку ХСС1, не впливало на їх чисельність при ХСС2, зменшувало ЩП Ror γ ⁺-лімфоцитів і підвищувало кількість Foxp3⁺- клітин (тільки в ЗЛВ), різноспрямовано впливало на концентрацію досліджуваних факторів в залежності від виду стресу.

Введення *Лб* стресованим щурам супроводжувалось зростанням кількості T-bet⁺- лімфоцитів в СЗ (на 25 – 50 %, $p < 0,05$), зменшувало їх щільність в ЗЛВ (на 24 – 30 %, $p < 0,05$), не впливало на чисельність GATA3⁺ - клітин, збільшувало концентрацію T-bet у лімфобластів і GATA3 у середніх лімфоцитів. При цьому загальна кількість Ror γ ⁺- лімфоцитів зменшувалась, а Foxp3⁺- і CD25⁺Foxp3⁺- лімфоцитів достовірно зростала.

Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані в наступних роботах [14, 25-28, 154].

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО СОЦІАЛЬНОГО СТРЕСУ ТА МОДУЛЯЦІЇ СКЛАДУ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ НА ЕКСПРЕСІЮ ІМУННОЇ СУБОДИНИЦІ ПРОТЕАСОМИ LMP2 ТА ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРУ ХВР1 В КИШКОВО-АСОЦІЙОВАНІЙ ЛІМФОЇДНІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ

У представленій главі наведені результати досліджень особливостей експресії імунної субодиниці протеасоми LMP2 та транскрипційного фактора ХВР1 в КАЛТ щурів в умовах хронічного соціального стресу і при модуляції складу кишкової мікрофлори. У ході роботи використовували високочутливі імуногістохімічні та імунофлюоресцентні методи із застосуванням моноклональних антитіл, що дозволяють достовірно візуалізувати імунопозитивні клітини в різних морфофункціональних зонах гістологічних зрізів КАЛТ. Вивчена особливість розподілу LMP2⁺-, ХВР1⁺- лімфоцитів за допомогою програм AxioVision4.7.2 (ZEISS, Німеччина) та ImageJ (NIH, США), проведено аналіз морфометричних і денситометричних характеристик імунних клітин, при цьому досліджуваними параметрами були: щільність відповідних імунопозитивних лімфоцитів на 1 мм² тканини, їх частка у структурі лімфоїдної популяції та концентрація LMP2 і ХВР1 у клітинах.

6.1. Особливості розподілу LMP2⁺-лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори.

Як було описано у розділі 1, імунні протеасоми грають важливу роль в утворенні антигенних епітопів з власних і чужорідних білків, їх генерації і

презентації разом із молекулами МНС I-II класів Т-лімфоцитам, впливають на проліферацію і виживання Т-клітин, таким чином, вони представляють собою одну із первинних ланок формування імунної відповіді. Однак, про особливості експресії LMP2 лімфоцитами КАЛТ майже нічого не відомо.

У ході проведених досліджень нами встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався зростанням загальної кількості LMP2⁺-лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ у 3,2 рази (p < 0,05) при ХСС1 і у 2,5 рази (p < 0,05) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів (табл. 6.1, рис. 6.1). Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до збільшення ЩП LMP2⁺-клітин на 24,1% (p < 0,05) тільки за умов ХСС1, а пероральний прийом *Лб* стресованими щурами взагалі не впливав на цей показник.

Таблиця 6.1.

Кількість LMP2⁺ лімфоцитів в ЗЛВ клубової кишки щурів (M ± m)

Серії	LMP2 ⁺ -лімфобласти	LMP2 ⁺ середні лімфоцити	LMP2 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність LMP2 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{2 \pm 1}{11,0 \pm 2,8\%}$	$\frac{5 \pm 1}{24,2 \pm 5,35\%}$	$\frac{13 \pm 2}{64,8 \pm 12,9\%}$	20 ± 3
стрес 1	$\frac{13 \pm 2^1}{20,1 \pm 2,6\%^1}$	$\frac{17 \pm 1^1}{26,9 \pm 2,2\%}$	$\frac{33 \pm 5^1}{53,0 \pm 7,3\%}$	63 ± 6 ¹
стрес 2	$\frac{5 \pm 1}{11,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{22,2 \pm 2,3\%}$	$\frac{33 \pm 3^{1,2}}{66,7 \pm 7,0\%}$	49 ± 4 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{12 \pm 1^1}{15,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{18 \pm 2^1}{21,5 \pm 2,1\%}$	$\frac{53 \pm 4^1}{63,3 \pm 4,9\%}$	83 ± 5 ^{1,2}
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{8 \pm 2^1}{17,2 \pm 3,3\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{22,5 \pm 2,8\%}$	$\frac{29 \pm 3^1}{60,3 \pm 6,0\%}$	48 ± 4 ¹
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{8 \pm 1^{1,2}}{14,4 \pm 1,9\%}$	$\frac{18 \pm 2^1}{31,6 \pm 3,2\%}$	$\frac{32 \pm 2^1}{53,9 \pm 4,3\%}$	58 ± 3 ¹
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{6 \pm 1^1}{11,6 \pm 1,5\%}$	$\frac{8 \pm 1}{16,25 \pm 2,4\%}$	$\frac{36 \pm 3^1}{72,2 \pm 5,9\%}$	50 ± 4 ¹

Примітка: у чисельнику - щільність популяції LMP2⁺- клітин (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів LMP2⁺- клітин; достовірність відмінностей параметрів p < 0,05 по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

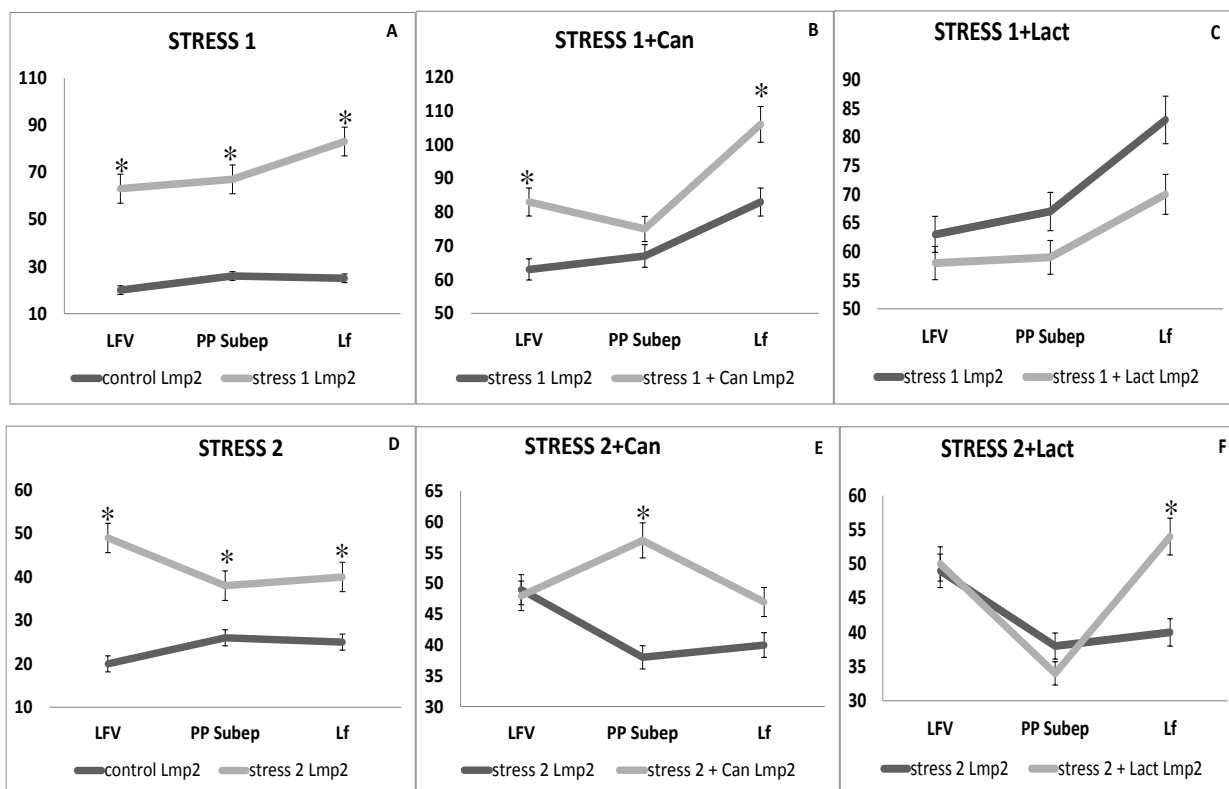


Рис. 6.1. Сумарна щільність LMP2⁺ - лімфоцитів (на 1 мм²) у ЗЛВ (LFV), ЛФ (Lf) та С3 (PP Subep),* - p < 0,05.

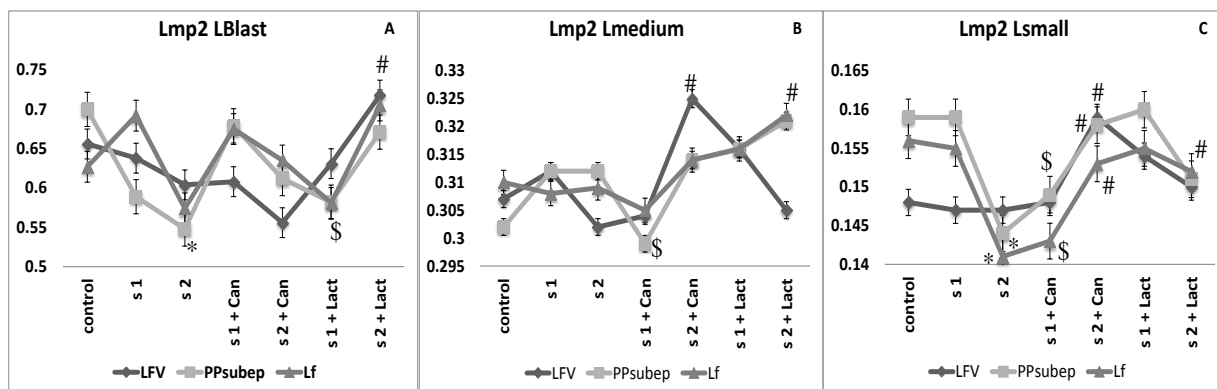


Рис. 6.2. Концентрація білку LMP2 (YO_{if}). * - p < 0,05 по відношенню до контролю, \$ - p < 0,05 до стресу 1, # - p < 0,05 до стресу 2.

Вивчення розподілу окремих класів і структури популяції LMP2⁺ - клітин у експериментальних тварин показало, що розвиток ХСС супроводжувався достовірним зростанням загальної кількості LMP2⁺ - лімфобластів (у 6,5 разів,

$p < 0,05$ тільки на фоні ХСС1), $LMP2^+$ - середніх лімфоцитів (у 3,4 рази, $p < 0,05$ при ХСС1 і у 2,2 рази, $p < 0,05$ за умов ХСС2) і $LMP2^+$ - малих лімфоцитів (у 2,5 рази, $p < 0,05$ при ХСС1 і ХСС2) у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Кан* стресованим щурам призводило до збільшення кількості $LMP2^+$ - малих лімфоцитів на 37,7% ($p < 0,05$) при ХСС1, тоді як введення *Лб* експериментальним тваринам достовірно знижувало частку $LMP2^+$ - лімфобластів також у випадку ХСС1 (на 38,5%, $p < 0,05$) (див. табл. 6.1).

Розвиток ХСС не впливав на концентрацію імунної субодиниці протеасоми $LMP2$ в імунопозитивних клітинах. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до достовірного збільшення концентрації $LMP2$ у $LMP2^+$ - середніх лімфоцитів і у $LMP2^+$ - малих лімфоцитів тільки у випадку ХСС2 (рис. 6.2). У всіх інших випадках зміни концентрації $LMP2$ не досягали достовірних значень.

6.2. Особливості розподілу $LMP2^+$ -лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався збільшенням сумарної щільності $LMP2^+$ - лімфоцитів в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у експериментальних тварин (у 2,6 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 46,2 % ($p < 0,05$) на фоні ХСС2). Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до підвищення ЩП $LMP2^+$ - лімфоцитів (на 50%, $p < 0,05$) тільки на фоні ХСС2, тоді як реакція тварин на прийом *Лб* не супроводжувалась достовірними змінами загальної ЩП $LMP2^+$ - лімфоцитів незалежно від розвитку ХСС (табл. 6.2).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції $LMP2^+$ - лімфоцитів у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням ЩП $LMP2^+$ - лімфобластів (у 3,7 разів, $p < 0,05$), $LMP2^+$ - середніх і малих лімфоцитів (у 2,9 разів ($p < 0,05$) і у 2,3 рази ($p < 0,05$), відповідно) тільки за умов ХСС1 у порівнянні з контрольною групою щурів.

Таблиця 6.2.

Кількість LMP2⁺- клітин в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	LMP2 ⁺ -лімфобласти	LMP2 ⁺ -середні лімфоцити	LMP2 ⁺ -малих лімфоцити	Сумарна щільність LMP2 ⁺ -клітин
контроль	$\frac{3 \pm 1}{13,1 \pm 3,4\%}$	$\frac{7 \pm 1}{25,3 \pm 4,5\%}$	$\frac{16 \pm 3}{61,5 \pm 10,2\%}$	26±4
стрес 1	$\frac{11 \pm 2^1}{16,0 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{20 \pm 2^1}{30,1 \pm 3,3\%}$	$\frac{36 \pm 4^1}{53,9 \pm 5,6\%}$	67±4 ¹
стрес 2	$\frac{4 \pm 1}{9,9 \pm 2,0\%}$	$\frac{8 \pm 1}{21,8 \pm 2,7\%}$	$\frac{26 \pm 2^1}{68,3 \pm 5,2\%}$	38±2 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{10 \pm 1^1}{13,4 \pm 2,0\%}$	$\frac{16 \pm 1^1}{20,7 \pm 1,5\%^2}$	$\frac{49 \pm 3^{1,2}}{65,9 \pm 4,7\%}$	75±5 ¹
стрес 2 + канаміцин	$\frac{10 \pm 2^{1,3}}{18,3 \pm 3,3\%^3}$	$\frac{14 \pm 2^{1,3}}{24,3 \pm 4,2\%}$	$\frac{33 \pm 4^1}{57,4 \pm 8,0\%}$	57±7 ^{1,3}
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{9 \pm 1^1}{15,6 \pm 2,2\%}$	$\frac{17 \pm 2^1}{28,5 \pm 2,6\%}$	$\frac{33 \pm 2^1}{55,9 \pm 4,3\%}$	59±3 ¹
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{4 \pm 1}{12,7 \pm 1,3\%}$	$\frac{8 \pm 1}{23,4 \pm 1,9\%}$	$\frac{22 \pm 2}{63,9 \pm 3,4\%}$	34±2

Примітка: у чисельнику - щільність популяції LMP2⁺ - клітин (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів LMP2⁺ - клітин; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Введення *Кан* достовірно збільшувало кількість LMP2⁺ - лімфобластів у 2,5 рази ($p < 0,05$) і LMP2⁺ - середніх лімфоцитів на 75% ($p < 0,05$) при ХСС2, LMP2⁺ - малих лімфоцитів на 36% ($p < 0,05$) на фоні ХСС1. Пероральний прийом *Лб* щурами не супроводжувався достовірними змінами кількості LMP2⁺ - лімфоцитів (див. табл. 6.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції LMP2⁺ - клітин показало зниження концентрації LMP2 у LMP2⁺ - лімфобластів (на 21,7%, $p < 0,05$) і у LMP2⁺ - малих лімфоцитів при ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* стресованим щурам призводило до зниження концентрації імунної субодиноці

протеасоми у LMP2⁺- середніх і малих лімфоцитів при ХСС1 і збільшення даного параметру у LMP2⁺- малих лімфоцитів (на 9,7%, $p < 0,05$) на фоні ХСС2 (див. рис. 6.2).

6.3. Особливості розподілу LMP2⁺-лімфоцитів в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Аналіз серійних зрізів клубової кишки щурів, попередньо інкубованих з АТ до LMP2, показав, що розвиток стресу супроводжувався збільшенням загальної кількості LMP2⁺ - лімфоцитів у ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 60% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до збільшення сумарної щільності імунопозитивних клітин (на 27,7%, $p < 0,05$) тільки при ХСС1, а прийом *Лб* супроводжувався зростанням загальної кількості LMP2⁺- клітин (на 35%, $p < 0,05$) лише за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 6.3).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції LMP2⁺ - лімфоцитів у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням ЩП LMP2⁺ - лімфобластів у 4 рази ($p < 0,05$) при ХСС1, LMP2⁺ - середніх лімфоцитів у 4,5 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 83,3% на фоні ХСС2, LMP2⁺ - малих лімфоцитів у 2,7 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 60% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. При введенні *Кан* стресованим щурам нами було встановлено зростання кількості лише LMP2⁺ - малих лімфоцитів (на 75%, $p < 0,05$) під впливом ХСС2, тоді як прийом *Лб* призводив до зменшення ЩП LMP2⁺ - лімфобластів (на 37,5 %, $p < 0,05$), LMP2⁺ - середніх лімфоцитів (на 25,9%, $p < 0,05$) при ХСС1 і достовірно збільшував число LMP2⁺ - лімфобластів (у 3,1 рази, $p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 6.3).

Таблиця 6.3.

Кількість LMP2⁺-клітин в ЛФ клубової кишки щурів лінії Вістар (M± m)

Серії	LMP2 ⁺ -лімфобласти	LMP2 ⁺ -середні лімфоцити	LMP2 ⁺ -малих лімфоцити	СЦ LMP2 ⁺ -клітин
контроль	$\frac{4 \pm 1}{16,9 \pm 3,6\%}$	$\frac{6 \pm 1}{23,1 \pm 3,5\%}$	$\frac{15 \pm 2}{60,0 \pm 8,1\%}$	25±3
стрес 1	$\frac{16 \pm 2^1}{18,9 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{27 \pm 2^1}{32,2 \pm 3,0\%}$	$\frac{40 \pm 4^1}{48,8 \pm 5,3\%}$	83±7 ¹
стрес 2	$\frac{5 \pm 1}{13,5 \pm 1,5\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{26,3 \pm 2,3\%}$	$\frac{24 \pm 2^1}{60,2 \pm 4,2\%}$	40±2 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{14 \pm 2^1}{13,2 \pm 1,5\%^2}$	$\frac{22 \pm 1^1}{21,0 \pm 2,0\%^2}$	$\frac{70 \pm 5^{1,2}}{65,8 \pm 4,7\%^2}$	106±6 ^{1,2}
стрес 2 + канаміцин	$\frac{8 \pm 1^1}{16,9 \pm 2,6\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{28,3 \pm 3,0\%}$	$\frac{26 \pm 3^1}{54,8 \pm 5,7\%}$	47±4 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{10 \pm 1^{1,2}}{13,5 \pm 1,8\%}$	$\frac{20 \pm 2^{1,2}}{29,1 \pm 2,5\%}$	$\frac{40 \pm 3^1}{57,3 \pm 3,7\%}$	70±4 ¹
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{16 \pm 2^{1,3}}{28,9 \pm 2,9\%^{1,3}}$	$\frac{12 \pm 3^1}{22,4 \pm 3,8\%}$	$\frac{26 \pm 4^1}{48,6 \pm 5,5\%}$	54±6 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику - щільність популяції LMP2⁺- клітин (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка окремих класів LMP2⁺- клітин; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Розвиток стресу супроводжувався зниженням концентрації імунної субодиниці протеасоми лише у LMP2⁺ - малих лімфоцитів (на 9,6%, $p < 0,05$) при ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення Кан стресованим щурам характеризувалось різноспрямованою тенденцією і супроводжувалось достовірним зниженням концентрації LMP2 у LMP2⁺- малих лімфоцитів (на 7,7%, $p < 0,05$) на фоні ХСС1 та збільшенням даного параметра у LMP2⁺ - малих лімфоцитів (на 8,5%, $p < 0,05$) при ХСС2. При введенні Лб також простежувалась різноспрямованість в отриманих результатах, а саме: зафіксовано достовірне зростання концентрації LMP2 у LMP2⁺- лімфобластів, середніх і малих лімфоцитів при ХСС2 і зниження даного параметра у LMP2⁺ - лімфобластів (на 16%, $p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. рис. 6.2).

6.4. Особливості експресії ХВР1 лімфоцитами у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Як відомо, ХВР1 є одним з ключових транскрипційних факторів, що індукують відповідь на незгорнуті білки (unfolded protein response - UPR) при стресовій реакції ендоплазматичного ретикулуму (СЕР). Тому, зміни експресії ХВР1, на думку ряду авторів, можуть суттєво впливати на рівень продукції про-запальних цитокінів та в подальшому призводить до розвитку запальних та аутоімунних захворювань [165]. Якщо про роль порушень продукції ХВР1 епітеліальними клітинами кишківнику у розвитку запальних і АІЗ опублікована низка робіт [162-164, 189, 190, 236], то щодо характеру експресії цього білка лімфоцитами КАЛТ в умовах ХСС нічого не відомо.

Нами встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням загальної кількості ХВР1⁺- лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ на 30,6% (p <0,05) при ХСС1 і на 34,8% на фоні ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів (табл. 6.4, рис. 6.3, 6.5). Введення *Кан* експериментальним тваринам не впливало на сумарну щільність ХВР1⁺- лімфоцитів, тоді як прийом *Лб* стресованими щурами призводив до збільшення їх загальної кількості (на 70,3%, p <0,05) у випадку ХСС2.

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції ХВР1⁺ - клітин у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням ЩП ХВР1⁺ - лімфобластів у 3,3 рази (p <0,05) як при ХСС1, так і у випадку ХСС2, ХВР1⁺ - середніх лімфоцитів на 40% (p <0,05) при ХСС1 і на 26,7% (p <0,05) у разі ХСС2, ХВР1⁺ малих лімфоцитів на 27,3% (p <0,05) лише за умов ХСС2 у порівнянні з контролем (див. табл. 6.4).

Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до зростання кількості ХВР1⁺ - лімфобластів у 2 рази (p <0,05) лише за умов ХСС2, тоді як пероральний прийом *Лб* експериментальними тваринами чинив різноспрямовані ефекти: призводив до збільшення числа ХВР1⁺ - лімфобластів у 4 рази (p<0,05), ХВР1⁺ - середніх

лімфоцитів на 40% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,2 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 і знижував кількість ХВР1⁺ - малих лімфоцитів на 38% ($p < 0,05$) при ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 6.4).

Таблиця 6.4.

Кількість ХВР1⁺ лімфоцитів в ЗЛВ клубової кишки щурів (M±m)

Серії	ХВР1 ⁺ - лімфобласти	ХВР1 ⁺ середні лімфоцити	ХВР1 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність ХВР1 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{13 \pm 2}{18,5 \pm 2,7\%}$	$\frac{15 \pm 2}{21,1 \pm 2,2\%}$	$\frac{44 \pm 3}{60,4 \pm 4,2\%}$	72±5
стрес 1	$\frac{4 \pm 1^1}{8,6 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^1}{18,5 \pm 2,6\%}$	$\frac{37 \pm 4}{72,8 \pm 7,0\%}$	50±4 ¹
стрес 2	$\frac{4 \pm 1^1}{8,4 \pm 1,4\%^1}$	$\frac{11 \pm 1^1}{23,1 \pm 2,1\%}$	$\frac{32 \pm 2^1}{68,5 \pm 4,1\%}$	47±3 ¹
стрес 1 + канаміцин	$\frac{3 \pm 1^1}{6,5 \pm 0,98\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^1}{19,3 \pm 1,8\%}$	$\frac{37 \pm 2}{74,2 \pm 4,1\%^1}$	49±2 ¹
стрес 2 + канаміцин	$\frac{8 \pm 1^{1,3}}{14,5 \pm 2,1\%^3}$	$\frac{14 \pm 1}{25,5 \pm 2,3\%}$	$\frac{32 \pm 3^1}{60,0 \pm 5,6\%}$	54±4 ¹
стрес 1 + лактобактерин	$\frac{6 \pm 1^1}{13,9 \pm 1,9\%}$	$\frac{15 \pm 1^2}{34,7 \pm 3,3\%^{1,2}}$	$\frac{23 \pm 2^{1,2}}{51,4 \pm 5,6\%^2}$	44±3 ¹
стрес 2 + лактобактерин	$\frac{16 \pm 3^3}{20,5 \pm 6,8\%}$	$\frac{24 \pm 3^{1,3}}{29,6 \pm 6,7\%}$	$\frac{4 \pm 1}{49,9 \pm 11,3\%}$	80±5 ³

Примітка: у чисельнику – ЩП ХВР1⁺лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Розвиток ХСС у щурів лінії Вістар призводив до статистично значимого зниження концентрації транскрипційного фактору ХВР1 у ХВР1⁺- лімфобластів на 13,8% ($p < 0,05$) при ХСС2 у порівнянні з контрольною групою. Введення *Кан* не впливало, а *Лб* збільшувало концентрацію ХВР1 - білка у ХВР1⁺ - лімфобластів (на 23,8%, $p < 0,05$) лише за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (рис. 6.4).

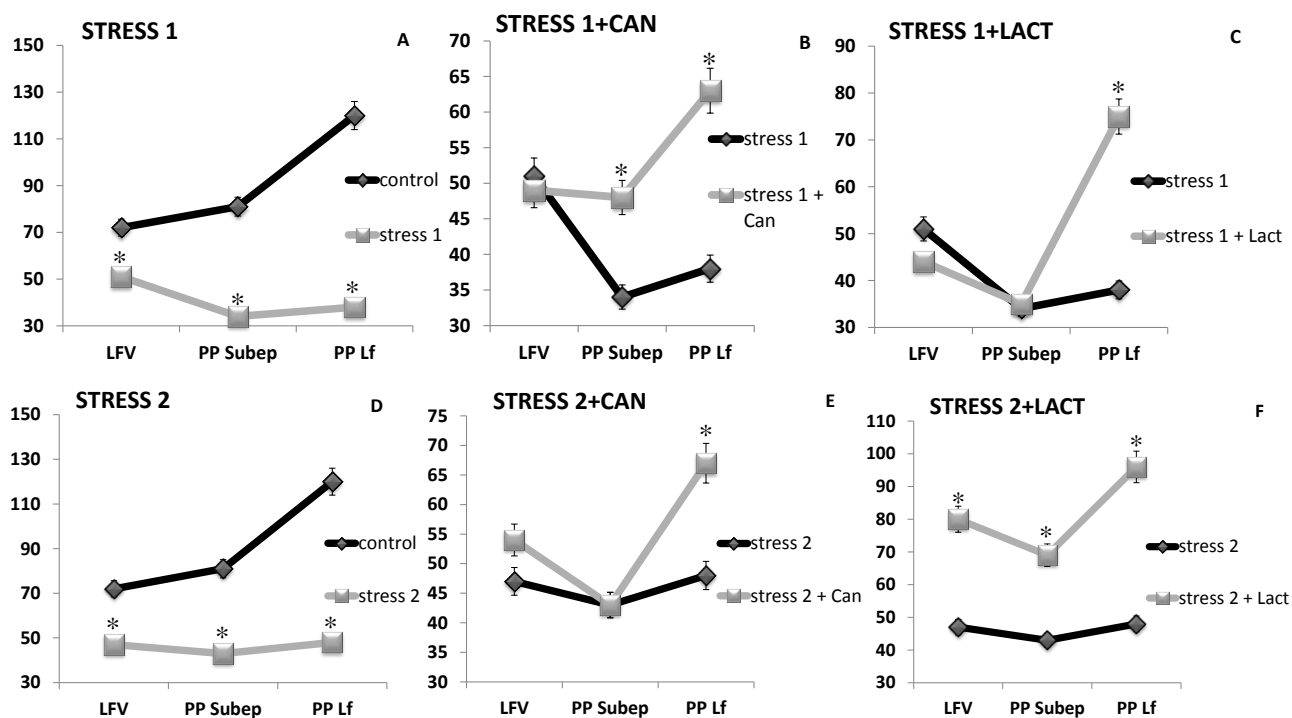


Рис. 6.3. Кількість ХВР1 - клітин у ЗЛВ (LFV), ЛФ (PP Lf) та СЗ (PP Subep).

Note: * - $P < 0,05$.

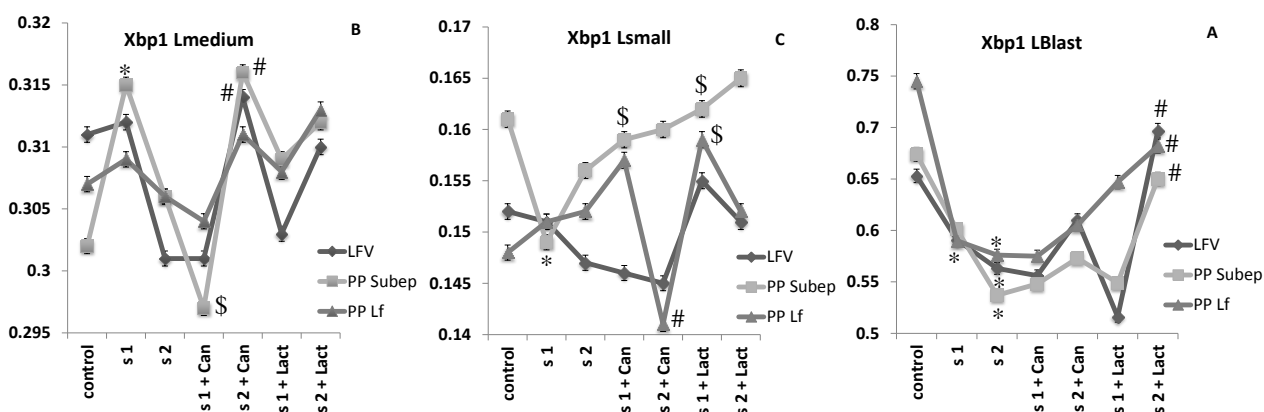


Рис. 6.4. Концентрація білку ХВР1 ($YO_{i\phi}$). * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю, \$ - $p < 0,05$ до стресу 1, # - $p < 0,05$ до стресу 2.

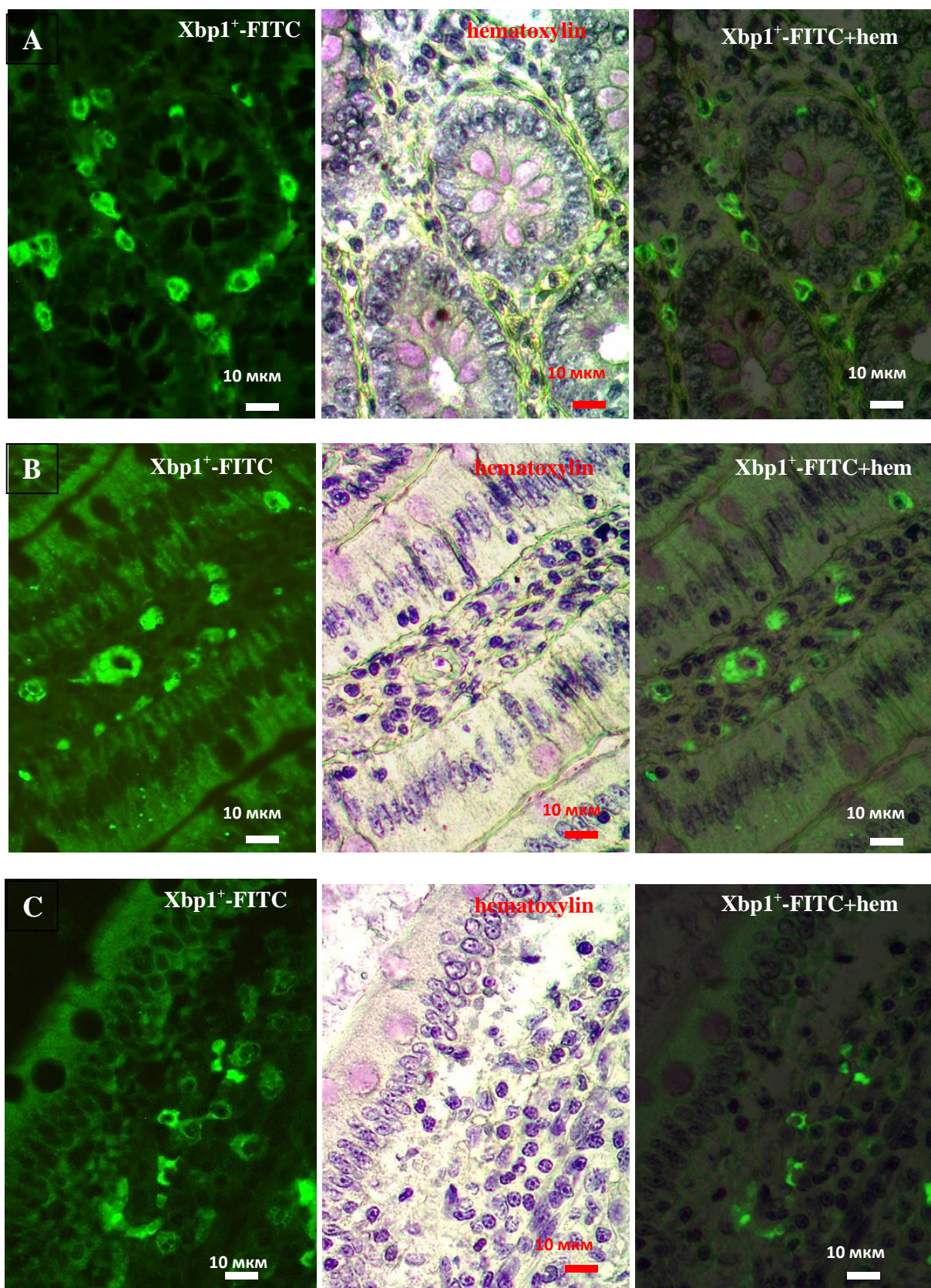


Рис. 6.5. ХВР1⁺ - клітини у власній пластинці слизової оболонки LFV (ЗЛВ) у щурів лінії Вістар. Реакція непрямой імуофлюоресценції з наступною докраскою гематоксиліном: А - контроль; В - ХСС1; С - ХСС2.

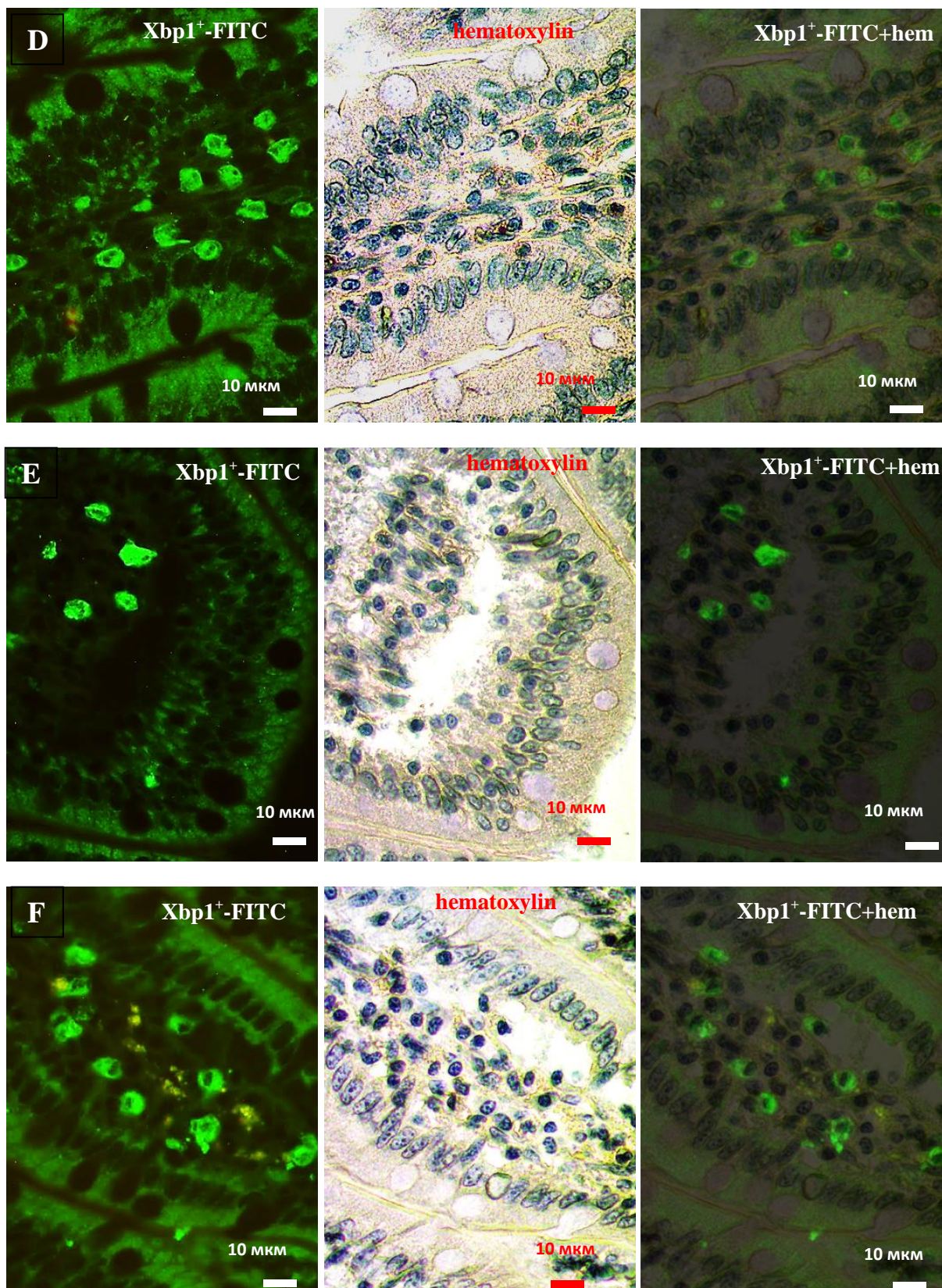


Рис. 6.5 (продовження). ХВР1⁺ - клітини у власній пластинці слизової оболонки LFV (ЗЛВ) у щурів лінії Вістар. Реакція непрямой імуофлюоресценції з наступною докраскою гематоксиліном: D - ХСС1 + Лб; E - ХСС1+ Кан; F-ХСС2 + Кан.

6.5. Особливості експресії ХВР1 лімфоцитами в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався зниженням загальної кількості ХВР1⁺ - лімфоцитів у СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів у 2,4 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 47% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до збільшення загальної СЦ ХВР1⁺ - лімфоцитів на 41,2% ($p < 0,05$) лише за умов ХСС1. Пероральний прийом *Лб* щурами на фоні ХСС супроводжувався зростанням сумарної щільності популяції ХВР1⁺ - клітин на на 62,8% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 6.5).

Таблиця 6.5.

Кількість ХВР1⁺ лімфоцитів в СЗ (M± m)

Серії	ХВР1 ⁺ лімфобласт и	ХВР1 ⁺ середні лімфоцити	ХВР1 ⁺ малі лімфоцити	Сумарна щільність ХВР1 ⁺ лімфоцитів
контроль	$\frac{11 \pm 1}{14,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{17 \pm 1}{20,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{53 \pm 3}{65,1 \pm 4,1\%}$	81±4
стрес 1	$\frac{4 \pm 1^1}{11,7 \pm 1,9\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{30,0 \pm 3,4\%^1}$	$\frac{20 \pm 3^1}{58,3 \pm 6,9\%}$	34±3 ¹
стрес 2	$\frac{5 \pm 1^1}{11,0 \pm 1,7\%}$	$\frac{14 \pm 1}{33,7 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{24 \pm 2^1}{55,3 \pm 5,4\%}$	43±3 ¹
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{4 \pm 1^1}{8,6 \pm 1,6\%^1}$	$\frac{10 \pm 1^1}{20,3 \pm 2,0\%^2}$	$\frac{34 \pm 2^{1,2}}{71,1 \pm 4,4\%}$	48±2 ^{1,2}
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{6 \pm 1^1}{13,6 \pm 1,5\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{30,5 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{24 \pm 2^1}{55,9 \pm 4,0\%}$	43±2 ¹
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{5 \pm 1^1}{15,5 \pm 2,0\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{34,3 \pm 2,6\%^1}$	$\frac{18 \pm 1^1}{50,2 \pm 3,6\%^1}$	35±2 ²
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{13 \pm 1^3}{18,3 \pm 3,2\%^3}$	$\frac{24 \pm 2^{1,3}}{34,2 \pm 5,2\%}$	$\frac{33 \pm 2^{1,3}}{47,5 \pm 7,1\%^1}$	70±3 ^{1,3}

Примітка: у чисельнику – ЩП ХВР1⁺лімфоцитів (на 1 мм²), у знаменнику – процентна частка; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції ХВР1⁺ - клітин у експериментальних тварин показав, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням ЩП ХВР1⁺ - лімфобластів у 2,8 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,2 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, ХВР1⁺ - середніх лімфоцитів на 41,2% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 17,7% ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контролем. Введення *Кан* щурам з ХСС призводило до достовірного збільшення кількості ХВР1⁺ - малих лімфоцитів на 70% ($p < 0,05$) при ХСС1. Прийом *Лб* експериментальними тваринами призводив до збільшення числа ХВР1⁺ - лімфобластів у 2,6 разів ($p < 0,05$), ХВР1⁺ - середніх лімфоцитів на 71,5% ($p < 0,05$), ХВР1⁺ - малих лімфоцитів на 37,5% ($p < 0,05$) лише за умов ХСС2 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. табл. 6.5).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції продемонструвало підвищення концентрації транскрипційного фактору ХВР1 у ХВР1⁺ - середніх лімфоцитів при ХСС1 і зниження у ХВР1⁺ - лімфобластів (на 20,4%, $p < 0,05$) на фоні ХСС2 і у ХВР1⁺ - малих лімфоцитів при ХСС1 у порівнянні з контрольною групою тварин. Введення *Кан* стресованим щурам супроводжувалось достовірним зменшенням концентрації ХВР1 у ХВР1⁺ - середніх лімфоцитів при ХСС1, тоді як введення *Лб* призводило до збільшення концентрації даного параметру у ХВР1⁺ - лімфобластів (на 21,1%, $p < 0,05$) при ХСС2 і у ХВР1⁺ - малих лімфоцитів (на 8,0%, $p < 0,05$) за умов ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. рис. 6.5).

6.6. Особливості експресії ХВР1 лімфоцитами в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів в умовах ХСС і при модуляції кишкової мікрофлори

Розвиток ХСС супроводжувався зниженням загальної кількості ХВР1⁺ - лімфоцитів в цій зоні КАЛТ у 3,2 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,5 рази ($p < 0,05$) в умовах ХСС2 у порівнянні з контрольною групою щурів. Введення *Кан*

експериментальним тваринам призводило до збільшення сумарної щільності імунопозитивних клітин (на 65,8%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 41,7%, $p < 0,05$ на фоні ХСС2). Такий же ефект мав пероральний прийом *Лб* і супроводжувався зростанням загальної щільності ХВР1^+ - клітин (у 2 рази, $p < 0,05$ і при ХСС1 і у випадку ХСС2) у порівнянні зі стресованими тваринами (табл. 6.6).

Таблиця 6.6.

Кількість ХВР1^+ лімфоцитів в ЛФ згрупованих лімфоїдних вузликів клубової кишки щурів лінії Вістар ($M \pm m$)

Серії	ХВР1^+ -лімфобласти	ХВР1^+ середні лімфоцити	ХВР1^+ малі лімфоцити	Сумарна щільність ХВР1^+ лімфоцитів
контроль	$\frac{22 \pm 2}{18,2 \pm 1,7\%}$	$\frac{17 \pm 2}{14,3 \pm 1,3\%}$	$\frac{81 \pm 4}{67,5 \pm 3,1\%}$	120 ± 5
стрес 1	$\frac{5 \pm 1^1}{12,7 \pm 1,8\%^1}$	$\frac{13 \pm 1^1}{33,6 \pm 2,2\%^1}$	$\frac{20 \pm 2^1}{53,7 \pm 3,9\%^1}$	38 ± 2^1
стрес 2	$\frac{5 \pm 1^1}{11,3 \pm 1,6\%^1}$	$\frac{12 \pm 1^1}{25,7 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{31 \pm 2^1}{63,0 \pm 4,6\%}$	48 ± 3^1
стрес 1 + <i>канаміцин</i>	$\frac{7 \pm 1^{1,2}}{11,8 \pm 1,7\%^1}$	$\frac{14 \pm 1}{22 \pm 2,1\%^{1,2}}$	$\frac{42 \pm 2^{1,2}}{66,2 \pm 3,3\%^2}$	$63 \pm 3^{1,2}$
стрес 2 + <i>канаміцин</i>	$\frac{12 \pm 2^{1,3}}{17,2 \pm 2,4\%^3}$	$\frac{15 \pm 2}{22,6 \pm 2,9\%^1}$	$\frac{41 \pm 5^1}{60,2 \pm 6,9\%}$	$68 \pm 6^{1,3}$
стрес 1 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{13 \pm 1^{1,2}}{17,7 \pm 1,5\%^2}$	$\frac{23 \pm 1^{1,2}}{30,9 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{39 \pm 2^{1,2}}{51,4 \pm 3,2\%^1}$	$75 \pm 4^{1,2}$
стрес 2 + <i>лактобактерин</i>	$\frac{20 \pm 2^3}{21,0 \pm 2,8\%^3}$	$\frac{23 \pm 2^{1,3}}{23,8 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{53 \pm 4^{1,3}}{55,2 \pm 5,5\%}$	$96 \pm 6^{1,3}$

Примітка: у чисельнику - щільність популяції ХВР1^+ - лімфоцитів (на 1 мм^2), у знаменнику – процентна частка окремих класів ХВР1^+ - лімфоцитів; достовірність відмінностей параметрів $p < 0,05$ по відношенню до контролю (¹), до стресу 1 (²), до стресу 2 (³).

Аналіз розподілу окремих класів і структури популяції ХВР1^+ - лімфоцитів показав, що розвиток ХСС супроводжувався зниженням ЩП ХВР1^+ - лімфобластів у 4,4 рази ($p < 0,05$), ХВР1^+ - середніх лімфоцитів на 23,6% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 29,5% на фоні ХСС2, ХВР1^+ - малих лімфоцитів у 4,1 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у

2,7 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2 у порівнянні з контрольною групою тварин. Прийом *Кан* щурами з ХСС призводив до достовірного зростання кількості ХВР1^+ - лімфобластів на 40% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 2,4 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2, ХВР1^+ - малих лімфоцитів у 2,1 рази ($p < 0,05$) лише при ХСС1. Введення *Лб* експериментальним тваринам супроводжувалось збільшенням числа ХВР1^+ - лімфобластів у 2,6 разів ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 4 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2, ХВР1^+ - середніх лімфоцитів (на 77%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 91,7% $p < 0,05$ на фоні ХСС2), ХВР1^+ - малих лімфоцитів (у 2 рази, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 70%, $p < 0,05$ на фоні ХСС2) у порівнянні із стресованими тваринами (див. табл. 6.6).

Розвиток стресу знижував концентрацію ХВР1 у ХВР1^+ - лімфобластів на 20,8% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 22,7% ($p < 0,05$) на фоні ХСС2. Введення *Кан* щурам з ХСС достовірно знижувало концентрацію ХВР1 у ХВР1^+ - малих лімфоцитів лише при ХСС2, а введення *Лб* супроводжувалось достовірним підвищенням концентрації ХВР1 - білку у ХВР1^+ - лімфобластів і малих лімфоцитів за умов ХСС1 у порівнянні зі стресованими тваринами (див. рис. 6.5).

6.7. Висновки до розділу 6.

Узагальнюючи отримані у даній главі результати, можна відзначити, що розвиток ХСС супроводжується зниженням загальної кількості ХВР1^+ лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки (на 31% - у 3 рази, $p < 0,05$), найбільш вираженим у лімфоїдних фолікулах, а також змінює концентрацію білку ХВР1 в імунопозитивних клітинах. Модуляція складу кишкової мікрофлори *АБ* і *ПБ* в умовах ХСС призводить до збільшення загального числа ХВР1^+ лімфоцитів в КАЛТ і залежить від виду стресу: введення *Кан* більш інтенсивно підвищують їх кількість при ХСС1, а прийом *Лб* – за умов ХСС2.

Розвиток стресу супроводжуються односпрямованою тенденцією щодо збільшення загальної кількості LMP2^+ - лімфоцитів в 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 С3), не впливає на концентрацію LMP2 при ХСС1 і знижує при ХСС2 у

LMP2⁺ - лімфобластів і малих лімфоцитів. Введення *Kan* переважно збільшує, а *Лб* майже не впливає на загальну щільність LMP2⁺ - лімфоцитів, різноспрямоване змінює концентрацію імунної субодиниці протеасоми.

Виявлені нами зміни експресії транскрипційного фактору ХВР1 та імунної субодиниці протеасоми LMP2 в умовах стресу можуть бути одними з тригерів розвитку ЗЗК. Результати досліджень, наведені в цьому розділі, опубліковані у наступних роботах [29, 153, 155, 156, 279].

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою даного дослідження стало з'ясування закономірностей і механізмів змін функціонального стану лімфоцитів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів за умов розвитку ХСС та при модуляції складу кишкової мікрофлори. Для реалізації поставленої мети і вирішення завдань нами застосовано комплекс сучасних патофізіологічних та імунологічних методів, що включають в себе моделювання експериментальної патології (ХСС), використання поведінкових тестів для оцінки рухово-дослідної та емоційної активності, молекулярно-генетичний аналіз експресії мРНК генів *Nr3c1*, *Adrb2*, *IL-1 β* , *IL-17a*, *Nlrp3*, вивчення особливостей цитоархітекtonіки КАЛТ, експресії рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, транскрипційного фактору Nf- κ B, з'ясування особливостей процесів диференціювання таких субпопуляцій Т-клітин, як Th1, Th2, Th17 і Т-регуляторні клітини (T_{reg}), аналіз особливостей процесингу антигенів за участю імунопротеасом LMP2 та рівня розвитку стресу ендоплазматичного ретикулуму. Крім того, для вирішення поставлених завдань ми застосували методичний підхід, який дозволив дати об'єктивну і комплексну оцінку морфофункціонального стану лімфоцитів КАЛТ. У ході досліджень застосовували високочутливі та високоспецифічні імуногістохімічні методи прямої і непрямой імуофлюоресценції з використанням моноклональних і поліклональних антитіл, які дозволили достовірно візуалізувати імунопозитивні клітини в різних морфофункціональних зонах гістологічних зрізів клубової кишки, а також верифікувати їх належність до того чи іншого типу клітин. Застосовані нами методи подвійної імуофлюоресценції дозволили додатково уточнити фенотип імунопозитивних об'єктів. Аналіз зображень здійснювався в

автоматичному режимі, який дозволив уникнути суб'єктивної оцінки результатів і надав можливість проведення високоточного кількісного виміру морфологічних і денситометричних параметрів імунопозитивних об'єктів.

Використання адекватних експериментальних моделей дозволило скласти об'єктивну картину функціональних змін у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині щурів і виключити випадковість інтерпретації отриманих даних. Вибрані нами моделі ХСС є класичними в експериментальній патофізіології. Важливо, що експериментальні моделі різних стресів, супроводжувані зниженням ГК сигналізації, є хронічними і психосоціальними за своєю природою, як і людські стресори, що провокують розвиток аутоімунних і запальних захворювань, і це ще раз підтверджує правильність нашого вибору.

На першому етапі дослідження ми вивчили рівень експресії мРНК генів *Nr3c1*, *Adrb2*, *IL-1β*, *IL-17α*, *Nlrp3* у КАЛТ і з'ясували, що розвиток стресу призводить до зниження експресії мРНК *Nr3c1* - (у 3 - 10 разів) і *Adrb2* - рецепторів (у 10 - 12 разів), зростання транскрипційної активності генів прозапальних цитокінів *IL-1β* (у 3-6 разів), *IL-17α* (50% - у 2 рази) та *Nlrp3* – інфламасоми (у 2 - 17 разів).

Отримані нами дані підтверджуються цілим рядом інших досліджень. Так, застосування різних експериментальних моделей ХСС показало, що він може викликати генерацію і вихід незрілих, прозапальних мієлоїдних клітин, які є нечутливими до ефектів глюкокортикоїдів [79, 90]. Крім того, такі резистентні до ГК клітини продукують високі рівні *IL-6* та інших про-запальних цитокінів і хемокінів [93, 145]. Як наслідок, ці стрес-індуковані зміни на клітинному рівні призводять до значних імунних (посилення про-запальної сигналізації та імунної відповіді на мікробні і вірусні антигени) і поведінкових порушень (тривожність, депресія) [36, 43].

Ряд досліджень показали, що повторний соціальний стрес викликає глюкокортикоїдну резистентність в клітинах вродженого імунітету, але молекулярні механізми цього явища повністю не з'ясовані. Так, Jung S. et al., (2015) встановив, що експресія мРНК ГК рецепторів була значно зменшена в макрофагах селезінки при ХСС. Стрес також індукує значне зниження експресії мРНК FK506-зв'язуючого

білка 52 (FKBP52) [144]. Крім того, в умовах ХСС відзначалось значне зниження експресії мРНК ДНК-метилтрансферази 3a і 3b, так само як і експресії мРНК гістон-деацетилази 2 (histone-deacetylase 2, HDAC2), а також значне зниження кількості метильованої ДНК в макрофагах селезінки. Визначення профілю мікроРНК показало, що стрес викликав значне підвищення експресії 9 різних мікроРНК, 6 з яких взаємодіють з мРНК ГК рецепторів, 3 - з мРНК мінералокортикоїдних рецепторів і 2 - з мРНК іммунофіліну FKBP52. При цьому, кореляційний аналіз показав наявність сильних кореляцій між експресією 2 мікроРНК і їх мішенню - мРНК ГК рецепторів. Надлишкова експресія мікроРНК-29b або мікроРНК-340 в клітинах лінії L929 значно знижує ЛПС-індуковану гіперекспресію ГК рецепторів. Це свідчить, що епігенетична регуляція - метилювання ДНК і експресія мікроРНК, також може відігравати певну роль у індукованій соціальним стресом резистентності до ГК.

Виявлені нами зміни експресії $\text{Adrb}2$ -рецепторів здатні безпосередньо впливати на лімфоїдні клітини. Так, Sanders V.M. et al. (2012) було встановлено, що активація $\text{Adrb}2$ порушує диференціювання, проліферацію та функції Th1-клітин в результаті підвищення концентрації цАМФ у лімфоцитах, в свою чергу, це призводить до інгібування проліферації Т-клітин і зниження продукції про-запальних ІЛ-2, ІЛ-12, TNF- α , IFN- γ та стимулює вироблення протизапальних ІЛ-10 і TGF- β [246]. Рівень експресії $\text{Adrb}2$ в Th1 - і Th2 - клітинах може регулюватися й епігенетично [196]. З іншого боку, на локальному рівні КХ можуть посилювати регіональну імунну відповідь, індукуючи продукцію ІЛ-1, TNF α і ІЛ-8. Дані деяких досліджень свідчать про пригнічення індукованої мітогенами проліферації Т-клітин катехоламінами і агоністами $\text{Adrb}2$, що асоціюється з підвищенням концентрації цАМФ в лімфоцитах. Проліферативна відповідь $\text{CD}8^+$ Т-клітин інгібується більшою мірою, ніж $\text{CD}4^+$ Т - клітин, і пов'язана з більшою щільністю $\text{Adrb}2$ на поверхні $\text{CD}8^+$ -лімфоцитів. Т-регуляторні лімфоцити експресують тирозингідроксилази - ферменти, які обмежують швидкість синтезу КХ, а вивільнення КХ призводить до зниження продукції ІЛ-10 і TGF- β Т-регуляторними клітинами, а, отже, і до зменшення T_{reg} -залежного інгібування ефекторних Т-лімфоцитів. У дослідженнях

Guereschi M.G. et al. (2013) було виявлено, що передача сигналів через *Adrb2* посилювала супресорну активність T_{reg} *in vitro*, сприяла конверсії $Foxp3^-$ -клітин у $Foxp3^+$ -індуцібельні і T_{reg} -клітини. Крім того, в T_{reg} -клітинах *Adrb2* - сигналізація збільшувала експресію негативної костимуляторної молекули CTLA-4 [115]. Тому, виявлене нами в роботі зниження рівня експресії мРНК *Adrb2* може частково пояснити причину дефіциту супресорної сигналізації, крім резистентності до ГК. Введення агоніста *Adrb2* в дендритні клітини, стимульовані мікробними мурам-дипептидами через активацію рецепторів вродженого імунітету NOD2 і TLR-2 індукувало Т-клітинне диференціювання у напрямку Th17, але не Th1, а співвідношення Th17/Th1 клітин було збільшено. Це відповідає і нашим результатам досліджень, в ході яких було виявлено зростання рівня мРНК основного Th17-залежного цитокіну ІЛ-17 α [183, 187, 263]. Крім того, активація *Adrb2* на макрофагах TLR4-залежним шляхом викликає індукцію Nf- κ B, що регулює експресію генів всіх основних про-запальних цитокінів [170].

Виявлена нами транскрипційна індукція генів прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і ІЛ-17 α , а також Nlr3-інфламасоми відповідає цілому ряду клінічних спостережень, які показали, що ХСС самої різної природи, включаючи соціальну ізоляцію, втрату близьких родичів, низький соціально-економічний статус, загрозливий життю діагноз та інше збільшує експресію прозапальних генів в імунних клітинах (наприклад, *IL1 β* , *IL6*, *IL8*, *IL17A*, *TNF α*), зменшує експресію генів, залучених у вроджені противірусні відповіді (*IFNB*, *IFIs*, *MX*, *OAS*) [75, 76]. Так, Powell D. et al. (2013), вивчаючи транскриптом людей в умовах ХСС, виявив різке посилення активності генів-транскрипційних регуляторів запалення в лейкоцитах (таких як *PU.1*, *IL17A*, *NF- κ B*, *EGR1*, *MZF1*, *NRF2*) [229]. Характерно, що низький соціальний статус і проживання в несприятливих умовах у ранньому віці знижує глюкокортикоїдну і збільшує прозапальну, зокрема, Nf- κ B-залежну сигналізацію [205].

Отримані нами результати опосередковано підтверджуються даними цілого ряду інших дослідників. Так, Gris D. et al. (2010) на мишачій моделі експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) показав значне зростання

рівня експресії мРНК *Nlrp3*, а *Nlrp3*-дефіцитні миші демонструють різке зниження тяжкості перебігу захворювання [113]. Посилення експресії мРНК *Nlrp3* було показано і при запаленні тонкого кишківнику, а також на моделях коліту [102, 220], 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 [201].

На другому етапі роботи ми вивчили особливості розподілу $TLR2^+$ -, $TLR4^+$ - і $Nf-kB^+$ - клітин в різних морфофункціональних зонах КАЛТ. Нами встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості лімфоцитів, які експресують $TLR2$ і 4 типу у КАЛТ щурів (рис. 7.1 А - В). Даний процес був найбільш виражений в ЗЛВ ($TLR2^+$ -лімфоцити) і в ЛФ ($TLR4^+$ -лімфоцити) та призводив до зростання числа $Nf-kB^+$ - клітин: в ЗЛВ – у 1,8 - 2 рази ($p < 0,05$); в СЗ - на 52 – 91 % ($p < 0,05$); в ЛФ - на 89 – 92 % ($p < 0,05$) (рис 7.2 А, D), а також впливав на щільність $TLR2$, $TLR4$ і концентрацію $Nf-kB$ в імунопозитивних клітинах.

Зміни складу кишкової мікрофлори шляхом введення *Кан* експериментальним тваринам супроводжувались загальною тенденцією до зниження кількості $TLR2^+$ -, $TLR4^+$ - і $Nf-kB^+$ - клітин при ХСС2 за винятком ЛФ. При цьому, у лімфоїдному фолікулі загальна кількість $TLR2^+$ - і $TLR4^+$ - лімфоцитів збільшувалась на 75% - у 2,1 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2. Така ж тенденція простежувалась і серед $Nf-kB^+$ - клітин в СЗ, де їх чисельність достовірно зростала на 54% ($p < 0,05$) при ХСС2 (рис.7.1 С - D).

Введення *Лб* стресованим тваринам призводило до зниження сумарної ЩП $TLR2^+$ - лімфоцитів при розвитку ХСС1 і не впливало на їх чисельність за умов ХСС2, в той час як загальна кількість $TLR4^+$ - лімфоцитів переважно збільшувалась (в ЗЛВ - на 46%, ХСС2; в ЛФ - на 43%, ХСС1 і на 49%, ХСС2) (рис. 7.1 Е - F). Також пероральний прийом *Лб* щурами знижував кількість $Nf-kB^+$ - клітин (в ЗЛВ - на 46%, ХСС1 і на 50%, ХСС2; в ЛФ - на 17%, ХСС2) за винятком СЗ (рис. 7.2 С, F), де їх кількість при ХСС1 достовірно збільшувалась (на 29%) і різноспрямовано впливав на концентрацію $Nf-kB$ в імунопозитивних клітинах.

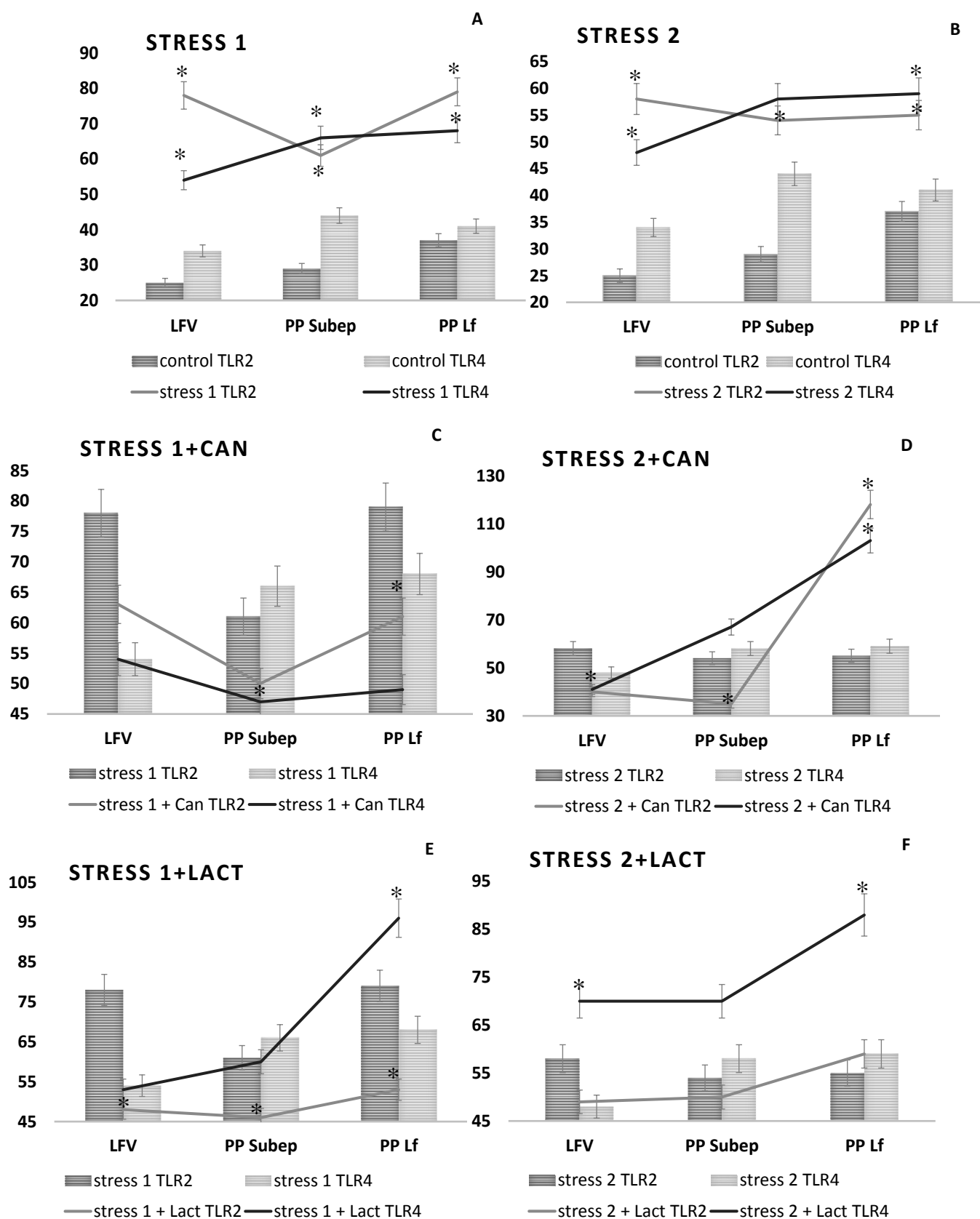


Рис. 7.1. Кількість TLR2⁺- і TLR4⁺- клітин у ЗЛВ (LFV), ЛФ (PP Lf) та СЗ (PP Subep). Note: * - P < 0,05.

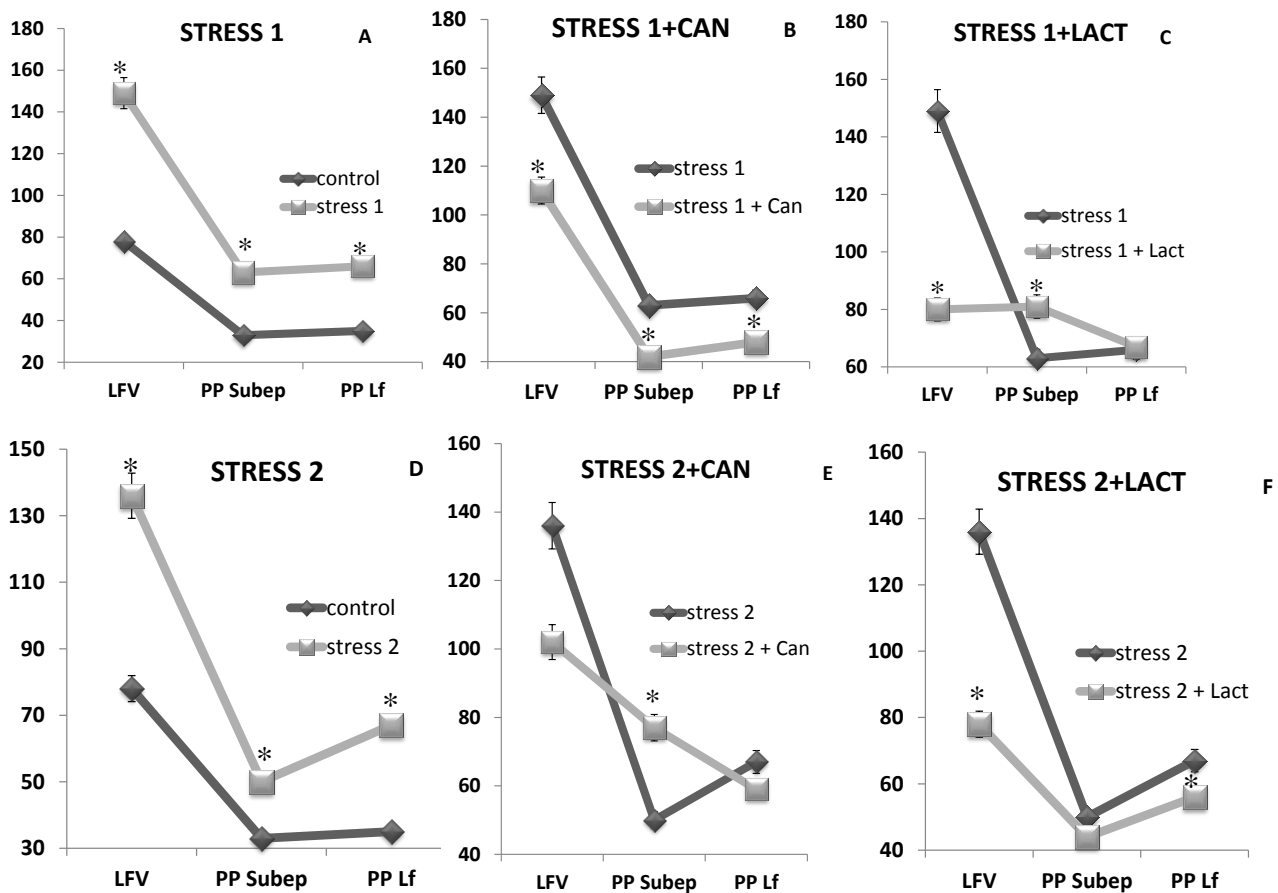


Рис. 7.2. Кількість Nf-kB⁺ - клітин у ЗЛВ (LFV), ЛФ (PP Lf) та СЗ (PP Subep).

Note: * - P < 0,05.

Отримані нами результати збігаються з даними цілого ряду інших дослідників. Так, Bailey M.T. et al. (2007) показали, що вплив SDR підвищував експресію TLR2 і TLR4 [47]. При цьому, середні значення інтенсивності флуоресценції моноцитів/макрофагів селезінки, фарбованих анти-TLR2 антитілами CD11b⁺, була значно вищою у клітинах мишей, підданих впливу SDR, ніж у клітинах HCC-мишей. Крім SDR-індукованого збільшення фарбованих анти-TLR2, середні значення інтенсивності флуоресценції фарбованих анти-TLR4 антитілами CD11b⁺ моноцитів/макрофагів селезінки також було значно вище у мишей, що піддавалися впливу SDR. Миші, позбавлені функціонального TLR4 (тобто, C3H/HeJ миші) не показували SDR-індукованого зростання кліренсу бактерій в селезінці у порівнянні з мишами, які містили функціональний TLR4 (тобто, CD1 і C3H/HeN миші, що

піддавалися впливу SDR) [47, 231]. Крім здатності ХСС викликати активацію TLR, отримані нами результати збігаються з рядом досліджень, які продемонстрували посилення активності транскрипційного фактору Nf-кВ при даному виді стресу. Так, Bierhaus A. (2004) показала, що психосоціальний стрес індукує фактор транскрипції Nf-кВ в мононуклеарних клітинах периферичної крові у здорових добровольців, які проходили соціальний стрес-тест Тріра (Trier social stress test, TSST) [56], а за даними Раса Т. (2006) індуковане TSST збільшення рівня ІЛ-6 і Nf -кВ було вище у депресивних пацієнтів з підвищеним стресом на початку життя і незалежно корелює з тяжкістю депресії у пацієнтів без стресу на початку життя [221].

У даний час клінічна ефективність застосування пробіотичних лактобацил була документально підтверджена для різних умов, у тому числі з профілактики антибіотико-асоційованої діареї, важкого некротизуючого ентероколіту у недоношених новонароджених і пом'якшення симптомів синдрому подразненого кишечника, скорочення тривалості перебігу інфекційних захворювань дихальних шляхів [44]. Незважаючи на велику кількість робіт, що свідчать про протизапальні ефекти Лб [181, 253], цілий ряд питань залишається відкритими: 1) до якої міри ми можемо говорити про найбільш поширені відповіді на різні пробіотичні лактобактерії? 2) чи може прийом Лб стимулювати запалення в кишечнику? 3) якими є нюанси відповіді вродженої та адаптивної імунної системи на Лб в умовах стресу? Адже відомо, що у ряді випадків прийом Лб може посилювати прозапальну сигналізацію і збільшувати ризик розвитку АІЗ, зокрема ревматоїдного артриту, експериментального аутоімунного енцефаліту та ін. Так, моноколонізація нокаутних по антагоністу рецептора ІЛ-1 мишей (IL1RN^{-/-}), у яких спонтанно розвивався аутоімунний Т-клітинно-опосередкований артрит з коменсальним *Lactobacillus bifidus*, приводила до швидкого початку захворювання, у порівнянні за тяжкістю і поширеністю з артритом, який спостерігався у неінфікованих мишей. Артрит, викликаний *L. bifidus* в цій моделі, був обумовлений дисбалансом T_{reg}/Th17-клітин і опосередкований через сигналізацію TLR2/TLR4 [36]. Наші дані показують, що оральний прийом Лб в умовах ХСС може посилювати в окремих зонах експресію TLR, причому TLR4, які не є безпосередніми сенсорами ПАМП лактобацил. Це не

суперечить роботам інших авторів, які продемонстрували, що пероральний прийом *Лб* експериментальними тваринами може активувати експресію TLR2 і TLR4 типів, зменшувати рівень T_{reg} -клітин та підвищувати кількість прозапальних Th17-, Th1-клітин і ІЛ-12 [252]. Так, очищена ЛТА з *L. plantarum str. WCFS1*, *L. plantarum str. KCTC10887*, *Lactobacillus casei str. YIT9029*, *Lactobacillus fermentum str. YIT0159* та *L. acidophilus str. NCFM*, збільшують продукцію фактору некрозу пухлини (TNF) через TLR2 - залежний механізм [60], а за даними Chiba Y. (2010) в клітинах селезінки пробіотик *Lactobacillus casei* індукує вироблення ІЛ-12 CD11b⁺- клітинами сильніше, ніж патогенні грам-позитивні і грам-негативні бактерії та ефективно сприяє розвитку Т-хелперів 1 типу з подальшим високим рівнем секреції IFN- γ [71].

Вивчення балансу між TLR2⁺/TLR4⁺ - лімфоцитамив КАЛТ свідчить про розвиток ХСС з достовірним зростанням співвідношення TLR2⁺/TLR4⁺ - клітин у лімфоїдних структурах клубової кишки щурів з переважанням популяції TLR2⁺-лімфоцитів. Так, коефіцієнт розподілу TLR2⁺/TLR4⁺ - клітин збільшився в ЗЛВ на 97% (p <0,05) на фоні ХСС1 і на 66% (p <0,05) при ХСС2; у СЗ - на 39% (p <0,05) при ХСС1 і на 41 % (p <0,05) у випадку ХСС2; в ЛФ - на 32% (p <0,05) при ХСС1 у порівнянні з контролем. Це свідчить, що в умовах ХСС зростає рівень лігандів для TLR2 (рис. 7.3).

Зміни цього балансу після введення *Кан* експериментальним тваринам носили різноспрямований характер і супроводжувались загальною тенденцією до зниження співвідношення TLR2⁺/TLR4⁺ - клітин в ЗЛВ на 17% (p <0,05) на фоні ХСС1 і на 19% (p <0,05) при ХСС2; у СЗ - на 45% (p <0,05) при ХСС2; однак, даний показник збільшувався в ЛФ - на 21% (p <0,05) при ХСС2. У той же час, співвідношення TLR2⁺/TLR4⁺- клітин після введення пробіотику стресованим щурам односпрямовано знижувалось у всіх вивчених нами морфофункціональних зонах, найбільш інтенсивно - у ЛФ. Так, коефіцієнт розподілу TLR2⁺/TLR4⁺ - лімфоцитів зменшувався в ЗЛВ на 37% (p <0,05) при ХСС1 і на 45% (p <0,05) на фоні ХСС2; у СЗ - на 25% (p <0,05) при ХСС2; в ЛФ - у 2,1 рази (p <0,05) при ХСС1 і на 30% (p <0,05) у разі ХСС2.

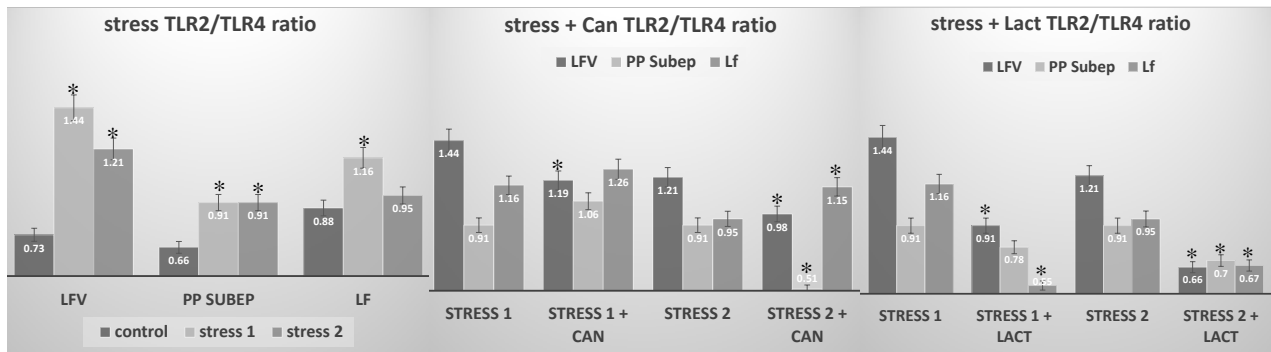


Рис. 7.3. Співвідношення $TLR2^+/TLR4^+$ - лімфоцитів у ЗЛВ (LFV), СЗ (PP Subep) і ЛФ (Lf), *- $p < 0,05$.

Отримані нами дані щодо зміни експресії $Nf-kB$ після застосування *Лб* в умовах ХСС збігаються з рядом робіт, які продемонстрували пригнічення шляху інгібітора ядерного фактору kB ($IkB/Nf-kB$) за допомогою блокування деградації IkB , і, як наслідок, запобігання ядерній транслокації активного димеру $Nf-kB$ і подальшій експресії відповідних генів [45]. У той же час в субепітеліальній зоні ПБ відзначається збільшення загального числа $Nf-kB^+$ - клітин після прийому *Лб* (ХСС1) у порівнянні із стресованими тваринами.

Ряд досліджень показав, що зменшення коменсальної мікробіоти при лікуванні антибіотиками призводить до зниження TLR-сигналізації та пригнічення регуляції вроджених захисних сил [241, 289]. Нещодавно було доведено, що ліквідація кишкових бактерій у 8-тижневих мишей після 3-х тижневого прийому антибіотиків знижувало експресію TLR2 і TLR4 в перитонеальних макрофагах. Тим не менш, згідно наших результатів, застосування АБ, хоча і супроводжується загальною тенденцією до зниження кількості $TLR2^+$, $TLR4^+$ і $Nf-kB^+$ - клітин, проте може збільшувати в окремих зонах їх чисельність і впливати на щільність відповідних рецепторів.

Активація вродженої імунної системи через цитокинові і ко-стимуляторні сигнали призводить до включення адаптивної ланки імунітету. Тому, на наступному етапі роботи ми вивчили розподіл субпопуляцій Т-хелперів у КАЛТ. Нами 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%, $p < 0,05$), зменшував щільність Th2 в СЗ при ХСС1 (на 21%, $p < 0,05$), переважно підвищував концентрацію T-bet і GATA3 в лімфоцитах. Введення *Кан* експериментальним тваринам призводило до зростання кількості T-bet⁺- клітин (на 87%, $p < 0,05$ в ЗЛВ і на 94%, $p < 0,05$ в СЗ) і GATA3⁺- лімфоцитів (на 42% в СЗ, $p < 0,05$) у випадку ХСС1, і не впливало на їх чисельність при ХСС2. При цьому концентрація GATA3 достовірно зменшувалась у лімфобластів і середніх лімфоцитів у ЗЛВ при ХСС1 і зростала в цих же клітинах при ХСС2, а концентрація T-bet зростала у лімфобластів (СЗ за умов ХСС1 і ХСС2) та змінювалась різноспрямовано у середніх лімфоцитів. Введення *Лб* стресованим щурам супроводжувалось зростанням загальної кількості T-bet⁺- лімфоцитів в СЗ (на 50%, $p < 0,05$, ХСС1 і на 25%, $p < 0,05$, ХСС2), зменшувало їх щільність в ЗЛВ (на 24%, $p < 0,05$, ХСС1 і на 30%, $p < 0,05$, ХСС2), не впливало на чисельність GATA3⁺-клітин, а також збільшувало концентрацію T-bet у лімфобластів і GATA3 у середніх лімфоцитів (в ЗЛВ та СЗ при ХСС2).

Виявлені нами зміни експресії T-bet і GATA3 в умовах ХСС можуть суттєво впливати на ризик розвитку імунопатології. Так, в багатьох експериментальних дослідженнях виявлено зв'язок між експресією T-bet і розвитком інших проявів аутоімунної патології, зокрема ЦД 1-го типу, при якому від експресії T-bet залежить диференціювання патогенних CD8⁺T - клітин, а нокаут гену *TBX21* у мишей NOD запобігає маніфестації ЦД [34, 175]. Гіперекспресія T-bet сприяє розвитку у мишей ЗЗК, а також запального артрити [216]. При експериментальному аутоімунному енцефаломієліті і СЧВ підвищено співвідношення експресії T-bet/GATA3, тоді як при їх низькому балансі у мишей формується гіперчутливість бронхів, і розвивається синдром, подібний астматичному, навіть при відсутності алергенів. Між тим, у GATA3^{-/-} мишей знижений рівень IgE, всіх Th2-цитокінів - ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13, зменшений вміст еозинофілів і слизу в дихальних шляхах, а також більш м'який перебіг експериментальної астми. Свідчення зв'язку експресії T-bet і GATA3 та мутацій кодуєчих їх генів з аутоімунною патологією отримані і у людини. Наприклад, підвищена експресія T-bet в Т-клітинах виявлена при целиакії і хворобі

Крона, а також при системному червоному вовчаку [104, 127]. У людини отримані численні свідчення ролі поліморфізму (SNP) гену *TBX21* у розвитку ряду аутоімунних хвороб (ЦД, ревматоїдного артриту), сприйнятливості до інфікування вірусом гепатиту В і контролі за перебігом цього захворювання. Крім того, досліджені асоціації одиничних заміщень нуклеотидів в гені *GATA3* з розвитком алергопатології [141].

Про важливу роль порушень балансу Th1/Th2-клітин та продукуємих ними цитокінів у розвитку стрес-індукованої депресії дискутується у цілому ряді робіт [34, 129, 141, 285], при цьому більшість доказів свідчить про збільшення кількості Th1-клітин як основної ознаки імунної дисфункції при стресі, однак, деякі з них демонструють збільшення продукції Th2. Нещодавні дослідження свідчать, що Tbet пов'язаний із розвитком стрес-індукованої депресії, проте T-bet дефіцитні миші, у яких порушено диференціювання Th1-клітин та продукція Th1-залежних цитокінів (IFN- γ , IL-12, TNF α), демонструють стійкість до стрес-індукованої депресії та запалення у нервовій системі [129, 141, 292]. Таким чином, отримані нами дані свідчать про важливу роль зміни кількості T-bet⁺-клітин у патогенезі розвитку ХСС. Наші результати співпадають з даними Schmidt D. et al. (2010), згідно яких розвиток ХСС у мишей супроводжується дисбалансом Th1/Th2 та Th17/T_{reg}- клітин в периферичних лімфатичних вузлах в бік превалювання субпопуляцій прозапальних Th1 та Th17, та призводить до спонтанного розвитку запального захворювання кишківника [249]. Здатність збільшувати кількість Th1-клітин та Th1-залежних цитокінів, а також експресію їх рецепторів, зокрема IFN- γ R, була продемонстрована і для гострого стресу. Так, Rehm K. et al. (2013) продемонстрували зміни співвідношення Th1/Th2, Tc1/Tc2, числа T_{reg}, продукції IFN- γ , IL-4 і IL-10 у спортсменів в умовах психологічного стресу [238]. Разом з тим, Hou N. et al. (2013) показали, що хронічний стрес може викликати здвиг від Th1 до Th2 - відповіді і провокувати розвиток не тільки запалення, але й пухлин товстої кишки [128]. Даний факт підтверджується і даними Ohno I. (2010) щодо зсуву Th1/Th2 балансу у бік Th2-клітин в умовах індукованої соціальним стресом бронхіальної астми і запалення дихальних шляхів [216].

Пробіотики, зокрема лактобактерії, здатні змінювати склад кишкової мікрофлори, і, таким чином, впливати на рівень Th1/Th2 балансу у КАЛТ. Зокрема, прийом *Lactobacillus reuteri* змінює рівень експресії мРНК транскрипційних факторів Foxp3, GATA3 і Tbet в моноцитах крові новонароджених, знижує ризик розвитку IgE-асоційованої екземи [181]. *Lactobacillus acidophilus La5* і *Lactobacillus casei DN001* здатні зменшувати рівень експресії Ror γ t і T-bet в моноцитах периферичної крові дорослих людей, підвищувати експресію Foxp3, проте не впливають на рівень GATA3 і продукцію цитокінів TNF α і TGF β [293]. Chiba E. et al. (2010) продемонстрували, що *L. rhamnosus CRL1505* підвищує резистентність BALB/c мишей до респіраторно-сінцитіального вірусу завдяки стимуляції генерації IFN γ -продукуючих Th1-клітин і редукції Th2-відповіді [71]. Здатність збільшувати експресію цитокінів IL-12 і IFN- γ у Пейєрових пляшках мишей була встановлена для *Lactobacillus plantarum 06CC2* [56]. Прийом мишами *L. casei YIT9029*, *L. casei HY7201*, *L. brevis HY7401* чи *L. plantarum HY20301* переважно збільшував продукцію IL-12 і IFN- γ , знижуючи при цьому рівень Th2-залежних цитокінів IL-4 і IL-5 [60, 71, 252]. Можливість *L. plantarum str. YU* активувати Th1 - відповідь і продукцію IL-12 мишиними перитонеальними макрофагами, а також стимулювати активність NK-клітин і продукцію IgA клітинами селезінки і ПБ, частково пов'язують з активацією TLR2 [253]. Аналіз ефектів семи видів Лб на лімфоцити селезінки показав їх здатність збільшувати баланс клітин Th1/Th2 у бік Th1 через підвищення співвідношення секреції їх цитокінів IFN- γ /IL-4. Chiba Y. et al. (2010) продемонстрували, що *Lactobacillus casei* збільшують продукцію IL-12 клітинами селезінки і ПБ мишей навіть сильніше, чим деякі патогенні бактерії, що, в свою чергу, стимулює утворення Th1-клітин та продукцію прозапального IFN- γ [71]. Схожі дані були отримані Shida K. et al. (2011), який довів, що здатність *Lactob. casei* стимулювати диференціювання Th1 пов'язана з деякими полісахаридами їх клітинної стінки, зокрема PS-1 і PS-2 [252]. Дані ефекти супроводжуються незначним зниженням продукції IL-17, не впливаючи при цьому на кількість Th17-клітин, а також не збільшують щільність Foxp3⁺T_{reg} та продукцію ними супресорних цитокінів IL-10 і TGF- β . Тобто в даних дослідженнях, безсумнівно, превалюють

прозапальні ефекти ПБ, що корелює і з нашими даними по збільшенню кількості T-bet⁺-клітин в СЗ після введень Лб.

В свою чергу, прийом АБ є одним з факторів ризику розвитку в подальшому запальних і АІЗ, зокрема ЦД 1 або 2 типу, хвороби Крона та інших ЗЗК, а оральний прийом аміноглікозидів використовується як експериментальна модель кишкового дисбіозу та запальних захворювань кишківнику [100, 241, 287, 289]. Ряд досліджень продемонстрував здатність АБ порушувати баланс між Th1, Th2, Th17 і T_{reg}-клітинами у експериментальних тварин та людей і впливати на продукцію їх цитокінів, переважно збільшуючи співвідношення Th1/Th2 [241], що корелює з нашими даними по зростанню кількості T-bet⁺-клітин в умовах ХСС1. Між тим, є і протилежні результати, згідно яких, пероральне введення *Кан* стимулює Th2-поляризацію наївних лімфоцитів у BALB/c – мишей та підвищує у них ризик розвитку алергічних захворювань [247], що також співпадає з нашими результатами щодо збільшення числа GATA3⁺- клітин в СЗ при ХСС1.

Основним регулятором диференціювання про-запальних Th17-клітин та частки “вроджених” (ВЛК) Rorγt - лімфоцитів є транскрипційний фактор Rorγt. Тому, на наступному етапі ми з’ясували розподіл Rorγt- експресуючих клітин у КАЛТ щурів, а враховуючи велику кількість ВЛК в LFV, ми застосували і метод подвійної імуофлюоресценції, що дозволило ідентифікувати клітини, ко-експресуючі Rorγt і CD8-антигени, які є маркерами цитотоксичних лімфоцитів та рецепторами до молекул МНСІ. При цьому виявилось, що 44 % Rorγt⁺-клітин є ще й імунопозитивними по CD8, сумарна щільність таких Rorγt⁺CD8⁺- лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ЗЛВ контрольних щурів становила 36± 7 на 1 мм².

Нами доведено, що Rorγt⁺- експресуючі клітини є важливим компонентом цитоархітектоніки ЗЛВ. Взагалі, популяція Rorγt⁺- клітин характеризується вираженою гетерогенністю і включає в себе не тільки Th17-клітини, але й групу “вроджених” ІЛ-17-синтезуючих клітин, у тому числі γδТ-лімфоцитів, а також субпопуляцію цитотоксичних лімфоцитів (Tc17cell). Розвиток ХСС призводить до збільшення кількості Rorγt⁺ - (на 94% - у 2,1 рази) та Rorγt⁺CD8⁺- лімфоцитів (у 2,1 -

2,3 рази) в ЗЛВ у порівнянні з контролем і супроводжується зростанням концентрації *Roryt*.

Таким чином, частина виявлених нами *Roryt*-експресуючих лімфоцитів, можливо, не є Th17 клітинами. Враховуючи ко-експресію *Roryt* і CD8, із великою ймовірністю можна стверджувати, що частина з них це $\gamma\delta$ T-лімфоцити – мінорна МНС - нерестрікована популяція лімфоцитів, яка, на відміну від $\alpha\beta$ T-клітин, не активується пептидними антигенами, що презентуються молекулами МНСІ і МНСІІ класів, але здатна відповідати на небілкові антигени, зокрема, фосфоантигени - низькомолекулярні непептидні сполуки, які містять фосфатну або пірофосфатну групи, вони постійно експресуються в бактеріальних, рослинних і тваринних клітинах [259, 264]. Причому, дана популяція клітин здатна виявляти як цитотоксичні та прозапальні ефекти за рахунок продукції цитокінів TNF α , IFN- γ і синтезу перфोरину, гранзімів, гранулізіну, сергліцину, катепсину С, так і виконувати імунорегуляторну функцію, впливаючи на активність дендритних клітин, макрофагів, $\alpha\beta$ T-клітин, гранулоцитів, NK-клітин, продукцію аутоантитіл та регулюючи репарацію епітелію у кишківнику [284]. І, нарешті, ще однією субпопуляцією *Roryt*-експресуючих лімфоцитів з фенотипом *Roryt*⁺CD8⁺ можуть бути, так звані, цитотоксичні ІЛ-17-секретуючі лімфоцити (Tc17cell), які характеризуються інтенсивною продукцією IFN- γ , більш низьким рівнем синтезу гранзімів і перфोरину на відміну від “класичних” Т-кілерів (Tc1 і Tc2), і здатні, як і Th17 - клітини, виступати у ролі тригерів запальних та АІЗ [157, 249]. Таким чином, зв'язок *Roryt* з диференціюванням Th17-клітин представляється безсумнівним, але функції цього фактору реалізуються також за межами даної субпопуляції.

Виявлені нами зміни експресії *Roryt* в умовах стресу можуть бути одним з тригерів розвитку ЗЗК й АІЗ. Так, відомо, що нокаут гену *RORyt* призводить до втрати здатності CD4⁺T-клітин диференціюватися у Th17-клітини і їх здатність до вироблення ІЛ-17 різко послаблюється. У мишей із такою патологією неможливо індукувати аутоімунні процеси [239, 262]. Навпаки, ектопічна експресія *Roryt*⁺ викликає диференціювання Th17-клітин, причому половина *Roryt*⁺- клітин починає спонтанно секретувати ІЛ-17 [56, 89]. Встановлена патогенетична роль Th17-клітин

та продукованих ними цитокінів у розвитку аутоімунної та запальної патології, насамперед аутоімунного коліту, хвороби Крона, розсіяного склерозу (модель на мишах – експериментальний аутоімунний енцефаломієліт) [34, 262]. Саме Th17 клітини є одними з основних індукторів ЗЗК.

Отримані нами результати співпадають з даними Hong M. et al. (2013), згідно яких, при розвитку стресу та стрес-індукованої депресії в лімфоїдних органах у мишей змінюється кількість Th17-лімфоцитів та порушується баланс між Th17/T_{reg}-клітинами [127]. Так само Schmidt D. et al. (2010) показали, що ХСС призводить до активації імунної системи, стимулює диференціювання прозапальних Th17- і Th1-клітин у периферичних лімфатичних вузлах експериментальних тварин, знижує кількість T_{reg} лімфоцитів та викликає спонтанний розвиток стрес-індукованого коліту [249].

Характерно, що Th17-клітини можуть посилювати розвиток стресу та провокувати розвиток депресивно-подібного стану. Так, Beurel E. et al. (2012) довели, що кількість Th17-лімфоцитів збільшено у головному мозку мишей при стресі, тоді як застосування інгібіторів Rorγt – SR1001 або анти-IL-17 антитіл підвищують їх стійкість до розвитку депресії [55]. Таким чином, виявлене нами збільшення кількості Th17-клітин при розвитку ХСС, в свою чергу, може посилювати й підтримувати прогресування стресу та депресії, формуючи, таким чином, своєрідне “порочне коло” (стрес-Th17-стрес).

Незважаючи на те, що клітини Th17 звичайно асоціюються з хронічними запальними та аутоімунними хворобами, дана популяція також має безліч корисних функцій, тому що вони забезпечують захисну бар'єрну функцію слизової оболонки кишечника проти патогенів і підтримують репарацію епітелію. Крім того, нещодавні дослідження свідчать, що клітини Th17 можуть також набувати імуносупресивні функції (регуляторний фенотип - rTh17) і приймати участь у захисті від запальних і аутоімунних хвороб за допомогою продукції супресорних цитокінів, характерних для T_{reg} клітин [179, 210, 244].

Th17-клітини в кишківнику функціонують як “прикордонний патруль”, що забезпечує захист насамперед від позаклітинних бактерій. Однак, ситуація

ускладнена тим, що кишківник також містить величезну кількість коменсальних бактерій, які вигідні для господаря, а також широкий спектр харчових антигенів. Ця велика сукупність чужорідних антигенів може потенційно активізувати різні субпопуляції Т-хелперів, викликаючи ЗЗК. Характерно, що саме тонкий кишківник, особливо клубова кишка є основним резервуаром пулу Th17 клітин, тому що саме тут відбувається індукція їх диференціювання з наївних Т-лімфоцитів за участю сегментарних ниткоподібних бактерій (*segmented filamentous bacteria, SFB*) [127]. Рецептори для цитокінів Th17-клітин ІЛ-17А, ІЛ-17F, ІЛ-22 широко представлені в епітеліоцитах кишківника, тому клітини Th17 забезпечують перехресний зв'язок між імунною системою та кишковою тканиною. ІЛ-17А й ІЛ-17F забезпечують інтенсивне залучення нейтрофілів до вогнища запалення, а також стимулюють продукцію β-дефензінів клітинами Панета, таким чином активізуючи багаторівневу антибактеріальну відповідь. ІЛ-22, крім стимуляції продукції антимікробних пептидів (АМП), викликає інтенсивну проліферацію епітеліоцитів, їх виживання і репарацію тканин кишківника [157, 262].

У якості основної протидії прозапальним Th1- і Th17 клітинам виступають супресорні Т-регуляторні клітини (T_{reg}), які експресують CD25 (α-ланцюг рецептору ІЛ-2, ІЛ-2Rα) і транскрипційний фактор Foxp3. Нами встановлено, що розвиток стресу супроводжувався зниженням сумарної щільності CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів в ЗЛВ, більш вираженим у випадку ХСС2 (на 51,3%, $p < 0,05$), призводив до збільшення щільності CD25-рецепторів на клітинній мембрані та зменшення концентрації транскрипційного фактору Foxp3 в імунопозитивних клітинах. Введення *Кан* стресованим щурам не впливало на загальну кількість CD25⁺Foxp3⁺-лімфоцитів і структуру їх популяції в ЗЛВ, тоді як модуляція кишкової мікрофлори за допомогою *Лб* призводить до підвищення кількості T_{reg} -клітин на 33 – 66% ($p < 0,05$) при збільшенні в них концентрації білка Foxp3.

Результати робіт інших дослідників також свідчать, що розвиток соціального стресу може знижувати кількість T_{reg} -клітин і посилювати про-запальну сигналізацію [16, 41, 188]. Крім того, вимкнення T_{reg} шляхом застосування анти-CD25 МКАТ посилює розвиток стресу і модулює тривожність й депресивно-

подібний стан у мишей, а також збільшує в їх плазмі крові концентрацію прозапальних цитокінів ІЛ-6, TNF α , IFN- γ , ІЛ-17А [122]. Li Y. et al. (2010) показали, що у пацієнтів з депресією кількість CD4⁺CD25⁺-T_{reg} - клітин в крові знижена [178]. Таким чином, зменшення кількості регуляторних лімфоцитів при стресі, в свою чергу, може ще більше посилювати його перебіг (стрес-дефіцит T_{reg}- посилення стресу). Дані ефекти ХСС на популяцію T_{reg} реалізуються, на наш погляд, через зміни складу кишкової мікрофлори. Відомо, що ХСС змінює склад мікрофлори кишківника. Так, Bailey M. et al. (2011) продемонстрували методом піросеквенування, що у експериментальних тварин, які піддавалися дії соціального стресу, спостерігалось значне зниження бактерій - представників роду *Bacteroides* і збільшення представників роду *Clostridium* [46]. Крім цього, ХСС активує вроджену імунну систему, стимулює продукцію прозапальних цитокінів ІЛ-6 і TNF α та індукує бактеріальну транслокацію у КАЛТ людини та експериментальних тварин [47, 48, 50, 231]. Одним з можливих механізмів такого стимулюючого впливу ХСС може бути активація адреналін/норадреналінової (AI-3) системи кворум-сенсінгу (QS), активність якої була виявлена у багатьох представників інтестинальної мікрофлори [258]. Виявлення агоністичних взаємодій AI-3 QS-системи з адреналіном і норадреналіном дозволяє припустити наявність у бактерій досить специфічних механізмів рецепції сигнальної інформації організму хазяїна [17, 31, 258]. Можливо, катехоламіни, які синтезуються в умовах ХСС, виступають в ролі лігандів для рецепторів QS- системи AI-3 бактерій, що сприймається як сигнал, який свідчить про достатню для атаки щільність бактеріальної популяції та індукує їх транслокацію у КАЛТ з гіперактивацією спочатку вродженої, а потім адаптивної імунної системи [182]. Крім того, зміни складу мікрофлори впливають на експресію клітинами КАЛТ ферменту індоламін-2,3-діоксигенази (IDO), який індукує катаболізм триптофану в проапоптотичні метаболіти (наприклад, кінуренин), здатні пригнічувати активацію ефекторних Т-клітин. Виявлена здатність IDO-експресуючих клітин керувати диференціюванням наївних CD4⁺T - лімфоцитів у Foxp3⁺T_{reg}, а також їх спроможність безпосередньо активувати дозрівання T_{reg} та

попереджувати індуковану запаленням конверсію T_{reg} -клітин у прозапальні субпопуляції Т-хелперів: Th17- і Th1-клітини [294, 295].

Багатьма дослідженнями доведено здатність ЛБ збільшувати кількість Т-регуляторних клітин і, таким чином, попереджати розвиток запальних та АІЗ, зменшувати стан депресії і тривоги в умовах стресу [106]. Підвищуючи рівень T_{reg} , ЛБ чинять антидіабетогенну дію в умовах стрептозотоцин-індукованого діабету та у *BB-DP* щурів шляхом індукції $CD4^+CD25^+Foxp3^-$ клітин, зменшують ризик розвитку хвороби Крона та виразкового коліту [243, 252]. Однак, з іншого боку, такий їх імуносупресивний ефект може сприяти розвитку інфекційних та онкологічних захворювань, а багато досліджень з впливу ЛБ на імунну систему лобіюється фірмами-виробниками ПБ. Це підтверджується і деякими даними, що свідчать про можливість ЛБ підвищувати ризик розвитку АІЗ, зокрема ревматоїдного артриту, експериментального аутоімунного енцефаліту та ін. Зокрема, оральний прийом ЛБ експериментальними тваринами може активувати експресію TLR2 і TLR4 типів, зменшувати рівень T_{reg} -клітин та підвищувати кількість прозапальних Th17- і Th1-клітин та ІЛ-12 [36, 71, 181, 243]. Chiba Y. et al. (2010) довели, що *Lactobacillus casei* збільшують продукцію ІЛ-12 клітинами селезінки і ПБ мишей [71]. Тобто, неконтрольований прийом ЛБ здатен чинити й імуностимулюючу дію та бути одним із тригерів розвитку АІЗ. Крім того, ЛБ здатні впливати на кількість основних регуляторів диференціювання наївних Т-клітин у прозапальні Th17-клітини - сегментарні ниткоподібні бактерії (*SFB*) та *Bacteroides fragilis*, які стимулюють утворення T_{reg} клітин і продукцію супресорного цитокіну ІЛ-10, тобто є одними з важливих регуляторів балансу Th17/ T_{reg} у КАЛТ [136, 292]. Отримані нами дані свідчать про можливість Лб збільшувати кількість $CD25^+Foxp3^-$ лімфоцитів в умовах ХСС і, таким чином, попереджати розвиток аутоімунних і запальних захворювань. При цьому введення *Кан* в умовах ХСС не впливало на кількість $CD25^+Foxp3^-$ лімфоцитів і будову їх популяції в ЗЛВ, хоча й призводило до зростання концентрації білка Foxp3.

Загалом, аналіз зміни балансу субпопуляцій Т-хелперів у КАЛТ показав, що розвиток ХСС не впливав на співвідношення $T-bet^+/GATA3^-$ клітин в ЗЛВ клубової

кишки щурів і призводив до достовірного підвищення даного коефіцієнта у СЗ (на 75%, $p < 0,05$ при ХСС1 і на 46%, $p < 0,05$ на фоні ХСС2) у порівнянні з контрольною групою тварин (рис. 7.4 А). Поряд з цим, при розвитку ХСС простежується загальна тенденція до достовірного зниження співвідношення $T_{reg}/Th17$ - лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки щурів, яка найбільш виражена в ЗЛВ. Так, коефіцієнт розподілу $Foxp3^+/Roryt^+$ - клітин зменшився в ЗЛВ у 4,1 рази ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 3,5 рази ($p < 0,05$) за умов ХСС2; у СЗ - на 39% ($p < 0,05$) при ХСС1 і у 3,8 рази ($p < 0,05$) на фоні ХСС2 у порівнянні з контролем (рис. 7.4 D).

Дані зміни свідчать про домінування в умовах ХСС Th1- і Th17- диференціювання, що підвищує рівень прозапальної сигналізації в кишечнику. Отримані нами результати збігаються з даними інших дослідників, які свідчать про те, що при розвитку стресу і стрес-індукованої депресії у лімфоїдних органах мишей змінюється кількість Th17- лімфоцитів, і порушується баланс між Th17/ T_{reg} - клітинами [292]. Також Schmidt D. et al. (2010) показали, що ХСС призводить до активації імунної системи, стимулює диференціювання прозапальних Th17- і Th1- клітин у периферичних лімфатичних вузлах експериментальних тварин, знижує кількість T_{reg} -лімфоцитів і викликає спонтанний розвиток стрес-індукованого коліту [249].

Введення *Кан* стресованим тваринам призводило 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 впливало на цей баланс при ХСС2 (рис. 7.4 В). Аналогічний ефект спостерігався і при вивченні співвідношення $Foxp3^+/Roryt^+$ - клітин. 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 ($p < 0,05$) за умов ХСС2, у СЗ - на 61% ($p < 0,05$) тільки у разі ХСС2 (рис. 7.4 Е). Таким чином, не зважаючи на домінування Th1 - субпопуляції після введення *Кан* стресованим тваринам, спостерігається і одночасне відносне збільшення числа T_{reg} - клітин, здатних нівелювати їх ефекторні функції. При введенні *Лб* експериментальним тваринам зміни у співвідношенні $Tbet^+/GATA3^+$ - 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 та

підвищувався у СЗ на 29% ($p < 0,05$) при ХСС1 і на 24% ($p < 0,05$) у разі ХСС2 (рис. 7.4. С). У той же час, співвідношення $\text{Foxp3}^+/\text{Ror}\gamma\text{t}^+$ - клітин після введення ПБ стресованим щурам односпрямовано збільшувалось в усіх вивчених нами морфофункціональних зонах, найбільш інтенсивно - у ЗЛВ. Так, коефіцієнт розподілу $\text{T}_{\text{reg}}/\text{Th17}$ - 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 (рис. 7.4. F).

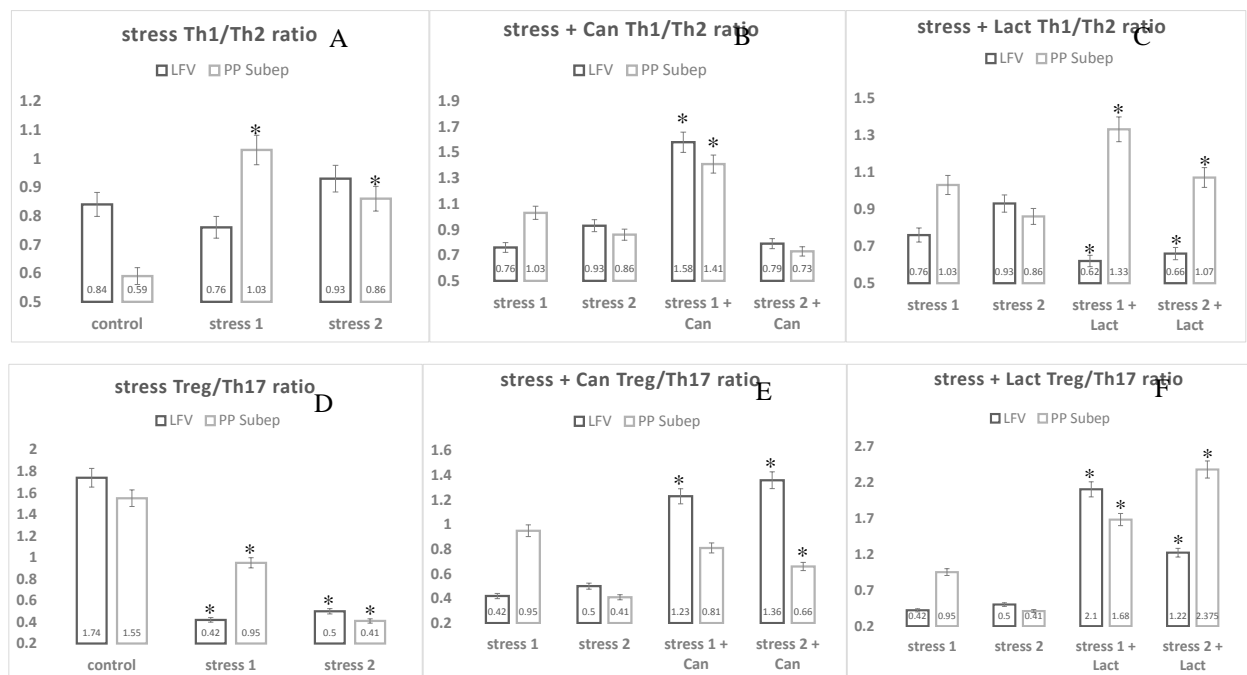


Рис. 7.4. Співвідношення $\text{T-bet}^+/\text{GATA3}^+$ - лімфоцитів ($\text{Th1}/\text{Th2}$) і $\text{Foxp3}^+/\text{Ror}\gamma\text{t}^+$ - лімфоцитів ($\text{T}_{\text{reg}}/\text{Th17}$) в ЗЛВ (LFV) та СЗ (PP Subep),* - $p < 0,05$.

Важливими регуляторами процесингу власних і мікробних антигенів є імунні протеасоми (імунопротеасоми, ІМП) LMP7 ($\beta 5i$), LMP2 ($\beta 1i$) і MECL-1 ($\beta 2i$), які ефективно генерують імунодомінантні епітопи у місцях запалення [32, 40]. В АПК, таких як макрофаги і дендритні клітини, імунні протеасоми беруть участь в активації “наївних” Т-лімфоцитів у цитотоксичні Т-лімфоцити. Однак, про особливості експресії ІМП в самих лімфоцитах відомо вкрай мало. Тому на наступному етапі ми вивчили розподіл LMP2^+ - лімфоцитів у кишково-асоційованих

лімфоїдній тканині щурів лінії Вістар в умовах ХСС і при модуляції складу кишкової мікрофлори. Нами встановлено, що розвиток ХСС супроводжувався односпрямованою тенденцією щодо збільшення загальної кількості LMP2⁺-лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки щурів, найбільш вираженою в ЗЛВ. Так, ЩП LMP2⁺- клітин в ЗЛВ зросла у 3,2 рази (p <0,05) при ХСС1 і у 2,5 рази (p <0,05) на фоні ХСС2; в ЛФ - у 3,3 рази (p <0,05) при ХСС1 і на 60 % (p <0,05) при ХСС2; в СЗ - у 2,6 рази (p <0,05) при ХСС1 і на 46% (p <0,05) на фоні ХСС2. Введення *Кан* супроводжувалось збільшенням загальної кількості LMP2⁺ - лімфоцитів, достовірно вираженим 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). Введення *Лб* призводило до збільшення сумарної ЩП LMP2⁺ - лімфоцитів лише у ЛФ при ХСС2 (на 35%, p<0,05).

Виявлені нами зміни експресії LMP2 в умовах ХСС можуть суттєво впливати на ризик розвитку імунопатології. У багатьох експериментальних дослідженнях виявлено зв'язок між підвищеною експресією LMP2 і розвитком запальних і аутоімунних захворювань, зокрема, ЦД 1 типу, ревматоїдного артриту, неспецифічного виразкового коліту [51], хвороби Крона [282], запальних захворювань кишечника [98], а використання інгібіторів ІМП покращує їх перебіг. Зокрема, реакція цитотоксичних лімфоцитів (CTL) на *M45*, імунодомінантний епітоп у цитомегаловірус-інфікованих мишей помітно знижена у нокаутних по LMP7/β5i тварин [132]. Також, відповіді CTL на 2 доміантних епітопу вірусу грипу *NP366-374* і *PA224-233* у мишей лінії В6 сильно скорочені у LMP2/β1i - дефіцитних мишей. Однак, є і протилежні дані, що свідчать про відсутність суттєвих змін загальних відповідей CTL на вірусні епітопи у експериментальних тварин, позбавлених ІМП. Так, LMP2/β1i- або LMP7/β5i-дефіцитні миші, інфіковані вірусом лімфоцитарного хориомеїнігиту не показали помітних відмінностей у вірусному навантаженні і кількості відповідей CTL у порівнянні з мишами дикого типу [214], однак, виживаність Т-лімфоцитів у них значно змінювалася [206]. Ці результати показують, що процесинг антигенів, мабуть, не є основною біологічною функцією ІМП і вони активно беруть участь і в інших видах регуляції імунної відповіді. Так,

ряд досліджень продемонстрував ключову роль ІМП в регуляції продукції цитокінів імунними клітинами. Зокрема, дендритні клітини у *LMP2/β1i*-дефіцитних мишей, інфікованих вірусом грипу, продукували нижчий рівень цитокінів $IFN\alpha$, ІЛ-1 β , ІЛ-6 і $TNF-\alpha$ у порівнянні з мишами дикого типу, що свідчить про важливу роль ІМП у вродженій імунній відповіді [123]. Крім того, у *LMP2^{-/-}*-мишей спостерігається цілий ряд інших імунних порушень, які зачіпають, насамперед, В-лімфоцити і ДК, а саме: зниження продукції противірусних АТ, зміну кількості і виживання В-лімфоцитів селезінки, функцій Т-хелперів і секреції цитокінів [123]. Необхідно зазначити, ці дефекти, зумовлені не зміною рівня деградації білків, а пов'язані з порушенням *Nf-kB*-сигналізації у *LMP2/β1i* - дефіцитних клітинах. Було також доведено, що селективне інгібування $\beta5i$ субодиниці ІМП за допомогою специфічного інгібітору *PR-957* блокує виробництво ІЛ-23 у моноцитах і $TNF\alpha$ та ІЛ-6 у Т-клітинах [209]. Аналогічна тенденція спостерігалась і в тваринних моделях аутоімунних захворювань, таких як експериментальний коліт і ревматоїдний артрит, в яких інгібування $\beta5i$ за допомогою *PR-957* [51] або шляхом генетичного нокауту у *LMP7/β5i*- мишей [249] призводило до зниження продукції про-запальних цитокінів та редукції запалення і проявів захворювання. Введення більш високої дози *PR-957* блокувало $\beta1i$ і $\beta2i$ субодиниці ІМП, викликаючи ще більш виражене зниження виробництва $TNF-\alpha$ і ІЛ-6, що є безсумнівним доказом участі цих двох субодиниць у регуляції продукції цитокінів.

Однак, основні механізми, за допомогою яких ІМП активує специфічні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, такі як *Nf-kB*, ефективніше, ніж стандартна протеасома, залишаються неясними. Висловлено припущення, що переважання експресії ІМП щодо стандартної протеасоми в імунних клітинах може сприяти переважно активації сигналізації *Nf-kB* в місці запалення, можливо, за рахунок більш ефективного розщеплення *IkB* - необхідної умови для активації *Nf-kB*. При цьому дефіцит ІМП модифікує як класичні, так і альтернативні шляхи активації *Nf-kB* [186]. Крім того, дослідження показали участь ІМП в диференціюванні, виживанні і проліферації Т-клітин. Введення *PR-957* перешкоджає індукції за допомогою ІЛ-6 і $TGF-\beta$ $CD4^+$ Т-клітинному диференціюванню у напрямку $Th17$ -

клітин. Припускають, що ІМП беруть участь у процесингу необхідних для цього диференціювання факторів. Ці висновки були підтверджені *in vivo*, коли інгібування або дефіцит ІМП призводив до зниження експансії Th1 і Th17-клітин, тоді як сприяв розвитку T_{reg} при експериментальному коліті, індукованому DSS [146]. У таких LMP7^{-/-} або LMP2^{-/-} дефіцитних мишей, яким індукували DSS-коліт виявлялася підвищена стійкість до розвитку запалення, деструкції тканин, спостерігалась низька кількість інфільтруючих кишково тканину Th17 клітин, і, відповідно, низька активність про-запальних цитокінів, таких як TNF α і ІЛ-1 β . Інгібування ІМП знижує виробництво ІЛ-17 і рівень м-РНК транскрипційного фактору Ror γ t, регулюючого диференціювання Th17. Suzuki E. et al. (2011) виявили, що експресія Foxp3 і TGF- β збільшилась у T_{reg} -клітинах, підданих впливу PR-957, а на виробництво ІЛ-4 Th2 клітинами така блокада ІМП не впливала [265]. Цікаво, що підвищена експресія FoxP3 була відзначена не тільки у T_{reg} , але і у Th0 та Th1 клітинах, підданих впливу PR-957. Інгібування ІМП знижує фосфорилування STAT1 і STAT3 відповідно у Th1 і Th17 - клітинах [265]. Крім того, дефіцит β 2і призводить до підвищення співвідношення CD4⁺/CD8⁺ Т - клітин, імовірно, через власні регуляторні механізми, не пов'язані з процесингом антигенів. Було показано зміну проліферації Т- клітин з дефіцитом імунних субодиниць MECL-1 і LMP7 [69]. Тим часом, LMP2 нокаут не впливав на проліферацію В - і CD4⁺ Т - клітин після активації їх такими митогенами, як ЛПС або ConA, однак, змінював їх виживання [123].

Стреси різної етіології можуть призводити до порушення фолдингу білків і індукувати розвиток стресу ендоплазматичного ретикулуму (ER stress, CEP). Серед 3 основних систем відповіді на не згорнуті білки (unfolded protein response, UPR) надзвичайно важливе значення має сигнальна система IRE1-XBP1 [111]. Транскрипційний фактор XBP1 є відповідальним за регуляцію експресії великої кількості генів, причетних до правильного згортання та дозрівання протеїнів, деградації неправильно згорнутих протеїнів [163, 194], а зміни його експресії можуть суттєво впливати на ризик розвитку захворювання і прогресуванні запальних і аутоімунних захворювань, зокрема ЦД 1 типу, ревматоїдного артриту, неспецифічного виразкового коліту [159, 165, 270-272]. Про характер експресії

даного білка лімфоцитами КАЛТ нічого не відомо. Тому, на наступному етапі даної роботи ми вивчили особливості експресії ХВР1 лімфоцитами тонкої кишки щурів лінії Wistar в умовах ХСС і при модуляції складу кишкової мікрофлори.

Ми з'ясували, що лімфоцити КАЛТ активно експресують ХВР1: найбільша кількість ХВР1⁺ - клітин локалізована у ЛФ, найменша - у ЗЛВ. Серед ХВР1⁺ - клітин переважають ХВР1⁺- малі лімфоцити, на частку яких припадає від 60% (у ЗЛВ) до 68% (у ЛФ) від загальної кількості ХВР1⁺ - клітин. Розвиток ХСС супроводжувався односпрямованою тенденцією щодо зниження загальної кількості ХВР1⁺- лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки, найбільш вираженої в ЛФ. Так, ЩП ХВР1⁺- лімфоцитів у ЗЛВ знижувалась на 31% (ХСС1) – 35% (ХСС2) ($p < 0,05$), в СЗ згрупованих лімфоїдних вузликів – на 47% (ХСС2) – 58% (ХСС1) ($p < 0,05$), в ЛФ – у 2,5 (ХСС2) - 3 рази (ХСС1) у порівнянні з контролем. Введення *Кан* експериментальним тваринам надавало більш виражений вплив на експресію ХВР1 лімфоцитами КАЛТ у разі ХСС1. Так, його пероральний прийом не впливав на сумарну ЩП ХВР1⁺ - лімфоцитів у ЗЛВ, але призводив до збільшення їх числа у СЗ на 41% ($p < 0,05$) при ХСС1 і сприяв інтенсивному зростанню їх кількості у 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 у разі ХСС2. Зокрема, ЩП ХВР1⁺- лімфоцитів у тварин, підданих дії ХСС1, збільшувалась лише у ЛФ (на 97%, $p < 0,05$), тоді як під дією ХСС2 їх кількість зростала вже у всіх вивчених морфофункціональних зонах: у ЗЛВ - на 70% ($p < 0,05$), у СЗ – на 63% ($p < 0,05$), у ЛФ – у 2 рази ($p < 0,05$).

Відомо, що зміна експресії ХВР1 може бути тригером розвитку запальних і АІЗ [159, 165]. Нещодавно було виявлено наявність важливого зв'язку між внутрішньо-клітинним стресом ЕПР і органоспецифічним запаленням у кишечнику [162, 165]. Зокрема, було показано, що виключення ХВР1 в епітеліальних клітинах мишей призводить до спонтанного розвитку запалення у тонкому кишечнику, включаючи формування абсцесів крипт, лейкоцитарну інфільтрацію та явні виразки. Примітно, але навіть видалення одного алеля ХВР1 було достатньо, щоб викликати розвиток спонтанного ентериту у значній кількості тварин [236]. Крім того,

гіпоморфний XBP1 з втратою одного алеля також призводив до дисфункції клітин Панета і підвищеної чутливості до DSS - індукованого коліту у мишей, а видалення обох алелів призводило до апоптозу клітин Панета [165, 236]. Більш ранні дослідження на людях показали аналогічні результати. При цьому стрес ЕПР може бути основною причиною запального процесу в кишечнику (наприклад, як це спостерігалось у XBP1^{-/-} мишей) або наслідком запалення (наприклад, як у IL-10^{-/-} мишей) [165], а пацієнти з хворобою Крона і виразковим колітом, продемонстрували зниження рівня XBP1 [20, 104]. Також декілька повногеномних досліджень вказували на зв'язок між ЗЗК і областю генома фізично близького до генів XBP1 і IRE1β [159, 189, 190]. Секвенуванням визначені нові рідкісні однонуклеотидні поліморфізми (SNP) у XBP1, що поряд з іншими екологічними та генетичними факторами ризику, можуть давати схильність або індукувати ЗЗК. Однак, незважаючи на безумовну важливість змін експресії XBP1 епітеліальними клітинами кишечника у розвитку патології, в даний час цілий ряд робіт показали здатність даного транскрипційного фактора регулювати реакції вродженого і адаптивного імунітету [162, 164, 189, 190, 236]. Нещодавно було показано, що сигналізація через TLR активує IRE1/XBP1 шлях, і це має вирішальне значення для імунного захисту організму [159]. Як було зазначено у I-му розділі, TLR – висококонсервативні рецептори, які розпізнають патоген-асоційовані молекулярні паттерни і сигнали небезпеки. При стимуляції *in vitro* макрофагів агоністами TLR2 (Pam3CSK4) і TLR4 (LPS), активується IRE1/XBP1 шлях незалежно від інших механізмів UPR та у відсутності стресу ЕПР [190]. Цікаво, що обробка активованих макрофагів ЛПС разом з тунікаміцином (tunicamycin) викликала інгібування тунікаміцин-індукованого стресу ЕПР. У подальшому дослідженні автори спостерігали TLR-опосередкований шлях активації XBP1. Було виявлено, що транскрипційний фактор XBP1 взаємодіяв з промоторними областями генів IL-6 і TNF, що викликало стійку продукцію прозапальних цитокінів (IL-6 і TNF-α) [62, 190]. Тому, XBP1 відіграє важливу, у т.ч. і захисну роль, як у вродженому, так і в адаптивному імунітеті. Це не дивно, враховуючи, що IRE1 має α і β домени РНКаз, які є унікальними гомологами подібним доменам RNase L, важливої складової

протівірусної системи [166]. IRE1 α -XBP1 сигнальний шлях UPR також має важливе значення і для розвитку та виживання ДК, у т.ч. і плазматичних ДК (pDCs) [137, 163]. Так, у XBП1-дефіцитних мишей, спостерігалось зниження кількості ДК, особливо pDCs, і, відповідно, зменшення рівня секреції IFN- α . Також, зниження експресії або відсутність XBП1 порушувало диференціацію та виживання ДК, а підвищена експресія транскрипційного фактору посилювала їх розвиток [137].

Крім цього, виявлені нами зміни експресії XBП1 при стресі можуть спричинити значний вплив і на процеси диференціювання клітин адаптивної імунної системи. Доведено, що XBП1 індукує диференціювання активованих В-лімфоцитів у плазматичні клітини [63, 107], але, при цьому, не впливає на В-клітини пам'яті [63]. Було продемонстровано, що XBП1-дефіцитні В-клітини показали нормальну проліферацію та активацію, однак, при цьому знижений рівень експресії J-ланцюга, необхідного для збірки Ig [107, 111, 272]. Тому, ці тварини були більш сприйнятливі до інфекцій, а відновлення експресії XBП1 призводило до відновлення виробництва Ig [107]. Відомо, що індукована XBП1 експресія ІЛ-6 у В-клітинах селезінки є чинником їх термінального диференціювання [270, 272]. Таким чином, експресія XBП1 в професійних секреторних клітинах, можливо, сприяє розвитку додаткових функцій, що дозволяють цим клітинам реагувати на “фізіологічні” сигнали UPR. Отже, механізм активації UPR і XBП1 під час диференціювання плазматичних клітин досі залишається цікавим і відкритим питанням. А враховуючи ту важливість, яку грають АТ у захисті слизової кишечника від патогенів, стають зрозумілими можливі наслідки виявлених нами змін експресії XBП1 лімфоцитами КАЛТ. Крім того, дані зміни можуть впливати і на кінцеву продукцію плазмоцитами аутоантитіл до клітинних антигенів, що пояснює різке збільшення частоти АІЗ у людей, що піддавалися дії соціального стресу, а також змінювати продукцію захисних секреторних IgA. Як відомо, реакція на стрес ЕПР - це критичний чинник ініціації диференціювання Т-клітин при розпізнаванні антигену [40, 124]. Franco A. et al. показали зв'язок між ЕПР і транскрипцією ІЛ-10 в T_{reg} клітинах людини [101]. Індукція стресу ER тапсігаргіном (thapsigargin), посилювала транскрипцію ІЛ-10, а інгібітор дефосфорилювання еукаріотичного фактора ініціації трансляції 2 α

(eIF2 α) салубрінал (salubrinal), у свою чергу, різко гальмував його [101]. Транскрипція IL-10 також підвищувалася за рахунок екзогенного TNF α . Таким чином, отримані результати розкривають роль стресу ЕПР в управлінні пластичністю Т-клітин.

Узагальнюючи в цілому виявлені закономірності (рис. 7.5. А, В), необхідно зазначити, що розвиток ХСС супроводжувався збільшенням загальної кількості лімфоцитів, що експресують TLR2 і 4 типу в КАЛТ щурів, призводив до зростання числа Nf-kB⁺-клітин. Отримані нами дані демонструють, що ХСС призводить до значної активації вродженої імунної системи і посилення прозапальної сигналізації у КАЛТ. Це, в свою чергу, може суттєво впливати на рівень активації адаптивної імунної відповіді, продукцію прозапальних цитокінів, диференціювання субпопуляцій хелперних Т-клітин та ініціювати розвиток запальних захворювань кишківника та АІЗ. Підтвердженням цього припущення були виявлені нами результати про те, що розвиток стресу супроводжується збільшенням кількості Tbet⁺- клітин в обох досліджуваних зонах КАЛТ на 39 – 92% (p<0,05), Ror γ t⁺ - лімфоцитів (на 94% - у 2,1 рази в ЗЛВ, у 2,3 рази в СЗ лише за умов ХСС2) та Ror γ t⁺CD8⁺- лімфоцитів (у 2,1 - 2,3 рази в ЗЛВ) у порівнянні з контролем. Ці зміни відбуваються на фоні зменшення кількості Foxp3⁺ - (на 44 – 49% в ЗЛВ, 20 – 39% в СЗ) і CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів (на 37 – 51%) і свідчать про домінування в умовах ХСС Th17- і Th1- Th2 - диференціювання і підвищенні рівня прозапальної сигналізації у кишечнику. Це підтверджується і загальною тенденцією до достовірного зниження співвідношення T_{reg}/Th17-лімфоцитів у лімфоїдних структурах клубової кишки щурів. Так, коефіцієнт розподілу Foxp3⁺/Ror γ t⁺ - клітин зменшився у ЗЛВ у 4,1 рази (p <0,05) при ХСС1 і у 3,5 рази (p <0,05) за умов ХСС2; у СЗ - на 39% (p <0,05) при ХСС1 і у 3,8 рази (p <0,05) на фоні ХСС2 у порівнянні з контролем.

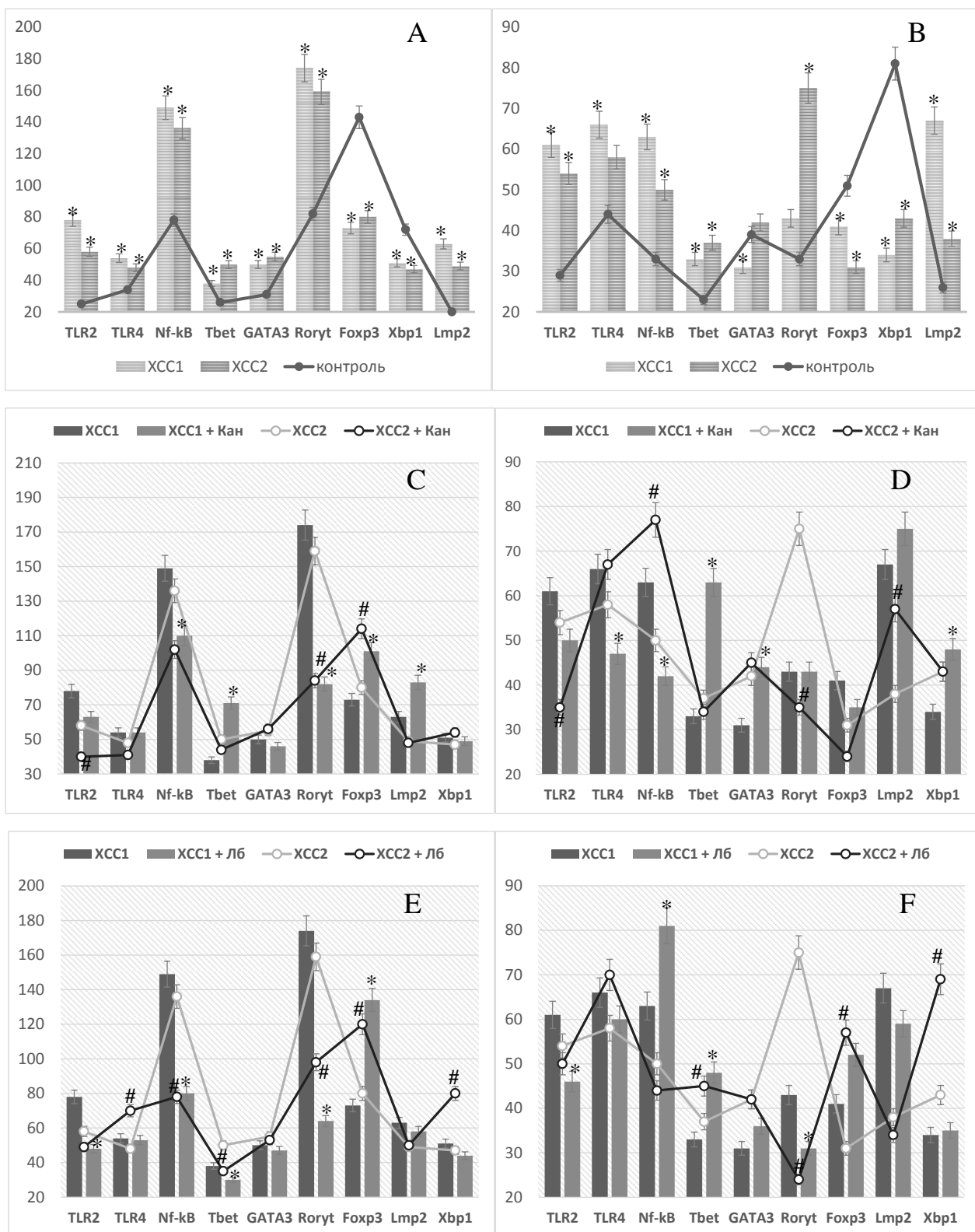


Рис. 7.5. Кількість імунопозитивних клітин у ЗЛВ (А, С, Е) та СЗ (В, D, F) в умовах ХСС (А, В), при введенні Кан (С, D) і Лб (Е, F) стресованим тваринам; * - $P < 0,05$ по відношенню до контролю (А, В), ХСС1 (С, F); # - $P < 0,05$ по відношенню до ХСС2 (С - F).

Зміни складу кишкової мікрофлори шляхом введення *Кан* експериментальним тваринам (див. рис. 7.5. С, D) супроводжувались загальною тенденцією до зниження кількості TLR2⁺, TLR4⁺ - і Nf-kB⁺ - клітин за винятком ЛФ. У лімфоїдному фолікулі за умов ХСС2 загальне число TLR2⁺ - і TLR4⁺ - лімфоцитів збільшувалось на 75 % - у 2,1 рази (p <0,05), а також зростала кількість Nf-kB⁺ - клітин на 54 % (p <0,05) у СЗ при ХСС2.

При цьому пероральний прийом *Кан* експериментальними тваринами призводив до зростання кількості T-bet⁺ - і GATA3⁺ - лімфоцитів у випадку ХСС1, не впливав на їх чисельність при ХСС2.

Введення *Лб* стресованим тваринам (див. рис. 7.5. Е, F) призводило до зниження ЩП TLR2⁺ - лімфоцитів при розвитку ХСС1 і не впливало на їх чисельність у разі ХСС2, тоді як загальна кількість TLR4⁺ - лімфоцитів переважно зростала (в ЗЛВ - на 46%, ХСС2; в ЛФ - на 43%, ХСС1 і на 49%, ХСС2). Також прийом *Лб* знижував кількість Nf-kB⁺ - клітин (в ЗЛВ - на 46%, ХСС1 і на 50%, ХСС2; в ЛФ – на 17%, ХСС2) за винятком СЗ, де їх кількість при ХСС1 достовірно збільшувалась (на 29%), і різноспрямовано впливав на концентрацію Nf-kB в імунопозитивних клітинах. Однак, введення *Лб* стресованим щурам супроводжувалось зростанням кількості T-bet⁺ - лімфоцитів у СЗ (на 25 – 50 %, p<0,05), зменшувало їх щільність в ЗЛВ (на 24 – 30%, p<0,05), не впливало на чисельність GATA3⁺-клітин, збільшувало концентрацію T-bet у лімфобластів і GATA3 у середніх лімфоцитів. При цьому загальна кількість Rorγt⁺ - клітин зменшувалась, а Foxp3⁺ - і CD25⁺Foxp3⁺ - лімфоцитів – достовірно зростала.

Таким чином, в результаті роботи встановлені певні імунні механізми активації прозапальної сигналізації в КАЛТ в умовах ХСС (рис.7.6.):

1. Активація вродженої імунної системи, яка супроводжується зміною розподілу TLR2⁺/TLR4⁺ - і Nf-kB⁺-лімфоцитів, а також змінами щільності ПРР на поверхні імунних клітин і концентрації транскрипційного фактора Nf-kB в лімфоцитах. У свою чергу, активація вродженої імунної системи призводить до зростання рівня цитокінових і ко-стимуляторних сигналів і, відповідно, включення

адаптивної імунної відповіді. Це підтверджується зростанням транскрипційної активності генів про-запальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-17 α 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 не згорнуті білки (unfolded protein response, UPR) 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 Adr β 2- можуть нівелювати імуносупресивні ефекти ГК, впливати на метаболізм лімфоцитів і диференціювання Т-хелперів.

ІМУННІ МЕХАНІЗМИ АКТИВАЦІЇ ПРОЗАПАЛЬНОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ В КАЛТ В УМОВАХ ХСС



Рис. 7.6. Імунні механізми активації прозапальної сигналізації в КАЛТ в умовах хронічного соціального стресу.

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 запальні захворювання кишківнику. У цьому зв'язку, з'ясування механізмів змін функціонального стану імунних структур, асоційованих зі слизовими оболонками шлунково-кишкового тракту в умовах ХСС є актуальним для сучасної патофізіології.

1. В умовах стресу (ХСС) реєструється зниження рівня експресії у КАЛТ мРНК Nr3c1 - (у 3 - 10 разів) і Adrβ2 - рецепторів (у 10 - 12 разів), зростання транскрипційної активності генів про-запальних 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, концентрацію Nf-kB у клітинах, що свідчить про активацію вродженої імунної системи.

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⁺-лімфоцитів (у 2 рази в ЗЛВ), підвищується концентрація T-bet, Rorγt і GATA3 у 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 ХВР-1⁺ - лімфоцитів в КАЛТ (на 31% - у 3 рази), найбільш виразне в ЛФ, змінюється концентрація білка ХВР1 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 по зниженню 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 у випадку ХСС1. Введення пробіотиків – до підвищення чисельності TLR4⁺ - лімфоцитів (в ЗЛВ – на 46%, ХСС2; в ЛФ - на 43%, ХСС1 і на 49%, ХСС2), Nf-kB⁺ - клітин у СЗ (на 29%, при ХСС1), а також супроводжується зростанням кількості T-bet⁺ - лімфоцитів у СЗ (на 25 – 50%).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Августинovich Д. Ф. Модель тревожной депрессии: персистентность патологии поведения / Д. Ф. Августинovich, И. Л. Коваленко, Н. Н. Кудрявцева // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2004. – Том 90, №10. – С. 1235-1244.
2. Августинovich Д. Ф. Тревожность самок, вызванная длительным психоэмоциональным воздействием / Д. Ф. Августинovich // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. - 2003. - Т. 89, № 7. – С.858-867.
3. Амикишиева А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А. В. Амикишиева // Вестник ВОГиС. – 2009. – Том 13, № 3. – С. 529-542.
4. Гусейнов Т. С., Гусейнова С. Т. Анатомия лимфатического русла тонкой кишки экспериментальных животных. – Махачкала: ИД «Наука плюс», 2008. – 138 с.
5. Гусейнов Т. С. Дискуссионные вопросы анатомии пейеровых бляшек тонкой кишки /Т. С. Гусейнов, С. Т. Гусейнова// Саратовский научно-медицинский журнал. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 687–691.
6. Дедов И. И. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека / И. И. Дедов, О. М. Смирнова, А. С. Горельшев // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 5. – С. 57-65.
7. Железникова Г. Ф. Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию /Г. Ф. Железникова// Журнал инфектологии. – 2011. – Том 3, № 1. – С. 6-13.
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.
9. Жулай Г. А. Регуляторные Т-лимфоциты CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Перспективы применения в иммунотерапии /Г. А. Жулай, Е. К. Олейник // Труды Карельского научного центра РАН. – 2012. – № 2. – С. 3–17.

10. Зверев Я. Ф. Стресс эндоплазматического ретикулула глазами нефролога / Я. Ф. Зверев, В. М. Брюханов // Нефрология. - 2013. - Том 17, N 2. - С. 39-54
11. Камишний О. М. Бути чи не бути патогеном: мікробіоценоз верхніх дихальних шляхів, фізіологічне запалення та образрозпізнаючі рецептори/ О. М. Камишний, О. В. Войтович, І. О. Топол, А. С. Деген //Анали мечніковського інституту. - 2011. - №4. – С. 246-251.
12. Камышный А. М. ТНН – новая линия дифференцировки Т-хелперов: происхождение, фенотип, эффекторные функции, роль в развитии аутоиммунной патологии/ А. М. Камышный, И. В. Гриневич, А. С. Деген, И. А. Топол, Т. М. Буга // Патологія. – 2011 - Т.8, №3. – С.4-11.
13. Камышный А. М. Стресс-индуцированные изменения врожденных компонентов кишечечно-ассоциированной лимфоидной ткани /А.М. Камышный, И.А. Топол// Материалы V Международного симпозиума «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (23 июня – 26 июня 2015 р., г. Санкт-Петербург, Россия). — 2015. – С. 106 -107.
14. Камышный А. М. ТН17-клетки и их роль в развитии аутоиммунных заболеваний /А. М. Камышный, И. В. Гриневич, А. С. Деген, И. А. Топол // Запорожский медицинский журнал. – 2011 - Т.13, №6. – С. 81-87.
15. Кетлинский С. А. Th17 — новая линия дифференцировки Т хелперов: обзор данных// Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 3—15.
16. Кравченко П. К. Система регуляторных Т-клеток и аутоиммунные процессы /П. К. Кравченко, Е. К. Олейник// Труды Карельского научного центра РАН. – 2013. – №3. – С. 18-30.
17. Крестецька С. Л. Аутоіндукція та сигнальна трансдукція: комунікаторні системи в мікробних популяціях /С. Л. Крестецька, А. М. Нестеренко// Annals of Mechnicov Institute. – 2007. – № 1. – С. 4-9.
18. Кудрявцева Н. Н. Применение теста «перегородка» в поведенческих и фармакологических экспериментах /Н. Н.Кудрявцева// Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. - 2002. - № 1. - С. 90-105.

19. Кудрявцева Н. Н. Нарушение клеточного цикла в тимусе и селезенке у самцов мышей под влиянием хронического социального стресса: эффекты диазепама /Н. Н. Кудрявцева, А. В. Шурлыгина, Е. В. Мельникова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 4. – С. 391-394.

20. Меситов М. В. Индукция стресса эндоплазматического ретикулула в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфоцитарной лейкемии человека/ М. В. Меситов, Т. И. Игнашкова, М. Е. Мещерский [и др.]// Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2012. - № 3. - С.87-93.

21. Меситов М. В. Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулула: система UPR (Unfolded Protein Response) /М. В. Меситов, А. А. Московцев, А. А. Кубатиев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2013. - № 4. - С. 97-108.

22. Резников А. Г. Эндокринологические аспекты стресса/ А. Г. Резников// Международный эндокринологический журнал. – 2007. – № 4(10). – С. 11-17.

23. Топол И. А. Влияние социального стресса на экспрессию мРНК генов глюкокортикоидных NR3C1 и ADRB2-рецепторов в кишечочно-ассоциированной лимфоидной ткани /И. А. Топол, А. М. Камышный// Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), № 2 (1). – С. 569 – 571.

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

25. Топол И. А. Изменения баланса субпопуляций Т-хелперов в КАЛТ крыс 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.

26. Топол И. А. Соотношение уровня экспрессии транскрипционных регуляторов дифференцировки Т-хелперов в кишечочно-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.

27. 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.

28. Топол І. О. Вплив соціального стресу на розподіл ROR γ t-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.

29. 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.

30. 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.

31. Хмель И. А. QUORUM SENSING регуляція експресии генів – ефективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерій / И. А. Хмель, А. З. Метлицкая // Молекулярная біологія. – 2006. – № 2. – С. 195-210.

32. Цимоха А. С. Протеасомы: участие в клеточных процессах /А. С. Цимоха // Цитология. – 2010. – № 4. – С. 277–300.

33. Шляхова А. В. Особенности ситуативного поведения крыс-агрессоров в тесте «перегородка» /А. В. Шляхова// Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Медицина. – 2010. – Вип. 1, т. 1. – С. 112–118.

34. Ярилин А. А. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов: обзор /А. А. Ярилин// Иммунология. – 2010. – Том 31, №3. – С. 153-168.

35. Язуина Н. А. Современные экспериментальные модели депрессии / Н. А. Язуина, Ю. К. Комлева, А. Б. Салмина [и др.]// Биомедицина. – 2013. – №1. – С. 61-77.
36. Abdollahi-Roodsaz S. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis /S. Abdollahi-Roodsaz //J. Clin. Invest. – 2008. – Vol. 118. – P. 205–216.
37. Agnieszka M. Kabat Modulation of immune development and function by intestinal microbiota /Agnieszka M. Kabat, Naren Srinivasan, Kevin J. Maloy// Trends in Immunology. – 2014. – Vol. 35, No. 11. – P.507-517.
38. Alcocer-Gómez E. NLRP3 inflammasome is activated in mononuclear blood cells from patients with major depressive disorder / E. Alcocer-Gómez, M. de Miguel, N. Casas-Barquero // Brain Behav. Immun. – 2014. – Vol. 36. – P. 111–117.
39. Allen R. The intestinal microbiota are necessary for stressor-induced enhancement of splenic macrophage microbicidal activity /R. Allen, W. Lafuse, J. Galley // Brain Behav. Immun. – 2012. - Vol. 26. – P. 371–382.
40. Angeles A. Immune and non-immune functions of the immunoproteasome /A. Angeles, G. Fung, H. Luo // Frontiers in Bioscience. - 2012.-Vol. 17. - P. 1904-1916.
41. Angelina M. Induced CD4⁺Foxp3⁺regulatory T cells in Immune Tolerance /M. Angelina, Bilate and Juan J. Lafaille// Annu. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 30. – P.733–758.
42. Avgustinovich D. Animal models of anxiety disorders and stress /D. Avgustinovich, A.C. Campos, M.V. Fogaça [et al.]// Rev Bras Psiquiatr. – 2013. – Vol. 35 Suppl 2:S101-11.
43. Avgustinovich D. Gender-related characteristics of responding to prolonged psychoemotional stress in mice /D. Avgustinovich, I. Kovalenko // Neurosc.Behav. Physiol. - 2009. – Vol. 40, № 3. – С.858-867.
44. Baarlen P. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli /P. Baarlen, J. Wells, M. Kleerebezem// Trends Immunol. – 2013. – Vol. 34. – P. 208-215.

45. Bai A. Probiotics and inflammatory bowel diseases /A. Bai, Q. Ouyang// *Postgrad. Med. J.* – 2006. – Vol. 82. – P. 376–382.
46. Bailey M. Exposure to a social stress or alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation /M. Bailey, S. Dowd, J. Galley // *BrainBehav. Immun.* –2011. – Vol. 25. – P. 397–407.
47. Bailey M. Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like рецепторів-dependent pathway /M. Bailey, H. Engler, N. Powell // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2007 – Vol. 293 (3). – P. 1180-1190.
48. Bailey M. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhibits corticosteroid responsiveness of cytokine production / M. Bailey, S. Kierstein, A. Haczku// *J.Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – P.7888-7896.
49. Bailey M. T. Stressor Exposure Disrupts Commensal Microbial Populations in the Intestines and Leads to Increased Colonization by *Citrobacter rodentium* /M. T. Bailey, S. E. Dowd, N. M. A. Parry [et al.]// *Infection and immunity.* – 2010. – Vol. 78. – P. 1509–1519.
50. Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents / A. Bartolomucci// *Frontiers in Neuroendocrinology.* – 2007. – Vol. 28. – P. 28–49.
51. Basler M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions /M. Basler, C. Kirk, M. Groettrup // *Curr. Opin. Immunol.* – 2013 – Vol. 1. – P. 74-80.
52. Bekeredjian-Ding I. Toll-like receptors – sentries in the B-cell response / I. Bekeredjian-Ding, G. Jego // *Immunology.* – 2009. – Vol. 128. – P. 311–323.
53. Belkaid Y. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions /Y. Belkaid, K. Tarbell// *Annu. Rev. Immunol.* – 2009. – Vol. 27. – P. 551–589.
54. Belkaid Y. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation / Y. Belkaid, T. W. Hand // *Cell.* –2014. – Vol. 157. – P. 121-141.

55. Beurel E. Inflammatory T helper 17 cells promote depression-like behavior in mice/E. Beurel, L.E. Harrington, R.S. Jope//*Biol Psychiatry*. – 2013 Apr 1;73(7). – P. 622-630.
56. Bierhaus A. NF-kappaB as a molecular link between psychosocial stress and organ dysfunction/A. Bierhaus, P.M. Humpert, P.P. Nawroth // *Pediatr Nephrol*. – 2004. – Vol. 19(11). – P. 1189-1191.
57. Born W. Diversity of $\gamma\delta$ T-cell antigens/ W. Born, K. Aydintug, R. O'Brien // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2013. – Vol. 10. – P. 13–20.
58. Brandtzaeg P. Let's go mucosal: communication on slippery ground /P. Brandtzaeg, R. Pabst // *Trends Immunol*. – 2004. – Vol 25. – P. 570–577.
59. Brandtzaeg P. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue/ P. Brandtzaeg, H. Kiyono, R. Pabst [et al.] // *Mucosal Immunol*. – 2008. – Vol 1. – P. 31-7.
60. Bron P. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa /P. Bron// *Nat. Rev. Microbiol*. – 2012. – Vol. 10. – P. 66–78.
61. Brown E. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine /E. Brown, M. Sadarangani, B. Finlay // *Nature Immunology*. – 2013. – Vol. 14.-P. 660–667
62. Brucklacher-Waldert V. Cellular plasticity of CD4+ T cells in the intestine / V. Brucklacher-Waldert, E. J. Carr, M. A. Linterman [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2014. – P. 1-36.
63. Brunsing R. B- and T-cell Development Both Involve Activity of the Unfolded Protein Response Pathway / R. Brunsing, S. Omori, M. Niwa // *The J. of Biol. Chemistry*. - 2008. - Vol. 283. - P. 17954-17961.
64. Busillo J. Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome /J. Busillo, K. Azzam, J. Cidlowski// *J. Biol. Chem*. – 2011. – Vol. 286. – P. 38703–38713.

65. Caballero S. Microbiota-mediated inflammation and antimicrobial defense in the intestine /S.Caballero, E.G. Pamer // *Annu Rev Immunol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 227-256.
66. Calatayud F. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches /F. Calatayud, C. Belzung, A. Aubert // *Behav. Process.* – 2004. – Vol. 67. – P. 195–206.
67. Camile J. Peyer's patches: the immunesensors of the intestine/J. Camile, J.-P. Hugot//*Intern. J. of Inflammation.* – 2010. – Vol. 130. – P. 1–12.
68. Carlsson E. Psychological stress in children may alter the immune response /E.Carlsson, A.Frostell, J. Ludvigsson [et al.] // *J.Immunol.* – 2014. – Vol. 192(5). – P. 2071-2081.
69. Caudill C. T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens /C. Caudill, K. Jayarapu, L. Elenich [et al.]// *J Immunol.* - 2006. - Vol. 176, № 7. - P. 4075-4082.
70. Cheng Christine S. The Specificity of Innate Immune Responses Is Enforced by Repression of Interferon Response Elements by NF-kB p50 /Christine S. Cheng, Kristyn E. Feldman, James Lee [et al.] // *Sci Signal.* – Vol. 4(161): ra11. doi:10.1126/scisignal.2001501.
71. Chiba Y. Well-controlled pro-inflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei* /Y. Chiba, K. Shida, S. Nagata // *Immunology.* – 2010. – Vol. 130, №3. – P. 352–362.
72. Chida Y. Social isolation stress exacerbates autoimmune disease in MRL/lpr mice /Y.Chida, N. Sudo, C. Kubo// *J.Neuroimmunol.* – 2005. - Vol. 158.-P.138-144.
73. Cogan T. A. Norepinephrine increases the pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* / T. A. Cogan, A. O. Thomas, L. E. N. Rees [et al.]// *Gut.* – 2007. – Vol. 56. – P. 1060–1065.
74. Colaianna M. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress /M. Colaianna, S. Schiavone, M. Zotti // *Antioxid Redox Signal.* – 2013 – Vol. 18(12). – P. 1385 - 1399.

75. Cole S. Computational identification of gene-social environment interaction at the human IL6 locus /S. Cole // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107 (12). – P. 5681–5686.
76. Cole S. Social regulation of human gene expression /S. Cole// Curr. Dir. Psychol. Sci. – 2009. – Vol. 18(3). – P.132–137.
77. Conway-Campbell B. L. Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone/ B. L. Conway-Campbell, M. A. McKenna, C. C. Wiles [et al.]//Endocrinology. – 2007. – Vol. 148 (11). – P. 5470-5477.
78. Costa C. The Unfolded Protein Response: How Protein Folding Became a Restrictive Aspect for Innate Immunity and B Lymphocytes /C. Costa, S. Rosa, M. Camargo // Scand. Journal of Immunology. – 2011. – Vol. 73. – P. 436–448.
79. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH) /S. Crotty //Annu. Rev. Immunol. – 2011. – Vol 29. – P. 621–663.
80. Cryan J. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior /J. Cryan, T. Dinan // NatureReviews Neuroscience.-2012.-Vol.9.-P.1-12.
81. Cua D. J. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system /D. J. Cua, C. M. Tato // NATURE ReviewS: Immunology. – 2010. – Vol. 10. – P. 479-490.
82. Curry J. Social disruption induces lung inflammation /J. Curry, M. Hanke, M. Piper //Brain Behav. Immun. – 2010. – Vol. 24. – P. 394–402.
83. Curtis M. M. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host/ M. M. Curtis, V. Sperandio //Mucosal Immunol. – 2011. – Vol. 4(2). – P. 133-138.
84. Delévaux I. Stress and auto-immunity/ I. Delévaux, A. Chamoux, O. Aumaître //RevMedInterne. – 2013. – Vol. 34(8). – P. 487-492.
85. Denenberg V. H. Open-field behavior in the rat: what does it mean? /V. H. Denenberg// Annals of the New York Academy of Sciences. – 1969. – Vol. 159. – P. 852–859.

86. Dhabhar F. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful /F. Dhabhar // *ImmunolRes.* – 2014. – Vol. 58. – P.193–210.
87. Dhabhar F. Stress-induced redistribution of immune cells-from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones /F. Dhabhar, W. Malarkey, E. Neri [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* – 2012. – Vol. 37 (9). – P. 1345-1368.
88. Duffy L. C. Lag time between stress events and risk of recurrent episodes of inflammatory bowel disease /L. C. Duffy, M. A. Zielesny, J. R. Marshall // *Epidemiology.* – 1991. – Vol. 2 (2). – P. 141-145.
89. Eberl G. Development and evolution of ROR γ ⁺ cells in a microbe's world /G. Eberl// *Immunological Reviews.* – 2012. – Vol. 245. – P. 177–188.
90. Elenkov I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 Balance/ I. J. Elenkov// *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1024. – P. 138–146.
91. Elia P. The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease /P. Elia, Y. Tolentino, C. Bernardazzi [et al.]// *Mediators Inflamm.* – 2015. – Vol. 2. - P. 81-93.
92. Engler H. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen /H. Engler, M. Bailey, A. Engler [et al.] // *J Neuroimmunol.* – 2004. – Vol. 1. – P. 106-115.
93. Engler H. Interleukin-1 receptor type 1-deficient mice fail to develop social stress-associated glucocorticoid resistance in the spleen /H. Engler, M. Bailey, A. Engler [et al.]// *Psychoneuroendocrinology.* – 2008. – Vol. 33 (1). – P. 108-117.
94. Fagundes C. Depressive symptoms enhance stress-induced inflammatory responses /C. Fagundes, R. Glaser, B. Hwang [et al.]// *Brain Behav Immun.* – 2013. – Vol. 31:172–176.
95. Fagundes C. Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan /C. Fagundes, R. Glaser, J. Kiecolt-Glaser // *Brain Behav. Immun.* – 2013. – Vol. 27. – P. 8–12.
96. Fazilleau N. Follicular helper T cells: lineage and location /N. Fazilleau, L. Mark, L. McHeyzer-Williams [et al.]// *Immunity.* – 2009. – Vol. 30. – P. 324–335.

97. Fitzpatrick L. Dextran sulfate sodium-induced colitis is associated with enhanced low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) expression and is attenuated in LMP2 knockout mice /L. Fitzpatrick, V. Khare, J. Small [et al.] // *DigDisSci.* – 2006. - Vol. 51 – P. 1269 – 1276.

98. Fitzpatrick L. Enhanced intestinal expression of the proteasome subunit low molecular mass polypeptide 2 in patients with inflammatory bowel disease /L. Fitzpatrick, J. Small, L. Poritz [et al.] // *DisColonRectum.* – 2007. - Vol. 50. – P. 337 – 348.

99. Forsberg A. Pre- and post-natal *Lactobacillus reuteri* supplementation decreases allergen responsiveness in infancy / A. Forsberg, T. Abrahamsson, B. Björkstén // *Clin.Exp.Allergy.* – 2013.- Vol. 43, № 4. – P. 434-442.

100. Francino M. P. Effects of antibiotic use on the microbiota of the gut and associated alterations of immunity and metabolism /M. P. Francino, A. Moya // *EMJ Gastroenterol.* – 2013. – Vol. 1. – P. 74-80.

101. Franco A. Endoplasmic reticulum stress drives a regulatory phenotype in human T-cell clones /A. Franco, G. Almanza, J. Burns [et al.] // *Cell Immunol.*- 2010.- Vol. 266.-P.1-6.

102. Frank M. G. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus /M. G. Frank, S. A. Hershman, M. D. Weber [et al.]// *Psychoneuroendocrinology.* – 2014. – Vol. 40. – P. 191–200.

103. Freier E. Decrease of CD4(+)FOXP3(+) Tregulatory cells in the peripheral blood of human subjects under goin gamental stressor /E. Freier, C. Weber, U. Nowottne // *Psychoneuroendocrinology.* – 2010. – Vol. 35(5). – P. 663-673.

104. Fritz T. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge T. Fritz, L. Niederreiter, T. Adolph [et al.] // *Gut.*- 2011.- Vol. 60.-P.1580-1588

105. Fukata M. The Role of Pattern Recognition Receptors in Intestinal Inflammation /M. Fukata, M. Arditi // *Mucosal Immunol.* — 2013. — Vol. 6, № 3. — P. 451—463.

106. Gareau M. G. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease /M. G. Gareau, P. M. Sherman, W. A. Walker// *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2010. – Vol. 7. – P. 503–514.

107. Gass J. The unfolded protein response of B-lymphocytes: PERK-independent development of antibody-secreting cells /J. Gass, H. Jiang, R. Wek [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2008. – Vol. 45. – P.1035–1043.

108. Gerondakis S. NF- κ B subunit specificity in hemopoiesis / S. Gerondakis, A. Banerjee, G. Grigoriadis [et al.] // *Immunological Reviews.* – 2012. – Vol. 246. – P. 272–285.

109. Gerondakis S. Roles of the NF- κ B Pathway in Lymphocyte Development and Function /S. Gerondakis, U. Siebenlist// *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2010. – Vol. 2. – P. 1-29.

110. Ghosh S. Celebrating 25 years of NF- κ B/ S. Ghosh, M. S. Hayden // *Immunological Reviews.* – 2012 – Vol. 246. – P.5-13.

111. Glimcher L. XBP1: the last two decades /L. Glimcher // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69. – P.67-71

112. Golden Sam A. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice /Sam A. Golden, Herbert E. Covington, Olivier Berton & Scott J Russo // *Nature Protocols.* – 2011. – Vol. 6. – P. 1183–1191.

113. Gris D. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses /D. Gris, Z. Ye, H.A. Iocca [et al.]// *JImmunol.* – 2010. – Vol. 185. – P. 974 –81.

114. Groettrup M. Structural plasticity of the proteasome and its function in antigen processing /M. Groettrup, M. Broek, K. Schwarz [et al.] // *Crit. Rev. Immunol.* – 2001. – Vol. 21 – P. 339 — 358.

115. Guereschi M. G. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner /M. G.Guereschi, L. P.Araujo, J. T. Maricato // *Eur J Immunol.* – 2013. – Vol. 43(4). – P. 1001 - 1012.

116. Hall C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity /C. S. Hall // *J. comp. physiol. Psychol.* – 1936 – Vol. 22. – P. 345–352.

117. Hamada H. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine /H. Hamada, T. Hiroi, Y. Nishiyama [et al.]//*J Immunol.* – 2002. – Vol. 168. – P. 57–64.

118. Haneklaus M. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation / M. Haneklaus, L.A. O'Neill //*Immunol Rev.* – 2015 – Vol. 265(1). – P. 53-62.

119. Harrington L. E. Interleukin 17-producing CD4⁺effector Tcells develop via a lineage distinct from the Thelper type 1 and 2 lineages /L. E. Harrington, R. D. Hatton, P.R. Mangan // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 1123—1132.

120. Hayden M. S. NF- κ B in immunobiology / M.S. Hayden, S.Ghosh // *Cell Res.* - 2011 - Vol. 21(2) – P. 223-244.

121. He Y. Emerging roles for XBP1, a super transcription factor /Y. He, S. Sun, H. Sha [et al.] // *Gene Expr.* – 2010. – Vol. 15. – P. 13–25.

122. Heijtz R. D. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior/R. D. Heijtz, S. Wang, F. Anuar [et al.]//*PNAS Early Edition.* – 2011. <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1010529108/-/DCSupplemental>. - P. 1-6.

123. Hensley S. Unexpected Role for the Immunoproteasome Subunit LMP2 in Antiviral Humoral and Innate Immune Responses /S. Hensley, D. Zanker, B. Dolan [et al.] // *J. Immunol.* - 2010. - Vol. 15. - P. 4115 – 4122.

124. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond /C. Hetz// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 89-102

125. Hitotsumatsu O. Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine /O. Hitotsumatsu, H. Hamada, H. Ishikawa// *J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 40. - P.956–963.

126. Hodes G. E. Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress/G. E. Hodes, M. L. Pfau, M. Leboeuf [et al.]// *ProcNatlAcadSci U S A.* – 2014. – Vol. 111(45). – P. 16136-16141.

127. Hong M. Imbalance between Th17 and T-reg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice /M. Hong, J. Zheng, L. Wang // *Neuroimmunomodulation*. – 2013. – Vol. 20, №1. - P. 39-50.

128. Hou N. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth /N. Hou, X. Zhang, L. Zhao // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2013. – Vol. 439(4). – P. 471-476.

129. Hoyler T. T-bet and Gata3 in controlling type 1 and type 2 immunity mediated by innate lymphoid cells/ T. Hoyler, C. Connor, E. Kiss // *Curr Opin Immunol*. – 2013. – Vol. 25, № 2. – P. 139-147.

130. Hua Z. TLR signaling in B-cell development and activation /Z. Hua, B. Hou// *Cellular & Molecular Immunology*. – 2013. – Vol. 10. – P. 103-106.

131. Huber S. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine / S. Huber, N. Gagliani, R. Flavell // *Eur. J. Immunol*. – 2012. – Vol. 42. – P. 2238–2245.

132. Hutchinson S. A dominant role for the immunoproteasome in CD8⁺T cell responses to murine cytomegalovirus /S. Hutchinson, S. Sims, G. O'Hara [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. e14646.

133. Iglesias-Rey M. Psychological factors are associated with changes in the health-related quality of life in inflammatory bowel disease/ M. Iglesias-Rey, M. Barreiro-de Acosta, F. Caamaño-Isorna [et al.]// *Inflamm Bowel Dis*. – 2014. – Vol. 20(1). – P. 92-102.

134. Ishikawa H. New gut associated lymphoid tissue “cryptopatches” breed murine intestinal intraepithelial T cell precursors /H. Ishikawa, H. Saito, K. Suzuki [et al.]// *Immunol Res*. – 1999. – Vol. 20. – P. 243–250.

135. Iudicibus S. Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease / S. Iudicibus, R. Franca, S. Martelossi [et al.] // *World J Gastroenterol*. – 2011. – Vol. 17(9). – P. 1095-1108.

136. Ivanov I. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria /I. Ivanov, K. Atarashi, N. Manel // *Cell*. – 2009. – Vol. 139. – P. 485–498.

137. Iwakoshi N. The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells /N. Iwakoshi, M. Pypaert, L. Glimcher //J. Exp. Med.-2007. – Vol. 204. — P.2267–2275.

138. Iwasaki A. Control of adaptive immunity by the innate immune system/ A. Iwasaki, R. Medzhitov //Nat Immunol. – 2015. – Vol. 16(4). – P. 343-353.

139. Iwata M. The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses /M. Iwata, K. Ota, R. Duman // Brain Behav Immun. – 2013. – Vol. 31. – P. 105-114.

140. Jesus A. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes /A. Jesus, R. Goldbach-Mansky // Annu Rev Med. – 2014. – Vol. 65. – P. 223-244.

141. Ji N. More than just a T-box: the role of T-bet as a possible biomarker and therapeutic target in autoimmune diseases / N. Ji, R. Sosa, T. Forsthuber // Immunotherapy. – 2011. – Vol. 3, № 3. – P. 435–441.

142. Jin B. The Effects of TLR Activation on T-Cell Development and Differentiation / B. Jin, Tao Sun, Xiao-Hong Yu [et al.]// Clinical and Developmental Immunology. – 2012. – Vol. ID 836485. – P. 32.

143. Jovanovic P. Differential expression of tyrosine hydroxylase and transporters in the right and left stellate ganglion of socially isolated rats /P. Jovanovic, N. Spasojevic, B. Stefanovic [et al.]// Auton Neurosci. – 2014. – Vol. 181. – P. 85-89.

144. Jung S. Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA /S. Jung, Y. Wang, T. Kim [et al.]// Brain Behav Immun. – 2015. – Vol. 44. – P. 195-206.

145. Kadmiel M. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease /M. Kadmiel, J. Cidlowski // TrendsPharmacol. Sci. – 2013. – Vol. 34. – P. 518–530.

146. Kaemmerer E. Fatty acid binding receptors in intestinal physiology and pathophysiology/ E. Kaemmerer, P. Plum, C. Klaus// World J Gastrointest Pathophysiol. – 2010. – Vol. 1(5). – P. 147-153.

147. Kaiko G.E. Host–microbe interactions shaping the gastrointestinal environment / G. E. Kaiko, T. S. Stappenbeck // Trends in Immunology. – 2014. –P. 1–11.

148. Kaiser P. The streptomycin mouse model for Salmonella diarrhea: functional analysis of the microbiota, the pathogen's virulence factors, and the host's mucosal immune response /P. Kaiser, M. Diard, B. Stecher // Immunol Rev. – 2012. – Vol.245, №1. – P. 56-83.

149. Kalim K. Immunoproteasome Subunit LMP7 Deficiency and Inhibition Suppresses Th1 and Th17 but Enhances Regulatory T Cell Differentiation /K.Kalim, M. Basler, C. Kirk // The J. of Immunology. - 2012. - Vol. 189. - P.4182-4193.

150. Kamdar K. Toll-like receptor signaling and regulation of intestinal immunity /K. Kamdar, V. Nguyen, R. W. DePaolo// Virulence. – 2013. – Vol. 4 (3). – P. 207–212.

151. 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.

152. 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.

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

154. 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.

155. 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.

156. 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.

157. Kanai T. ROR γ t-dependent IL-17A-producing cells in the pathogenesis of intestinal inflammation / T. Kanai, Y. Mikami, T. Sujino // Mucosal Immunol. – 2012. – Vol. 5, №3. – P. 240-247.

158. Kanamori Y. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop / Y. Kanamori, K. Ishimaru, M. Nanno [et al.] //J Exp Med. – 1996. – Vol. 184 (4). – P. 1449-1459.

159. Karavanaki K. Psychological stress as a factor potentially contributing to the pathogenesis of Type 1 diabetes mellitus /K. Karavanaki, E. Tsoka, C. Dacou-Voutetakis// J.Endocrinol. Invest. – 2008. – Vol. 31. – P.406-415.

160. Karavolos M. Pathogenes espionage: multiple bacterial adrenergic sens or seaves drop on host communication systems/M. Karavolos, K. Winzer, P. Williams, C. Khan // MolMicrobiol. – 2013. – Vol. 87, №3. – P.455-465.

161. Karrasch T. NF- κ B and the Intestine: Friend or Foe? / T. Karrasch, C. Jobin // Inflamm Bowel Dis. – 2008. – Vol. 14, №1. – P. 114-124.

162. Kaser A. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation /A. Kaser, R. Blumberg // Mucosal Immunology. – 2010. – Vol. 3. – P. 11–16.

163. Kaser A. Survive an innate immune response through XBP1 /A. Kaser, R. Blumberg // Cell Research. – 2010.- Vol. 20.-P.506–507.

164. Kaser A. The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation /A. Kaser, M. Flak, R. Blumberg // Exp. Cell Res. – 2011. – Vol. 15. – P. 2772–2779.

165. Kaser A. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease/ A. Kaser, A.H. Lee, A. Franke [et al.] // Cell. – 2008. – Vol. 134, № 5. – P. 743-756.

166. Kaufman R. Inositol-requiring 1/X-box-binding protein 1 is a regulatory hub that links endoplasmic reticulum homeostasis with innate immunity and metabolism /R. Kaufman, S. Cao// *EMBO Mol. Med.* – 2010. – Vol. **6**. – P. 189–192.

167. Kerfoot S. M. Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone /S. M. Kerfoot, G. Yaari, J. R. Patel [et al.] // *Immunity*. – 2011. – Vol 34. – P. 947–960.

168. Kim S. J. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice /S. J. Kim, H. Lee, G. Lee // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 7. – P. 420-454.

169. Kingston H. G. Mills TLR-dependent T cell activation in autoimmunity / Kingston H. G. Mills // *Nature Reviews Immunology*. – 2011. – Vol. doi:10.1038/nri3095. – P. 1-16.

170. Kizaki T. Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappa B activation through beta-arrestin 2 /T.Kizaki, T. Izawa, T. Sakurai // *Immunology*. – 2008. – Vol. 124(3). – P. 348 - 356.

171. Knoop K. A. Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA/K. A. Knoop, R. D. Newberry// *Front Immunol*. – 2012. – Vol. 3 (84). – P. 1-7.

172. Konturek P. C. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options /P. C. Konturek, T. Brzozowski, S. J. Konturek // *Journal of physiology and pharmacology*. – 2011. – Vol. 62, 6. – P. 591-599.

173. Krügel U. The impact of social isolation on immunological parameters in rats /U. Krügel, J. Fischer, K. Bauer [et al.]// *Arch Toxicol*. – 2014. – Vol. 88 (3). – P. 853 - 855.

174. Krüger E. Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme /E. Krüger, P. Kloetzel// *Curr Opin Immunol*. – 2012. – Feb. 24, № 1. – P. 77-83.

175. Lazarevic V. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity/ V. Lazarevic, L. Glimcher, GM. Lord // *Nat Rev Immunol*. – 2013. – Vol. 11. – P. 777–789.

176. Lee W. The immunoproteasome: an emerging therapeutic target /W. Lee, K. Kim // *Curr Top Med Chem.* - 2011. - Vol. 11, № 23. - P. 2923-2930.
177. Leon B. Regulation of T(H)2 development by CXCR5⁺ dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells /B. Leon, A. Ballesteros-Tato, J.L. Browning [et al.] // *Nat. Immunol.* - 2012. - Vol 13. - P. 681–690.
178. Li Y. Altered expression of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder /Y. Li, B. Xiao, W. Qiu// *J AffectDisord.* - 2010. - Vol. 124, № 1-2. - P. 68-75.
179. Littman D. R. Th17 and Regulatory T Cells in Mediating and Restraining Inflammation / D. R. Littman, A. Y. Rudensky // *Cell.* - 2010. - Vol. 140. - P. 845–858.
180. Liu G. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells / G. Liu, L. Zhang, Y. Zhao // *Clinical and Experimental Immunology.* - 2010. - Vol. 160. - P. 168–175.
181. Liu Y. Lactobacillus reuteri strains reduce incidence and severity of experimental necrotizing enterocolitis via modulation of TLR4 and NF-κB signaling in the intestine /Y. Liu, N. Fatheree, N. Mangalat// *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* - 2012. - Vol. 15. - P. 608–617.
182. Lopez C. Collateral Damage: Microbiota-Derived Metabolites and Immune Function in the Antibiotic Era /C. Lopez, D. Kingsbury, E. Velazquez // *Cell Host & Microbe.* - 2014. - Vol. 16. - P.156-163.
183. Lyte M. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa – bacteria interactions / M. Lyte, L. Vulchanova, D. R. Brown // *Cell Tissue Res.* -2011. - Vol. 343. - P. 23 – 32.
184. Maddur M. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and the therapeutic strategies/ M. Maddur, P. Miossec, J. Bayry // *Am J Pathol.* - 2012. - Vol. 181, №1. - P. 8-18.
185. Magnavita N. Measuring psychological trauma in the workplace: psychometric properties of the italian version of the psychological injury risk indicator-a cross-sectional study/ N. Magnavita, S. Garbarino, P.C. Winwood// *Scientific World Journal.* - 2015. - Vol. 2015. - ID 720193. - 6 p.

186. Maldonado M. Immunoproteasome Deficiency Modifies the Alternative Pathway of NF κ B Signaling /M. Maldonado, R. Kappahn, M. Terluk // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 2. – P. 561—587.
187. Manni M. β 2-Adrenergic agonists bias TLR-2 and NOD2 activated dendritic cells towards inducing an IL-17 immuneresponse /M. Manni, R.D. Granstein, G. Maestroni // Cytokine. – 2011. – Vol. 55(3). – P. 380 - 386.
188. Maria A. Curotto de Lafaille Natural and Adaptive Foxp3+Regulatory T Cells: More of the Same or a Division of Labor? / Maria A. Curotto de Lafaille, Juan J. Lafaille // Immunity – 2009. – Vol. 30. – P. 626-635.
189. Martinon F. Regulation of Innate Immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum /F. Martinon, L. Glimcher // Curr.Opin.Immunol. – 2011. – Vol. 23. – P. 35–40.
190. Martinon F. Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages /F. Martinon, X. Chen, L. Glimcher // Nat.Immunol. – 2010. – Vol. 11. – P. 411–418.
191. Martins M. Functional stability of Foxp3⁺ regulatory T cells /M.Martins, C.A.Piccirillo// Trends Mol Med. – 2012 – Vol. 18, № 8. – P.454-462.
192. Mayrhofer G. Lymphocyte-filled villi (LFV): non-classical organized lymphoid tissues in the mucosa of the small intestine /G. Mayrhofer, M. Moghaddami, C. Murphy //Mucosal Immunol Update. – 1999. – Vol. 7. – P. 9–13.
193. Mayrhofer G. Lymphopoiesis in lymphocyte-filled villi in the small intestine of the rat /G. Mayrhofer, A. Brooks// Clin Immunol Immunopathol. – 1995. – Vol. 76. – p.55.
194. Mays J. Influenza virus-specific immunological memory Is enhanced by repeated social defeat /J. Mays, M. Bailey, J. Hunzeker// J Immunol. – 2010. – Vol. 184.- P. 2014–2025.
195. Mays J. Stress and the anti-influenza immune response: repeated social defeat augments clonal expansion of CD8(+)T cells during primary influenza A viral infection /J. Mays, N. Powell, J. J. Hunzeker// Neuroimmunol. – 2012. – Vol. 243. – P. 34–42.

196. McAlees J. W. Epigenetic Regulation of Beta2-Adrenergic Receptor Expression in T_H1 and T_H2 Cells /J. W. McAlees, L. T. Smith, R. S. Erbe [et al.]//BrainBehavImmun. 2011 – 2011. – Vol. 25(3). –P. 408–415.
197. McCray C. Stress and autoimmunity /C. McCray, S. Agarwal // Immunol Allergy Clin North Am. – 2011. – Vol. 1. – P.1-18.
198. McHeyzer-Williams L. Follicular helper T-cells as cognate regulator of B cell immunity /L. McHeyzer-Williams, N. Pelletier, L. Mark [et al.]// Curr. Opin. Immunol. – 2009. – Vol.21. – P. 266–273.
199. Meijsing S. H. DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity /S. H. Meijsing, M. A. Pufall, A. Y. So // Science. – 2009. – Vol. 324(5925). – P. 407–410.
200. Meng G. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses /G. Meng, F. Zhang, I. Fuss [et al.]// Immunity. – 2009. – Vol. 30. – P. 860–874.
201. Meng G. New insights into the nature of autoinflammatory diseases from mice with Nlrp3 mutations/ G. Meng, W. Strober //Eur J Immunol. – 2010. – Vol. 40. –P. 649–653.
202. Menu P. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly /P. Menu, J. Vince // ClinExpImmunol. – 2011. – Vol. 166. – P. 1-15.
203. Milde A. M. A study of the effects of restraint stress on colitis induced by dextran sulphate sodium in singly housed rats/A. M. Milde, R. Murison //Integr Physiol Behav Sci. – 2002. – Vol. 37(2). – P. 140-150.
204. Miller A. Depression and Immunity: A Role for T cells? /A. Miller// BrainBehavImmun. – 2010 – Vol. 24, № 1. – P. 1–8.
205. Miller G. Low early-life social class leaves a biological residue manifested decreased by glucocorticoid and increased proinflammatory signaling /G. Miller, E. Chen, A. Fok [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2009. – Vol. 106 (34). – P.14716-14721.
206. Moebius J. Immunoproteasomes are essential for survival and expansion of T cells in virus-infected mice /J. Moebius, M. Broek, M. Groettrup [et al.] // Eur. J. Immunol. - 2010. - Vol. 40. - P. 3439-3449.

207. Moghaddami M. Lymphocyte-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine /M. Moghaddami, A. Cummins, G. Mayrhofer // *Gastroenterology*. – 1998. – Vol. 115(6). – P. 1414-1425.

208. Mowat A. M. Regional specialization within the intestinal immune system / A. M. Mowat, W. W. Agace // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – doi:10.1038/nri3738. – P. 1-19.

209. Muchamuel T. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis /T. Muchamuel, M. Basler, M. Aujay [et al.] // *Nat Med*. – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 781-787.

210. Munn D. Indoleamine 2, 3-dioxygenase, Tregs and cancer/D. Munn // *Curr. Med. Chem*. – 2011. – Vol. 18, №15. – P. 2240–2246.

211. Murai M. Regulatory T-cell stability and plasticity in mucosal and systemic immune systems /M. Murai, P. Krause, H. Cheroutre, M. Kronenberg// *Mucosal Immunol*. – 2010. – Vol. 3 № 5. – P.443-449.

212. Myung-Whan S. Decreased Immunoreactivities of the Chloride Transporters, KCC2 and NKCC1, in the Lateral Superior Olive Neurons of Kanamycin-treated Rats /S. Myung-Whan, Ahn Seung Cheol// *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*. – 2012. – Vol. 5, № 3. – P. 117-121.

213. Neisewander J. L. Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction /J. L. Neisewander, N. A. Peartree, N. S. Pentkowski// *Psychopharmacology (Berl)*. – 2012 – Vol. 224(1). – P. 33-56.

214. Nussbaum A. Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8⁺ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination /A. Nussbaum, M. Rodriguez-Carreno, N. Benning [et al.] // *J Immunol*. – 2005. – Vol. 175, № 2. – P. 1153-1160.

215. Oh H. NF-κB: roles and regulation in different CD4⁺ T-cell subsets /H. Oh, S. Ghosh// *Immunological Reviews*. – 2013. – Vol. 252. – P. 41–51.

216. Ohno I. Bronchial asthma and psychological stress / I. Ohno // *RinshoByori*. – 2010. – Vol. 58, № 3. – P. 292-299.
217. Oida T. Role of gut cryptopatches in early extrathymic maturation of intestinal intraepithelial T cells /T. Oida, K. Suzuki, M. Nanno [et al.]//*J Immunol*. – 2000. – Vol. 164. – P. 3616 – 26.
218. Okoye I. S. CD 4+T helper 2 cells – microbial triggers, differentiation requirements and effector functions / I. S. Okoye, M. S. Wilson // *Immunology*. – 2011. – Vol. 134. – P. 368–377.
219. Orlovsky M. A. Allelic polymorphism of glucocorticoid receptor NR3C1 (GR): from molecular biology to clinical implications /M. A. Orlovsky // *Biopolymers and Cell*.-2012.-Vol.28.-P.338-351.
220. Ozaki E. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives /E. Ozaki, M. Campbell, S. Doyle // *J Inflamm Res*. – 2015. – Vol. 16, №8. – P. 15-27.
221. Pace T. Increased stress-induced inflammatory responses in male patients with major depression and increased early life stress /T. Pace, T. Mletzko, O. Alagbe// *Am. J. Psychiatry*. – 2006. – Vol. 163. – P. 1630-1633.
222. Palma G. D. The Microbiota-Gut-Brain axis in gastrointestinal disorders: Stressed bugs, stressed brain or both? / G. D. Palma, S. M. Collins, P. Bercik [et al.] // *J Physiol*. – 2014, on June 23, P.1-31.
223. Park H. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin /H. Park, Z. Li, X.O. Yang [et al.]// *Nat. Immunol*. 2005. Vol.. 6. P. 1133—1141.
224. Paul M.St. Toll-like receptor ligands induce the expression of interferon-gamma and interleukin-17 in chicken CD4+ T cells /M. St. Paul, N. Barjesteh, S. Paolucci [et al.]// *BMC Research Notes*. – 2012. – Vol. 5. – P. 1-13.
225. Pearson C. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut / C. Pearson, H. H. Uhlig, F. Powrie // *Trends in Immunology*. – 2012. – Vol. 33, №. 6. – P. 289-296.

226. Pillai S. Birth pangs: the stressful origins of lymphocytes /S. Pillai // *J.Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 115.-P. 224–227.
227. Porsolt R. D. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment /R. D. Porsolt, M. Le. Pichon, M. Jalfre// *Nature.* – 1977. – Vol. 266. – P. 730-732.
228. Porter R. W. Some experimental observations on gastrointestinal lesions in behaviorally conditioned monkeys /R. W. Porter, J. V. Brady, D. Conrad [et al.] // *Psychosom Med.* – 1958 . – Vol. 20(5). – P. 379-394.
229. Powell D. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via β -adrenergic induction of myelopoiesis /D. Powell, K. Sloan, M. Bailey // *PNAS.*-2013.-Vol.3.-P.1-6.
230. Powell N. Psychosocial stress and inflammation in cancer /N. Powell, A. Tarr, J. Sheridan // *Brain, Behavior and Immunity.* - 2013. - Vol. 30. - P. 41-47.
231. Powell N. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion /N. Powell, M. Bailey, J. Mays [et al.]// *Brain Behav. Immun.* – 2009. – Vol. 23. – P. 225-231.
232. Primrose P. E. Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection / P. E. Primrose Freestone, Sara M. Sandrini, Richard D. Haigh, Mark Lyte // *Trends in Microbiology.* – 2008. – Vol.16, №.2. – P. 55-64.
233. Prut L. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review /L. Prut, C. Belzung// *European Journal of Pharmacology.* – 2003. – Vol. 463 (1–3). – P. 3–33.
234. Rasmussen B. Psychosocial issues of women with type 1 diabetes transitioning to motherhood: a structured literature review/ B. Rasmussen, C. Hendrieckx, B. Clarke [et al.]// *BMC Pregnancy Childbirth.* – 2013. – Vol.13. – P. 218.
235. Reader B. F. Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation and anxiety/ B. F. Reader, B. L. Jarrett, D. B. McKim [et al.]// *Neuroscience.* – 2015. – Vol. 289. – P. 429-442.

236. Reber S. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress-induced colitis /S. Reber, S. Peters, D. Slattery [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2011. – Vol. 25. – P.1153-1161
237. Reber S. Stress and animal models of inflammatory bowel disease-an update on the role of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis /S. Reber// *Psychoneuroendocrinology.* – 2012. – Vol. 37(1). – P. 1-19.
238. Rehm K. E. The impact of self-reported psychological stress levels on changes to peripheral blood immune biomarkers in recreational marathon runners during training and recovery/K. E. Rehm, O.U. Elci, K. Hahn//*Neuroimmunomodulation.* – 2013. – Vol. 20(3). – P. 164-176.
239. Reynolds J. Toll-like receptor 2 signaling in CD4⁺ T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease /J. Reynolds, B. Pappu, J. Peng// *Immunity.* – 2010. – Vol. 32. – P. 692–702.
240. Reynolds J. M. Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function / J. M. Reynolds, Chen Dong // *Trends in Immunology.* – 2013. – Vol. 34, №. 10. – P. 511-519.
241. Robinson C. Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal microbiota /C. Robinson, V. Young// *Gut Microbes.* – 2010. – Vol. 1. – P. 279–284.
242. Rocha B. The extrathymic T-cell differentiation in the murine gut /B. Rocha//*Immunological Reviews.* – 2007. – Vol. 215. – P. 166–177.
243. Round J.L. Inducible Foxp3⁺regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota / J. L. Round, S. K. Mazmanian // *PNAS.* – 2010. – Vol. 107. – P. 12204–12209.
244. Ruan Q. Nuclear Factor- κ B in Immunity and Inflammation: The Treg and Th17 Connection / Q. Ruan, Y. H. Chen // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2012. – Vol. 946. – P. 207-221.
245. Saito H. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches /H. Saito, Y. Kanamori, T. Takemori [et al.]// *Science.* – 1998. – Vol. 280. – P. 275–278.

246. Sanders M. The Beta2-Adrenergic Receptor on T and B Lymphocytes: Do We Underst and It Yet? /M. Sanders// *BrainBehav Immun.* – 2012. – Vol. 26(2). – P.195–200.

247. Sandra R. S. Role of Epidermal Growth Factor and Growth Hormone-releasing Peptide-6 in Acceleration of Renal Tissue Repair After Kanamycin Overdosing in Rats / R. S. Sandra, Lucía González Núñez, Diana García del Barco Herrera// *Iranian Journal of Kidney Diseases.* – 2014. – Vol. 8. – P. 382-388.

248. Santaolalla R. Innate immunity in the small intestine / R. Santaolalla, M. T. Abreu // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 28(2). – P. 124–129. Salem S.N. Non-specific ulcerative colitis in Bedouin Arabs /S.N. Salem, K.S. Shubair // *Lancet.* – 1967. – Vol. 1(7488). – P. 473-485.

249. Schmidt D. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th17 cell responses / D. Schmidt, S. Reber, A. Lechner // *Brain Behav Immun.* – 2010. – Vol. 24, №7. – P. 1097-1104.

250. Schultze-Florey C. R. When grief makes you sick: bereavement induced systemic inflammation is a question of genotype /C. R. Schultze-Florey, O. Martínez-Maza, L. Magpantay [et al.] // *Brain Behav Immun.* – 2012. – Vol. 26 (7). – P. 1066-1071.

251. Sepa A. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy /A. Sepa, J. Wahlberg, O. Vaarala // *DiabetesCare.* – 2005. – Vol. 28. – P. 290–295.

252. Shida K. Flexible cytokine production by macrophages and T cells in response to probiotic bacteria: a possible mechanism by which probiotics exert multifunctional immune regulatory activities /K. Shida, M. Nanno, S. Nagata // *GutMicrobes.* – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 109-114.

253. Shimazu T. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the TLR signaling pathway /T. Shimazu, J. Villena, M. Tohno// *Infect Immun.* – 2012. – Vol. 80. – P. 276–288.

254. Shulman Z. T follicular helper cell dynamics in germinal centers /Z. Shulman, A.D.Gitlin, S.Targ [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol 341. – P. 673–677.

255. Slavich G. M. From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression /G. M. Slavich, M. R. Irwin// *Psychol Bull.* – 2014. – Vol. 140(3). – P. 774–815.
256. Sommer F. The gut microbiota– masters of host development and physiology /F. Sommer, F. Bäckhed// *Nature Reviews Microbiology.* -2013.-Vol.2.-P.1-12.
257. Sonnenberg G. F. Innate Lymphoid Cell Interactions with Microbiota: Implications for Intestinal Health and Disease/G. F. Sonnenberg, D. Artis// *Immunity.* – 2012. – Vol. 37. – P. 601-610.
258. Sperandio V. Bacteria-host communication: the language of hormones/V. Sperandio, A. Torres, B. Jarvis // *ProcNatlAcadSci USA.* – 2003. – Vol. 100(15). – P.8951-8956.
259. Spits H. Innate lymphoid cells: emerging in sight sin development, line a gerelation ships and function / H. Spits, T. Cupedo // *Annu. Rev. Immunol.* - 2012. – Vol. 30. - P.647–675.
260. Stojanovich L. Stress and autoimmunity / L. Stojanovich // *Autoimmun Rev.* – 2010.- Vol. 5. – P. 271-276.
261. Stout C. Ulcerative colitis-like lesion in Siamang gibbons /C. Stout, R.L. Snyder//*Gastroenterology.* – 1969. – Vol. 57(3). – P. 256-261.
262. Strober W. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases / W. Strober, I. Fuss // *Gastroenterology.* – 2011. – Vol. 140, № 6. – P. 1756-1767.
263. Sun Y. Stress-induced corticotropin-releasing hormone-mediated NLRP6 inflammasome inhibition and transmissible enteritis in mice /Y. Sun, M. Zhang, C. Chen // *Gastroenterology.* – 2013. – Vol. 144(7). – P. 1478-1487.
264. Sutton C. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells/ C. Sutton, L. Mielke, K. Mills // *Eur. J. Immunol.* - 2012. – Vol. 42. - P.2221–2231.
265. Suzuki E. Immunoproteasome activity controls the balance of inflammatory and regulatory gene expression in T helper cells /E. Suzuki, T. Muchamuel, S. Arastu-Kapur [et al.]// *The J. of Immunology.* - 2011. - Vol. 186. - P. 152-161.

266. Tahoun A. Salmonella Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M Cells to Promote Intestinal Invasion /A. Tahoun, S. Mahajan, E. Paxton // *Cell Host & Microbe*. – 2012. – Vol. 15. – P. 645–656.

267. Takeuchi O. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. O. Takeuchi, S. Akira// *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – P. 805—820;

268. Tewari M. K. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent /M. K. Tewari, G. Sinnathamby, D. Rajagopal [et al.]// *Nat. Immunol.* - 2005. - Vol. 6. - P. 287—294.

269. Tilburg M. A. Psychosocial mechanisms for the transmission of somatic symptoms from parents to children/ M. A. Tilburg, R. L. Levy, L. S. Walker [et al.]// *World J Gastroenterol*. – 2015. – Vol. 21(18). – P. 5532-5541.

270. Tirosh B. XBP-1 specifically promotes IgM synthesis and secretion, but is dispensable for degradation of glycoproteins in primary B cells /B. Tirosh, N. Iwakoshi, L. Glimcher [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. 202. – P.505–516.

271. Todd D. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity /D. Todd, A. Lee, L. Glimcher // *Nat.Rev.Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – P.663–674.

272. Todd D. XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development /D. Todd, L. Mc Heyzer-Williams, L. Glimcher [et al.]// *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206. – P. 2151–2159.

273. Topol I. Study of expression of TLR2, TLR4 and transcription factor NF- κ Bstructuresof 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). – P. 115-122.

274. 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.

275. 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.

276. 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. 11Novel concepts in innate immunity. – Tübingen, Germany. – 2015. – P.89.

277. 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.

278. 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.

279. 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.

280. Uhlig H. H. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ Tcells during cure of colitis /H. H. Uhlig, J. Coombes, C. Mottet [et al.] //J. Immunol. – 2006. – Vol. 177. – P. 5852–5860.

281. Vandevyver S. New Insights into the Anti-inflammatory Mechanisms of Glucocorticoids: An Emerging Role for Glucocorticoid-Receptor-Mediated Transactivation / S. Vandevyver, L. Dejager, J. Tuckermann, C. Libert // Endocrinology. – 2013— Vol. 154. — № 3. — P. 993–1007.

282. Visekruna A. A key role for NF-κB transcription factor c-Rel in T-lymphocyte-differentiation and effector functions /A. Visekruna, A. Volkov, Steinh off U. //Clin. Dev. Immunol. – 2012. – Vol. 2012. – P. 239-368.

283. Visekruna A. Expression of catalytic proteasome subunits in the gut of patients with Crohn's disease /A. Visekruna, N. Slavova, S. Dullat [et al.]// *Int J ColorectDis.* – 2009. – Vol. 10. – P. 1133–1139.

284. Walker J.A. Innate lymphoid cells — how did we miss them? / J.A. Walker, J.L. Barlow, Andrew N. J. McKenzie // *Nature Reviews Immunology.* – 2013. – doi:10.1038/nri3349. – P. 1-13.

285. Wan Y. Y. GATA3: a master of many trades in immune regulation /Y. Y. Wan// *Trends in Immunology.* – 2014. . – Vol. xx – P. 1–10.

286. Weiss I. C. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat /I. C. Weiss, C. R. Pryce, A. L. Jongen-Rêlo [et al.]// *Behav Brain Res.* – 2004 – Vol. 152(2). – P. 279-295.

287. Williams A. Differential effects of three antibiotics on T helper cell cytokine expression / A. Williams, H. Galley, A. Watt // *J. Antimicrob Chemother.* – 2005.- Vol. 56, №3. – P. 502-506.

288. Williams A. *Immunology: mucosal and body surface defences* / Andrew Williams, Tracy Hussell, Clare Lloydby. – Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2012. – 398 p.

289. Willing B. Shifting the balance: antibiotic effects on host – microbiota mutualism/B. Willing, S. Russell, B. Finlay // *NatRevMicrobiol.* – 2011. – Vol. 9 № 4. – P. 233-243.

290. Wojno E. Innate Lymphoid Cells: Balancing Immunity, Inflammation, and Tissue Repair in the Intestine/ E. Wojno, D. Artis // *Cell Host & Microbe* - 2012 - Vol.12. - P.445-457.

291. Yaochite J. N. Dynamic changes of the Th17/Tc17 and regulatory T cell populations interfere in the experimental autoimmune diabetes pathogenesis/ J. N. Yaochite, C. Caliar-Oliveira, M. R. Davanso // *Immunobiology.* – 2013. – Vol. 218, № 3. – P. 338-352.

292. Zanin-Zhorov A. Signaling via TLR2 and TLR4 directly down-regulates T cell effector functions: the regulatory face of danger signals / A. Zanin-Zhorov, I. R. Cohen // *Frontiers in Immunology.* –2013. – Vol. 4. – P. 1-5.

293. Zarrati M. Lactobacillus acidophilus La5, Bifidobacterium BB12, and Lactobacillus casei DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people / M. Zarrati, F. Shidfar, K. Nourijelyani // Biofactors. – 2013. Sep 10.

294. Zelante T. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22 / T. Zelante, R.G. Iannitti, C. Cunha [et al.] // Immunity. – 2013. – Vol. 39. – P. 372–385.

295. Zhao H. Probiotic increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice / H. Zhao, X. Huang, Z. Zuo // World J Gastroenterol. – 2013. – Vol. 19, № 5. – P. 742–749.

296. Zheng G. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner / G. Zheng, Shu-Pei Wu, Y. Hu, D. E. Smith // Neurogastroenterol Motil. – 2013 — Vol. 25(2). – P. e127–e139.

297. Ziegler S. F. FOXP3: Of Mice and Men / S. F. Ziegler // Annu. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 24. – P. 209–226.