

Ю.М. Колесник, О.М. Камишний, А.В. Абрамов

Пошук шляхів корекції дисфункції тимуса у щурів з експериментальним цукровим діабетом

Изучали влияние многократных введений прекурсора NO L-аргинина и неселективного блокатора NOS N-нитро-L-аргинина (NNLA) на морфофункциональное состояние тимуса у крыс-самцов линии Вистар с экспериментальным сахарным диабетом. Для выявления инсулинэкспрессирующих, пролиферирующих, регуляторных T-клеток (T_{pe2}), iNOS⁺-клеток и Vcl-2⁺-клеток тимуса использовали иммуногистохимические методы прямой и непрямой иммунофлюоресценции с применением моноклональных антител к инсулину, PCNA, CD25-антигену, Vcl-2 и iNOS. Установлено, что введения NNLA крысам с диабетом оказывают более значительный эффект по сравнению с введениями L-аргинина, что проявляется в увеличении количества T_{pe2} -клеток, инсулинэкспрессирующих и пролиферирующих тимоцитов, а также в уменьшении плотности популяции iNOS⁺- и Vcl-2⁺-клеток.

ВСТУП

В останні роки стало відомо, що одним з основних патогенетичних факторів розвитку цукрового діабету (ЦД) є порушення формування центральної толерантності до панкреатичних антигенів [14], причиною яких можуть бути зміни морфофункціонального стану антигенпрезентуючих клітин (АПК) тимуса (їх кількості, експресії костимуляторних молекул CD80 та CD86 тощо) або без належної наявності β-клітинних антигенів у тимусі [11, 32]. В нормальних умовах на АПК тимуса відбувається випадкова експресія тканинно-специфічних антигенів, рівень якої контролюється аутоімунним регулятором транскрипції [11]. Накопичено багато фактичного матеріалу, що свідчить про важливу роль порушення функціонування центрального органа імуногенеза – тимуса у механізмах розвитку ЦД [14, 28]. Безперечним доказом участі тимуса в імунопатогенетичних механізмах розвитку ЦД є той факт, що використання цілої низки заходів може запобігати або сприяти ремісії захворюван-

ня за допомогою відновлення толерантності до β-клітинних антигенів: блокада діабетогенних цитокінів, внутрішньотимічна пересадка β-клітин або введення глутаматдекарбоксилази (ГДК), застосування моноклональних антитіл проти CD3⁺- і CD8⁺-антигенів [10], введення популяцій дендритних і T-регуляторних клітин тощо [25, 26, 28, 33].

Разом з тим одним з найважливіших чинників, що впливають на інтенсивність процесів селекції і апоптозу тимоцитів у нормі і при експериментальній патології є оксид азоту (NO), який може мати як про-, так і антиапоптотичну дію [3]. Експресію індукцибельної NO-синтази (iNOS) виявлено в дендритних клітинах, макрофагах, лімфоцитах і епітеліоретикулоцитах тимуса, а індукцію гена iNOS викликають інтерлейкін-1, інтерферон-α, γ, фактор некрозу пухлин α, β, бактерійні ліпополісахариди і окисний стрес [6]. Інгібітори NOS частково можуть захищати тварин від індукованого введенням стрептозоточину пошкодження β-клітин [17], а у мишей з інактивованим геном iNOS знижена чутливість до діабетогенних

© Ю.М. Колесник, О.М. Камишний, А.В. Абрамов

факторів [13]. Тому дуже перспективним напрямком пошуку шляхів корекції функції тимуса при ЦД є використання факторів, що впливають на продукцію та метаболізм монооксиду азоту в організмі.

Метою нашого дослідження було вивчити вплив прекурсора NO L-аргініну та не-селективного блокатора NOS N-нітро-L-аргініну (NNLA) на морфофункціональний стан тимуса у щурів з експериментальним ЦД.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 48 самцях щурів лінії Вістар масою 230–250 г, віком 5–6 міс. Тварин було розподілено на чотири групи. До I групи ввійшли інтактні тварини (контроль), до II – тварини з модельованим ЦД (одноразове внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину – 50 мг/кг). Тварини з діабетом, яким вводили 10 мг/кг NNLA склали III групу, а яким вводили 300 мг/кг L-аргініну – IV групу. Ці препарати були виробництва фірми “Sigma”, (США) і починали їх вводити з 2-го тижня розвитку ЦД протягом 14 діб. Через 3 тиж після розвитку ЦД тварин, у яких вміст цукру в крові перевищував 8 ммоль/л декапітували під наркозом і видаляли тимус, який фіксували в розчині Буена (18 годин) і після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін.

Для виявлення інсулінекспресуючих клітин (Ins⁺) в гістологічних зрізах тимуса використовували імуногістохімічний метод непрямой імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до інсуліну фірми “Peninsula Laboratories Inc”. (США). Стан проліферативної активності лімфоцитів тимуса оцінювали на основі методики імуногістохімічного виявлення ядерного антигена проліферуючих клітин PCNA (“Sigma Chemical”, США). Для дослідження інтенсивності експресії антиапоптотичного білка Bcl-2 та iNOS у тимусі було використано імуногістохімічний метод непрямой

імунофлюоресценції за допомогою моноклональних антитіл до Bcl-2 та iNOS щура (“Sigma Chemical”, США). Для ідентифікації натуральних CD4⁺ CD25⁺ регуляторних Т-клітин тимуса (T_{per}) застосовували імуногістохімічний метод прямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл до одного з основних маркерів регуляторних клітин – CD25 (антитіла виробництва “Caltag Laboratories”, США). Концентрацію глюкози в плазмі крові визначали глюкозооксидазним методом.

Досліджували кіркову та мозкову речовину тимуса, зображення яких за допомогою відеокамери СОНУ-4922 (США) вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (“Kontron Elektronik”, Німеччина). Надалі гістологічні зрізи дофарбовували гематоксилін-еозином для морфометричного дослідження та виявлення апоптотичних лімфоцитів. Вивчення структури тимуса проводили з використанням оригінального програмного забезпечення, розробленого на основі програмування VIDAS [1]. Результати статистично обробляли з використанням критерію t Стьюдента за допомогою пакета Statistica 6.0 (Stat-Soft, 2001). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Введення тваринам стрептозотоцину призводило до розвитку експериментального ЦД: так, уже до кінця 3-го тижня концентрація глюкози в крові збільшувалася в 4 рази (16,2 ммоль/л ± 0,2 ммоль/л, P<0,05) порівняно з контролем (3,9 ммоль/л ± 0,1 ммоль/л), спостерігалися полідипсія, гіперфагія та поліурія, тобто всі основні симптоми, характерні для інсулінзалежного ЦД. Введення L-аргініну не призводило до змін концентрації глюкози в крові експериментальних тварин, тоді як введення NNLA

супроводжувалося зниженням вмісту глюкози в крові до $10,1 \text{ ммоль/л} \pm 0,1 \text{ ммоль/л}$.

Встановлено, що розвиток експериментального ЦД спричинює зниження сумарної щільності Ins^+ -клітин у корі тимуса на 55 % ($P < 0,05$) і в мозковій речовині на 36 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин (таблиця). Введення L-аргініну не супроводжувалося достовірними змінами числа клітин Ins^+ в обох досліджених зонах тимуса порівняно зі значеннями у тварин з діабетом. Цей показник залишався нижчим за контрольні значення на 39–53 % ($P < 0,05$). Введення NNLA призвело до збільшення в кірковій речовині тимуса кількості Ins^+ клітин на 68 % ($P < 0,05$) порівняно зі значенням у щурів з ЦД (див. таблицю). У мозковій речовині тимуса введення NNLA не змінювали кількості клітин Ins^+ порівняно зі значеннями тварин з ЦД (див. таблицю). Враховуючи, що тимічний інсулін разом з іншими острівцевими антигенами (ГДК, карбоксипепти-

даза Н, проглюкагон, просоматостатин, пропанкреатичний поліпептид тощо) забезпечує формування центральної толерантності до β -клітин панкреатичних острівців [11, 14, 32] отримані результати допомагають зрозуміти роль дисфункції тимуса в механізмах розвитку ЦД. Перші прямі докази залежності розвитку толерантності до ендogenous інсуліну від рівня тимічної експресії останнього були одержані на трансгенних мишах лінії NOD як на моделі аутоімунного діабету, що спонтанно розвивається та нагадує цукровий діабет 1-го типу у людини [18]. У мишей, геном яких позбавлений гена Ins2 , вміст тимічного інсуліну зменшувався і з'явилася периферична аутореактивність до інсуліну, чого не спостерігалося у мишей, що втратили ген Ins1 . У мишей лінії NOD підвищена продукція контрінсулярних аутоантитіл, прискорений розвиток ЦД, що чітко корелює з відсутністю експресії гена Ins2 у тимусі [31].

Характеристика процесів диференціювання апоптозу і проліферативної активності клітин (на 1 мм^2 площі зрізу) у кірковій і мозковій речовині тимуса у щурів ($M \pm m$)

Щільність популяції клітин	Контроль (I група)	Діабет (II група)	Діабет	
			Введення NNLA (III група)	Введення L-аргініну (IV група)
Інсулінекспресуючі				
кора	367±28	165±11*	277±14***	171±12*
мозкова речовина	333±15	213±14*	218±12*	204±12*
CD25 ⁺				
кора	342±24	188±15*	274±15**	150±11*
мозкова речовина	322±21	125±7*	392±24***	136±9*
Vcl-2 ⁺				
кора	418±23	844±41*	399±21**	780±41*
мозкова речовина	541±32	888±44*	508±26**	768±33*
INOS ⁺				
кора	288±39	466±47*	116±23***	563±58*
мозкова речовина	356±34	394±35	150±21***	464±51*
Апоптотичні лімфоцити				
кора	6159 ± 63	3249 ± 48*	7388 ± 63***	6935 ± 68***
мозкова речовина	3220 ± 52	1574 ± 34*	4374 ± 56***	4568 ± 57***
Проліферуючі лімфоцити				
кора	971±38	235±16*	870±35**	246±16*
мозкова речовина	621±25	245±19*	792±40***	259±26*

* $P < 0,05$ відносно контролю, ** $P < 0,05$ відносно значень у II групі.

Важливу роль у забезпеченні імунологічної ауто толерантності і негативному контролі як патологічних, так і фізіологічних імунних реакцій відіграє популяція природних (натуральних) $CD4^+CD25^+$ -регуляторних Т-клітин (T_{reg}) [4, 28]. Елімінація або інактивація цих клітин викликає розвиток важких аутоімунних захворювань, а також призводить до посилення імунної відповіді на алоантигени і пухлинні клітини [5]. Функціональна дефектність $CD4^+CD25^+$ T_{reg} -клітин виявлена при багатьох аутоімунних захворюваннях людини й моделюючій їх експериментальній патології, насамперед при ЦД 1-го типу [4, 20]. Введення $CD4^+CD25^+$ Т-клітин дозозалежно знижує частоту спонтанного розвитку діабету у мишей лінії NOD [21, 25, 26], а у пацієнтів із ЦД 1-го типу був виявлений дефект супресорних функцій T_{reg} -клітин, що проявлялося зниженням продукції інтерлейкіну-10 і зміною вмісту внутрішньоклітинного цитотоксичного лейкоцитарного антигена CTLA [21]. Встановлено, що розвиток експериментального ЦД супроводжувався зниженням щільності популяції T_{reg} -клітин у кірковій речовині тимуса на 45 % ($P<0,05$) і в мозковій речовині на 61 % ($P<0,05$) порівняно з контрольною групою тварин (див. таблицю, рисунок). Введення L-аргініну не впливало на кількість T_{reg} -клітин, щільність популяції яких не змінювалася щодо значень у щурів з діабетом й залишалася вірогідно нижчим від контролю на 56–58 % ($P<0,05$). При введенні NNLA кількість T_{reg} -клітин відновлювалася до контрольних значень у кірковій речовині тимуса й значно підвищувалася в мозковій речовині (на 22 % вище від контролю, $P<0,05$; див. таблицю).

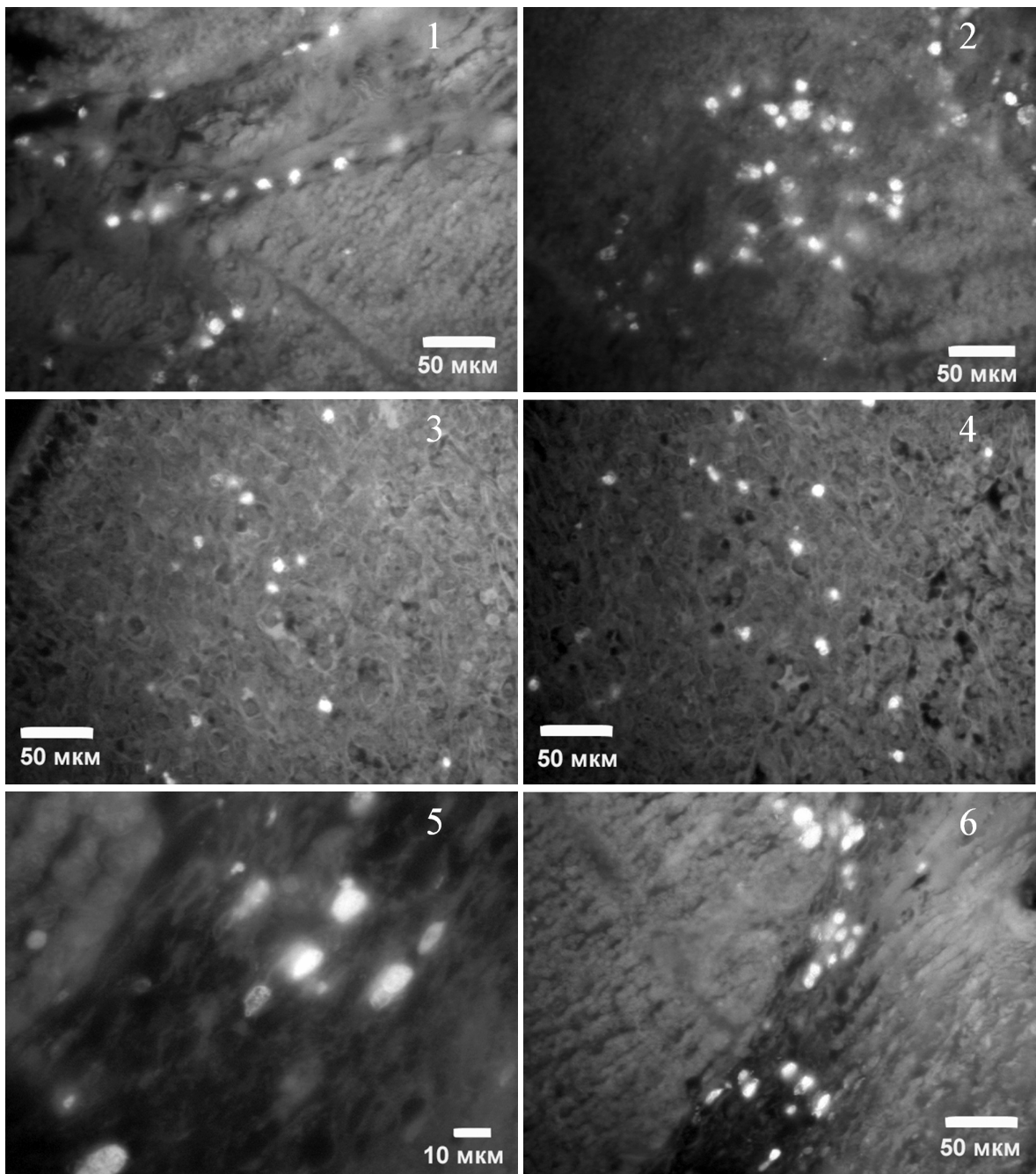
Важливим показником функціонального стану тимуса є інтенсивність процесів проліферації лімфоцитів. Розвиток експериментального ЦД супроводжувався зниженням сумарної щільності PCNA⁺-клітин в обох досліджених зонах тимуса на 61–76 % ($P<0,05$) порівняно з контрольною групою

тварин (див. таблицю). Введення L-аргініну не супроводжувалося достовірними змінами цього показника, тоді як введення NNLA призводило до збільшення в кірковій речовині тимуса кількості проліферуючих клітин в 3,7 раза щодо значень у щурів з ЦД і наближалось до контрольного рівня (див. таблицю). Аналогічну динаміку відзначали й у мозковій речовині тимуса, де після введення NNLA спостерігалось збільшення кількості PCNA⁺-клітин (див. таблицю).

Проблема дослідження молекулярних механізмів апоптозу та його ролі в розвитку аутоімунних захворювань, у тому числі й ЦД, стала в останні роки однією із самих важких й актуальних питань медико-біологічних наук [2,24,36]. Одним з найважливіших факторів, що впливають на інтенсивність процесів апоптозу в тимусі в нормі та при експериментальній патології, є NO. Іншим важливим регулятором апоптозу тимоцитів є продукт гена bcl-2 – білок Bcl-2, що експресується на мембрані мітохондрій і меншою мірою – на ядерній мембрані та на поверхні клітин тимуса [19, 34]. Таким чином, наслідки, викликані індукцією iNOS і гена bcl-2, становлять практичний інтерес у плані їх спільного ефекту в регуляції апоптозу при клінічній та експериментальній патології [27]. Встановлено, що розвиток експериментального ЦД супроводжується гіперекспресією Bcl-2: сумарна щільність Bcl-2⁺-клітин у корі тимуса зростає вдвічі ($P<0,05$) і в мозковій речовині на 64 % ($P<0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. Введення L-аргініну не впливало на кількість Bcl-2⁺-клітин у тимусі, тоді як введення NNLA призводило до зменшення їх числа на 53 % ($P<0,05$) у кірковій речовині й на 43 % ($P<0,05$) у мозковій порівняно з щурами з ЦД, повертаючись до рівня контрольних значень. Розвиток експериментального ЦД спричинює збільшення щільності популяції iNOS⁺-клітин у

корі тимуса на 62 % ($P < 0,05$), тоді як у мозковій речовині їх кількість вірогідно не змінюється порівняно з контролем. Ін'єкція

L-аргініну призводить до збільшення кількості iNOS⁺-клітин у корі тимуса на 21 % ($P < 0,05$) і не змінюється в мозковій речовині



Регуляторні Т-клітини в тимусі щура. Імуногістохімічна реакція прямої імунофлуоресценції з моноклональними антитілами до CD25: 1 – контроль, кора; 2 – контроль, мозкова речовина; 3 – діабет, кора; 4 – L-аргінін, мозкова речовина; 5 – NNLA, клітини у внутрішніх часточках периваскулярних просторів; 6 – NNLA, скупчення клітин у товщі міжчасточкових фіброзних перегородок

порівняно зі значеннями II групи тварин з діабетом. Введення NNLA супроводжується зниженням числа $iNOS^+$ -клітин на 75 % ($P < 0,05$) у кірковій і на 62 % ($P < 0,05$) у мозковій речовині щодо значень шурів з ЦД, зменшуючись нижче від контрольного рівня на 58–60 %. Число апоптотичних лімфоцитів у шурів з ЦД достовірно знижувалося на 47 % ($P < 0,05$) у кірковій речовині та на 51 % ($P < 0,05$) у мозковій порівняно з контролем, що, вочевидь, зумовлено зниженням загальної щільності популяції лімфоцитів при розвитку діабету (див. таблицю). Слід відмітити, що введення як L-аргініну, так й NNLA викликає подібні ефекти та супроводжується достовірним збільшенням числа апоптотичних лімфоцитів у тимусі порівняно зі значеннями у шурів з діабетом. І якщо у разі ін'єкції NNLA таку тенденцію можна пояснити зменшенням експресії Bcl-2 і посиленням проліферативної активності лімфоцитів тимуса, то при введенні L-аргініну крім посилення експресії $iNOS$, мабуть, задіяні й інші механізми регуляції чисельності апоптотичних лімфоцитів: посилення міграції клітин у тимус і зменшення інтенсивності тимічної еміграції лімфоцитів, що може збільшувати загальне число тимоцитів, у тому числі й апоптотичних.

Отримані результати дають можливість припустити наявність тісного зв'язку між зміною рівня експресії Bcl-2 й $iNOS$ і апоптотичних процесів у тимусі. Було також показано, що існує чітка залежність між інтенсивністю експресії Bcl-2 й $iNOS$ і рівнем апоптозу. Так, в експериментах з трансфекції макрофагів лінії RAW264 білком Bcl-2 трансфеговані клітини були захищені від загибелі викликану активацією $iNOS$ [8]. Висловлено припущення, що апоптотичний ефект Bcl-2 реалізується за допомогою значного зниження NO-індукованого підвищення експресії білка Вах [35]. В інших дослідах клітини лінії пухлини

P815, трансфеговані Bcl-2, були стійкі до дії – SNAP (S-нітрозо-N-ацетилпеніциламіну) і до NO-асоційованої цитотоксичності активованих мишачих макрофагів [23]. Клітини лінії L929 були захищені гіперекспресією Bcl-2 від апоптозу, викликаного активацією $iNOS$ [23]. Безліч інших прикладів взаємодії NO з Bcl-2 наведено в огляді Брюне [9]. Разом з цим є й протилежні дані, згідно з якими взаємодія NO зі членами суперсімейства Bcl-2 виражається в тому, що при дії NO на клітину знижується вміст внутрішньоклітинного білка Bcl-2, можливо, через каспазіндуковане розщеплення [30] або р53-залежне пригнічення його експресії [22]. Цікаві і дані про роль мітохондрій у сприйнятті апоптотичного сигналу від NO і до синтезу самого NO [7, 12]. У деяких працях показано наявність конститутивної форми NOS у мітохондріях і, зокрема, здатності мітохондрій печінки шурів до самостійного синтезу NO [12, 16]. В працях, присвячених очищенню мітохондріальної NOS і вивчення її ферментативних характеристик показано, що ця ізоформа NOS локалізована у внутрішній мітохондріальній мембрані [15]. З'ясувалося, що мітохондріальна NOS дуже схожа до макрофагальної $iNOS$, але експресується конститутивно. Нині ще не зрозуміло, вважати мітохондріальну NOS окремою ізоформою, або це та сама $iNOS$, що містить посттрансляційні модифікації, які призводять до іншої субклітинної локалізації [7, 15]. Відкриття мітохондріальної NOS дає змогу не лише функціонально, але й просторово поєднати NO-залежний апоптоз і його регулятори із сімейства bcl-2, тим паче, що, крім NO, мітохондрії генерують активні форми кисню, а значить беруть участь у патогенезі ушкодження клітини [29].

Таким чином, отримані результати свідчать про істотний вплив введення неселективного блокатора NOS NNLA на характер експресії тимічного інсуліну, Bcl-2, $iNOS$ і морфофункційний стан T_{per} -клітин

у щурів з експериментальним ЦД. NNLA при зміні інтенсивності продукції NO активно впливає на дозрівання, диференціювання, проліферацію й апоптоз тимоцитів, що, насамперед може впливати на проходження процесів позитивної та негативної селекції лімфоцитів тимуса, а також на інтенсивність презентації ?-клітинних антигенів і формування центральної й периферичної толерантності до панкреатичних антигенів. Водночас введення прекурсора NO L-аргініну впливає лише на кількість апоптотичних лімфоцитів, а не на характер експресії інших досліджених маркерів. У цілому, значний інтерес матимуть наступні дослідження з пошуку нових способів корекції імунних порушень при ЦД за допомогою введення факторів, що впливають на продукцію й метаболізм NO.

Yu.M. Kolesnik, A.M. Kamyshny, A.V. Abramov

SEARCH FOR WAYS TO CORRECT THYMIC DYSFUNCTION IN RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

We investigated the influence of multiple introductions of NO precursor L-arginine and NOS non-selective blocker N-nitro-L-arginine (NNLA) on thymic morpho-functional status in Wistar male rats with experimental diabetes mellitus (EDM). To reveal insulin-expressing, proliferating, Treg-cells, iNOS⁺-cells and Bcl-2⁺-cells, the immunohistochemical methods of direct and indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies to insulin, PCNA, CD-25 antigen, Bcl-2 and iNOS of rat were used. It was established that NNLA administration to rats with EDM has more pronounced effect in comparison with L-arginine administration, demonstrating an increase in the number of Treg-cells, insulin-expressing and proliferating thymocytes and a decrease in the density of iNOS⁺- and Bcl-2⁺-cells population.

Zaporozhye Medical State University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Абрамов А.В., Колесник Ю.М., Любомирська В.А., Камишний О.М. Алгоритм автоматичного аналізу лімфоїдної популяції тимуса // Вісн. морфології. – 2002. – №2. – С. 261–262.
2. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. I – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.

3. Колесник Ю.М., Камишний А.М., Абрамов А.В. Эффекты NO в иммунной системе: NO и тимус // Запорож. мед. журн. – 2006. – №2. – С.5–11.
4. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функция // Мед. иммунология. – 2005. – 7, № 4. – С. 347–354.
5. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Регуляторные Foxp3+ Т-клетки и их роль при аллергии // Рос. аллергол. журн. – 2005. – № 2. – С. 22–26.
6. Bogdan C. The function of nitric oxide in the immune system // Handbook of Exp. Pharmacol. – 2000. – 3. – P. 443–492.
7. Brookes P. Mitochondrial nitric oxide synthase // Mitochondrion. – 2004 – 3. – P. 187–204.
8. Brune B., Gotz C., Mebmer U. et al. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide mediated apoptosis // J. Biol. Chem. – 1997 – 272. – P. 7253–7258.
9. Brune B., von Knechten A., Sandau K. Nitric oxide and its role in apoptosis // Eur. J. Pharmacol. – 1998 – 351. – P. 261–272.
10. Chatenoud L., Bluestone J. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity // Nat. Rev. Immunol. – 2007. – 8. – P.622–632.
11. Derbinski J., Gabler J., Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels // J. Exp. Med. – 2005. – 202. – P.33–45.
12. Elfering S., Sarkela T., Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase // J. Biol. Chem. – 2002. – 277. – P. 38079–38086.
13. Flodstrom M., Tyrberg B., Eizirik D., Sandier S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes // Diabetes – 1999. – 48. – P. 706–713.
14. Geenen V., Brilot F., Louis C. et al. Importance of a thymus dysfunction in the pathophysiology of type 1 diabetes // Rev. Med. Liege. – 2005. – 60. – №5–6. – P.291–296.
15. Giulivi C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. // Free Radical Biol. Med. – 2003. – 34. – P. 397–408.
16. Green D., Reed J. Mitochondria and apoptosis // Science. – 1998. – 281. – P.1309–1312.
17. Haluzfk M., Nedveldkovi J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications // Physiol. Res. – 2000. – 49. – P. 37–42.
18. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K. et al. Extrapaneatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – 101. – P. 2458–2463.
19. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis // Nat. Med. – 1997. – 3. – P.614–620.
20. Lindley S., Dayan C. Defective suppressor function in CD4+CD25+T-cells from patients with type 1 diabetes

- tes // *Diabetes*. – 2005. – **54**. – P. 92–99.
21. Luo X., Yang H., Kim I. et al. Systemic transforming growth factor-beta 1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice // *Transplantation*. – 2005. – **79**. – P. 1091–1096.
 22. Mebmer U., Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways // *J. Biochem.* – 1996. – **319**. – P. 299–305.
 23. Mebmer U., Reed J., Brune B. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **271**. – P. 20192–20197.
 24. Opferman J., Korsmeyer S. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system // *Nat. Immunol.* – 2003. – **4**. – P.410–415.
 25. Piccirillo C., Tritt M., Sgouroudis E. et al. Control of type I autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2005. – **1051**. – P. 72–87.
 26. Pop S., Wong C., Culton D. et al. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGF beta 1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes // *J. Exp. Med.* – 2005. – **201**. – P. 1333–1346.
 27. Rietz C., Screpanti V., Brenden N. Overexpression of bcl-2 in T cells affects insulinitis in the nonobese diabetic mouse // *Scand. J. Immunol.* – 2003. – **57**. – №4. – P.342–349.
 28. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – **22**. – P. 531–562.
 29. Sarkela T., Berthiaume J., Elfering S. et al. The modulation of oxygen radical production by endogenous nitric oxide in mitochondria // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 6945–6949.
 30. Tejedo J., Bernabe J., Ramirez R., Sobrino F. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells // *FEBS Lett.* – 1999. – **459**. – P. 238–243.
 31. Thebault K., Debois D., Vallon-Geoffroy K. et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice // *J. Clin. Invest.* – 2003. – **111**. – P. 851–857.
 32. Throsby M., Homo-Delarche F., Chevenne D., Goya R., Dardenne M., Pleau J. Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages // *Endocrinology*. – 1998. – **139**. – P. 2399–2406.
 33. Trucco M., Giannoukakis N. Immunoregulatory dendritic cells to prevent and reverse new-onset type 1 diabetes mellitus // *Exp. Opin. Biol. Therap.* – 2007. – **7**. – P.951–963.
 34. Williams O., Norton T., Halligey M. The action of Bax and Bcl-2 on T cell selection // *J. Exp. Med.* – 1998. – **188**. – P.1125–1133.
 35. Yoshioka Y., Yamamuro A., Maeda S. Nitric oxide at a low concentration protects murine macrophage RAW264 cells against nitric oxide-induced death via cGMP signaling pathway // *Brit. J. Pharmacol.* – 2003. – **139**. – P. 28–34.
 36. Zhang N., Hartig H., Draper D., He Y. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes // *Cell Res.* – 2005. – **10**. – P.749 – 769.

Запорізь. мед. ун-т МОЗ України
 e-mail: Kamyshny@patho.zsmu.edu.ua

Матеріал надійшов до редакції 22.01.2008