

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ЖЕРЕБЯТЬЄВ ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ



УДК: 616.34-002-036-08-097-092.9

**ІМУНОПОСЕРЕДКОВАНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ КИШКІВНИКА
ТА МОЖЛИВОСТІ ЇХ КОРЕКЦІЇ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата
медичних наук

Запоріжжя – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, доцент **Камишний Олександр Михайлович**, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор **Воронцова Лоліта Леонідівна**, ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти» МОЗ України, завідувач кафедри клінічної лабораторної діагностики;

- доктор медичних наук, професор **Костенко Віталій Олександрович**, ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України, завідувач кафедри патологічної фізіології.

Захист відбудеться « 26 » _____ травня _____ 2016 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.04 при Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України (69035, Україна, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, Україна, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий « 22 » _____ квітня _____ 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



А.В. Євсєєв

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Запальні захворювання кишківника (ЗЗК) є важливою медичною та економічною проблемою, яка обумовлена зростанням захворюваності, важким безперервним перебігом, ускладненнями та економічними витратами на їх лікування [Fioschi C., 2015]. За даними ВООЗ захворюваність на неспецифічний виразковий коліт (НВК) складає 0,5–24,5 /100 тис. населення, на хворобу Крона (ХК) — від 0,1-16 / 100 тис. в залежності від розташування країни [Duricova D. et al., 2010]. В Україні кількість хворих за останні 11 років збільшилася майже вдвічі [Бойко Т. Й., 2013]. Етіопатогенез ЗЗК складається з чотирьох основних компонентів: факторів навколишнього середовища, кишкової мікрофлори, стану імунної системи та генетичної схильності організму [Wang M. H. et al., 2015]. Кишковий бар'єр — це бактеріальна біоплівка, слиз, клітини епітелію та кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ). В дисфункції цього комплексу провідну роль відіграють рецептори вродженого імунітету, які розпізнають патоген-асоційовані молекулярні образи (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) мікроорганізмів. До них відносяться паттерн-розпізнавальні рецептори (PRR): Toll-like рецептори (TLR), NOD-like рецептори (NLR) та RIG-like рецептори (RLR) [Kim H. et al., 2015]. NLRP3-інфламасома сприяє дозріванню IL-1 β , її активація є критичним механізмом патогенезу ЗЗК [Baroja-Mazo A. et al., 2014]. Різні субпопуляції Т-хелперів також безпосередньо залучені в патогенез ЗЗК, а зміни експресії регуляторів їх диференціювання у напрямку Th1, Th2, Th17 та Treg — транскрипційних факторів T-bet, GATA-3, ROR γ t та Foxp3 можуть бути одними з факторів, що підтримують прогресування патологічного процесу [Mohammadzadeh A. et al., 2014].

На сьогоднішній день єдиним ефективним методом лікування ЗЗК залишається «базисна» терапія, проте стійка ремісія при такому лікуванні досягається лише у 30% хворих [Singh D. et al., 2015]. У цьому аспекті викликає інтерес використання статинів, нещодавно відкриті холестерин-незалежні ефекти яких чинять різні плейотропні ефекти, в тому числі впливають на прениляцію низки білків, зокрема мономерних ГТФаз (Ras, Rho та ін.), які регулюють диференціювання, проліферацію і апоптоз клітин імунної системи [Artero A., 2012]. Важливу роль в регуляції запалення та імунної відповіді грає баланс між прозапальним цитокіном IL-1 β та антагоністом рецепторів IL-1 (IL-1ra). Тому ми звернули увагу на можливість застосування симвастатина й антагоніста рецепторів інтерлейкіна-1 (АРІЛ-1) для корекції імунних порушень при експериментальних ЗЗК у тварин.

Вивчення нових аспектів ролі КАЛТ при ЗЗК дозволить виділити ключові імунні ланки їх розвитку та прогресії, а також підійти до вирішення проблеми діагностики та розробки нових підходів патогенетичної корекції стану імунної системи у пацієнтів із цими захворюваннями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом планової наукової роботи кафедри мікробіології, вірусології та

імунології Запорізького державного медичного університету «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології» (2012-2017 рр., № держреєстрації 0112U005642). Дисертант є співвиконавцем теми.

Мета і задачі дослідження. Удосконалення знання про закономірності та механізми змін функціонального стану кишково-асоційованої лімфоїдної тканини за умов розвитку експериментального ілеїту та коліту і в динаміці їх патогенетично-обґрунтованої корекції симвастатином та антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 за допомогою імуофлюоресцентних і молекулярно-генетичних методів.

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Оцінити вираженість розвитку експериментальної патології та відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, NLRP3-інфламасоми, c-Rel субодиниці NF- κ B та рецептора коротколанцюгових жирних кислот FFAR2, а також аларміну HMGB1 у кишківнику щурів у контролі, в умовах розвитку експериментального гострого і хронічного ілеїту та коліту.

2. Вивчити розподіл TLR2⁺-, TLR4⁺- і NF- κ B⁺-лімфоцитів та особливості експресії NOD- і RIG-подібних рецепторів вродженого імунітету в лімфоїдних структурах тонкої та товстої кишок щурів у контролі, в умовах розвитку експериментального гострого і хронічного ілеїту та коліту.

3. Визначити клітинний склад T-bet⁺ (Th1), GATA3⁺ (Th2), ROR γ t⁺ (Th17) і Foxp3⁺-клітин (Treg) у лімфоїдних структурах тонкої та товстої кишок у цих же експериментальних групах.

4. Дослідити особливості експресії маркеру аутофагії Atg16 та рецепторів ксенобіотиків AhR лімфоцитами тонкої та товстої кишок у цих же експериментальних групах.

5. Вивчити вплив введення симвастатину та антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на ланки вродженого та адаптивного імунітету у лімфоїдних структурах тонкої та товстої кишок у цих же експериментальних групах.

Об'єкт дослідження — експериментальний гострий і хронічний ілеїт та коліт.

Предмет дослідження — структура і функціональний стан лімфоїдної популяції ізольованих лімфоїдних вузликів і власної пластинки слизової оболонки ворсинок клубової кишки, власної пластинки слизової оболонки і підслизової основи товстої кишки щурів з експериментальним гострим і хронічним ілеїтом та колітом.

Методи дослідження: патофізіологічні (моделювання гострого ілеїту, хронічного ілеїту та коліту), гістологічні (оцінка мікроскопічних уражень кишківника), морфометричні (визначення площі і периметру клітин), імуофлюоресцентні (ідентифікація імунопозитивних клітин), метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (оцінка відносного рівня мРНК), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз (розрахунок щільності розподілу імунопозитивних клітин, а

також щільності рецепторів на цих клітинах), методи статистичного аналізу отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі за допомогою сучасних молекулярно-генетичного і імунофлюоресцентного методів виділені ключові імунні ланки розвитку і прогресії експериментальних запальних захворювань кишківника. Вперше встановлено, що розвиток експериментальної патології у щурів супроводжується підвищенням рівня мРНК прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A, NLRP3-інфламасоми, рецептора FFAR2 та аларміну HMGB1. Вперше з'ясовані особливості експресії при експериментальній патології рецепторів вродженого імунітету TLR2, TLR4, NOD2 і RIGI клітинами адаптивної ланки — лімфоцитами.

Виявлені особливості залучення адаптивної ланки імунної системи в розвиток патології, а саме зсув співвідношення Th1/ Th2 в бік останніх, а також активації прозапальної ланки і недостатності імуносупресорної ланки імунітету. Вперше встановлені регіонарні особливості розподілу клітин вродженого і адаптивного імунітету в різних відділах кишківника, які визначають локалізацію патологічного процесу. Вперше показано, що введення симвастатину й APII-1 щурам справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки експериментального ілеїту й коліту, впливає на вроджений імунітет, змінюючи баланс TLR2⁺ / TLR4⁺-клітин і щільність TLR2 і TLR4, кількість NF- κ B⁺-лімфоцитів і концентрацію NF- κ B в клітинах, кількість NOD2⁻ і RIGI⁺-лімфоцитів, а також впливає на адаптивний імунітет, змінюючи співвідношення Th1 / Th2 і Treg / Th17 у кишково-асоційованій лимфоїдній тканині, рівень сигналізації через AhR рецептори і концентрацію Atg16 в клітинах.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати доповнили уявлення про функціональний стан та структуру лимфоїдної популяції кишково-асоційованої лимфоїдної тканини у щурів в нормі. Встановлені нові дані про патофізіологічні механізми участі компонентів імунної системи та факторів навколишнього середовища в патогенезі експериментального гострого та хронічного ілеїту і коліту у щурів, а також розширені уявлення про можливість корекції порушень при цій патології, симвастатином та антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1. Експериментально обґрунтована доцільність застосування симвастатина й APII-1 для розробки нових підходів патогенетичної корекції стану імунної системи у пацієнтів із запальними захворюваннями кишківника.

Запропоновано спосіб ідентифікації CD25⁺Foxp3⁺ регуляторних Т-клітин у гістологічних зрізах який дозволяє високоспецифічно диференціювати їх від інших клітин у гістологічних препаратах (Патент України на корисну модель №72775), а також новий спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин, що дозволяє підвищити ефективність специфічного виділення цільового продукту та знизити матеріальні затрати та час проведення дослідження (Патент України на корисну модель №102400).

Результати наукових досліджень, викладених у дисертації, були впроваджені в

навчальний процес кафедр патофізіології Харківського національного медичного університету, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», медичного інституту Сумського державного університету, кафедри нормальної фізіології Запорізького державного медичного університету та кафедри фізіології Запорізького національного університету що підтверджено відповідними актами впровадження.

Особистий внесок здобувача. Внесок здобувача полягає у проведенні патентно-інформаційного пошуку, аналізі літературних даних, виконанні експериментальної частини, морфометричного, імунофлюоресцентного і молекулярно-генетичного дослідження, статистичній обробці даних, написанні всіх розділів дисертації, формулюванні висновків. Вибір теми, формулювання мети та завдань наукового дослідження, розробка методичних підходів та вибір методів дослідження, аналіз і теоретичне узагальнення результатів, виконанні спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Апробація дисертаційної роботи відбулася 13 листопада 2015 р. на спільному засіданні кафедр анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії; патологічної фізіології; нормальної фізіології; гістології, цитології та ембріології; медбіології, паразитології та генетики; фармакології та медичної рецептури; мікробіології, вірусології та імунології.

Основні положення дисертації були представлені та обговоренні на всеукраїнських конференціях: «Фізіологія: від молекул до організму» (Київ, 2013); «Сучасні аспекти медицини і фармації — 2014» (Запоріжжя, 2014); «Сучасні аспекти медицини і фармації — 2015» (Запоріжжя, 2015); «Здобутки теоретичної медицини — в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2015); «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» (Запоріжжя, 2015); на міжнародних конференціях: «SCIENCE4HEALTH 2013. Клинические и теоретические аспекты современной медицины» (Москва, 2013); «Мікробіологія та імунологія — перспективи розвитку в XXI столітті» (Київ, 2014); 11th International conference on innate immunity (Olympia, Greece, 2014); «Объединенный конгресс ассоциации колопроктологов России и первого ESCP/ECCO регионального мастер-класса (Москва, 2015); «Актуальные проблемы патофизиологии — 2015» (Санкт-Петербург, 2015); 10th Congress of ECCO (Barcelona, Spain, 2015); TOLL 2015. Targeting Innate Immunity (Marbella, Spain, 2015); 4th European Congress of Immunology (Vienna, Austria, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 25 наукових праць, з них 13 статей (з яких 8 — у виданнях іноземних держав, які включені до міжнародних наукометричних баз, 5 статей у наукових фахових виданнях України), отримано 2 патенти на корисну модель, 10 — тези у матеріалах конгресів, з'їздів, симпозіумів та наукових конференцій (з них 1 тези в електронному науковому виданні).

Структура й обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, розділу огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів

власних досліджень, розділу аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків та списку використаних літературних джерел із 247 найменувань, з яких 7 написано кирилицею, 240 латиницею. Робота викладена на 262 сторінках, ілюстрована 41 рисунком, 24 таблицями, які займають 63 сторінки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведені на 200 щурах (самцях) лінії Wistar, масою 120-150 г. Щури перебували в умовах природного освітлення при вільному доступі до води та їжі. Об'єктом дослідження у експериментальних тварин були ділянки клубової кишки, проксимального і дистального відділу товстої кишки. Експериментальні тварини були розподілені на десять груп. Група 1 — контрольні тварини; група 2 — тварини з експериментальним гострим ілеїтом (ЕГІ); група 3 — тварини з експериментальним хронічним ілеїтом (ЕХІ); група 4 — тварини з експериментальним колітом (ЕК); група 5 — тварини з ЕГІ яким вводили симвастатин; група 6 — тварини з ЕХІ яким вводили симвастатин; група 7 — тварини з ЕК яким вводили симвастатин; група 8 — тварини з ЕГІ яким вводили антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1); група 9 — тварини з ЕХІ яким вводили АРІЛ-1; група 10 — тварини з ЕК яким вводили АРІЛ-1.

Для індукції ЕГІ та ЕХІ у щурів використовували індометацинову модель захворювання. Тварин виводили з експерименту при ЕГІ на 4 добу після останньої ін'єкції індометацину, при ЕХІ — на 13 добу. Для індукції ЕК у щурів використовували оксазолонову модель захворювання. Тварин виводили з експерименту на 6 добу після інтраректальної інстиляції оксазолону. Для фармакологічної корекції патології нами використовувались наступні препарати: симвастатин, який вводили внутрішньочеревно в дозі 20 мг / кг один раз на добу через 24 години після моделювання патології. При ЕГІ протягом 3 днів, при ЕХІ протягом 12 днів, при ЕК протягом 5 днів; АРІЛ-1, який вводили підшкірно в дозі 3 мг / кг один раз на добу через 24 години після моделювання патології. При ЕГІ протягом 3 днів, при ЕХІ протягом 12 днів, при ЕК протягом 5 днів.

Клінічні ознаки коліту оцінювали щоденно відповідно до модифікованої бальної системи з підрахуванням валідованого клінічного індексу активності захворювання (disease activity index — DAI). Для макроскопічної оцінки змін в кишківнику видаляли сегменти товстої та клубової кишки щурів, розрізали їх в поздовжньому напрямку, промивали в фізіологічному розчині та виставляли бали.

Для гістологічної оцінки уражень видаляли фрагменти тканини клубової кишки і дистального відділу товстої кишки довжиною 0,5 см від кожної тварини і після стандартної гістологічної обробки укладали в парапластові блоки. На ротаційному мікромомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) виготовляли серійні зрізи завтовшки 5 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином. Бальну оцінку гістологічних препаратів проводив «сліпий спостерігач» відповідно до гістологічної

системи балів. Перегляд і цифрове фотографування мікропрепаратів здійснювали за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (ZEISS, Німеччина), високочутливої камери Axio Cam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина).

Для ідентифікації TLR2 і TLR4 у гістологічних зрізах кишківника застосовували прямий імунофлюоресцентний метод з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флюоресцеїна ізотіоціанатом (FITC). Для ідентифікації NF- κ B, NOD2, RIGI, T-bet, GATA3, ROR γ t, Foxp3 AhR та Atg16 у гістологічних зрізах кишківника застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод з використанням відповідних моноклональних або поліклональних антитіл. Структуру популяції імунопозитивних клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів й даних їх морфометричних і денситометричних характеристик, за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Вивчали імунопозитивні клітини, розташовані в ізольованих лімфоїдних вузликах (ЛВ) і власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) клубової кишки щурів, а також у власній пластинці слизової оболонки (ВПСО) і підслизовій основі (ПО) товстої кишки щурів.

Для оцінки відносного рівня мРНК c-Rel субодиниці NF- κ B, рецептора коротколанцюгових жирних кислот FFAR2, NLRP3-інфламасоми, прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A а також аларміну HMGB1, використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР) з використанням ампліфікатора CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems з програмним забезпеченням CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Об'єктом дослідження у тварин були фрагменти клубової кишки та дистального відділу товстої кишки. Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (NIH, США) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина).

Одержані експериментальні дані обробляли на персональному комп'ютері пакетом прикладних і статистичних програм EXCEL 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, США), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США). При порівнянні даних використовували параметричний t-критерій Стьюдента та непараметричний U-критерій Манна-Уїтні, після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. При перевірці статистичних гіпотез нульову гіпотезу відкидали при $p < 0,05$. Вживаність тварин аналізували за допомогою тесту Каплана-Мейєра.

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті проведеного дослідження встановлено, що розвиток експериментальної патології у щурів супроводжувався значними змінами клінічних, макроскопічних та мікроскопічних ознак. При цьому, введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з експериментальною патологією справляло позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки ілеїту й коліту. За силою ефекту АРІЛ-1 чинив більш виражену дію.

При вивченні експресії мРНК IL-1 β , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 аналіз фрагментів клубової кишки щурів показав підвищенні рівні експресії прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A в зразках клубової кишки щурів з ЕГІ та ЕХІ (рис. 1А, 1В). Експресія IL-1 β підвищилась в 4,3 і 2 рази ($p < 0,05$) відповідно, IL-17A — в 6,5 і 56 разів ($p < 0,05$) в порівнянні з контролем. Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 4,3-кратне ($p < 0,05$) зростання транскрипційної активності мРНК гену *Nlrp3* в клубовій кишці тварин з ЕГІ та 8-кратне ($p < 0,05$) — в клубовій кишці тварин з ЕХІ (рис. 1С). Вивчення експресії c-Rel в зразках клубової кишки щурів з ЕГІ та ЕХІ засвідчило підвищення цього показника в 4,1 і 4,8 разів ($p < 0,05$) відповідно в порівнянні з контролем (рис. 1D). Рівень експресії FFAR2 також підвищився в 8 і 7 разів ($p < 0,05$) відповідно (рис. 1E). Також 16-кратне та 3-кратне ($p < 0,05$) зростання експресії HMGB1 було продемонстровано в клубовій кишці щурів з ЕГІ та ЕХІ (рис. 1F). Аналіз фрагментів дистального відділу товстої кишки щурів з ЕК показав збільшення рівня експресії прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A в 3,5 і 8 разів ($p < 0,05$) в порівнянні з контролем (рис. 2А, 1В). Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 71-кратне ($p < 0,05$) зростання транскрипційної активності мРНК гену *Nlrp3* (рис. 2С), та 2,8-кратне ($p < 0,05$) зменшення експресії c-Rel в дистальному відділі товстої кишки щурів з ЕК в порівнянні з контрольними щурами (рис. 2D). Рівень експресії FFAR2 також збільшився (в 1,4 рази ($p < 0,05$)) (рис. 2E). При цьому не змінився рівень експресії HMGB1 в зразках товстої кишки щурів з ЕК (рис. 2F). Отримані нами дані збігаються з дослідженнями М. Versudsky et al., які показали, що IL-1 β бере участь у

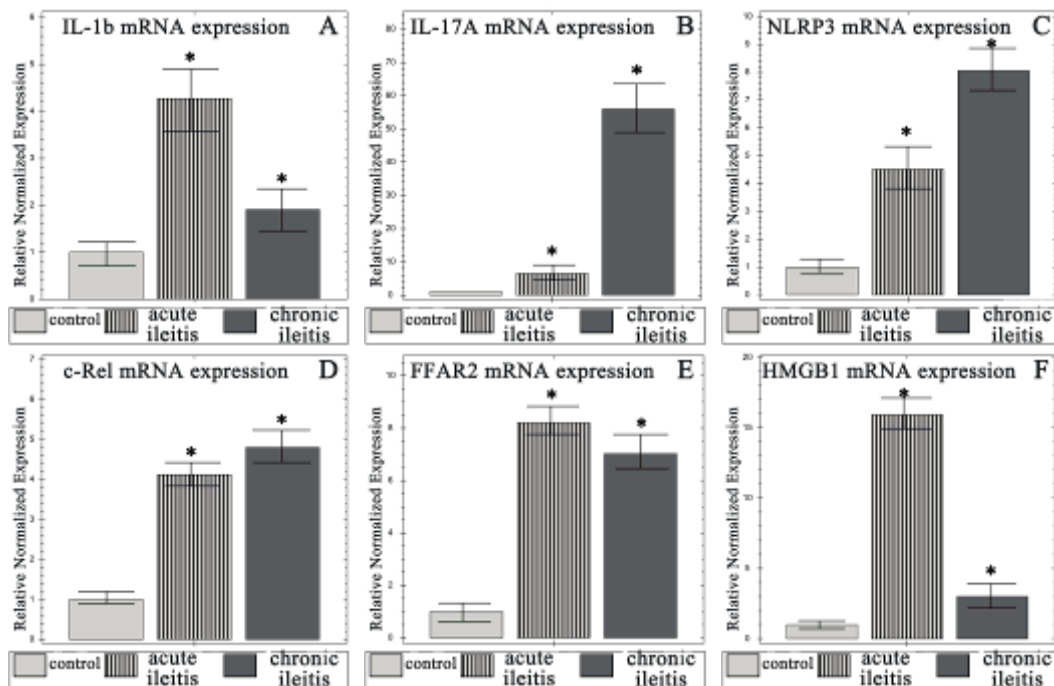


Рис. 1 (А-F). Відносний рівень експресії мРНК генів IL-1 β (А), IL-17А (В), NLRP3 (С), c-Rel (D), FFAR2 (E), HMGB1 (F) у клубовій кишці щурів з гострим та хронічним ілеїтом у порівнянні з контрольними щурами. В якості референс-гену був використаний ген GAPDH. * — $p < 0,05$.

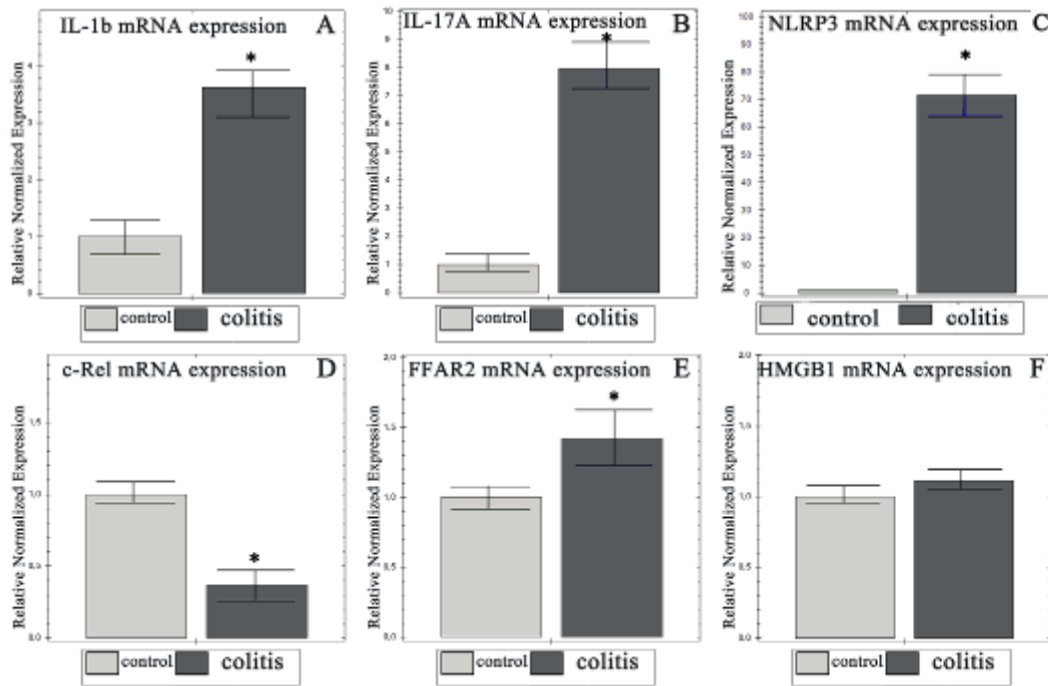


Рис. 2 (A-F). Відносний рівень експресії мРНК генів IL-1 β (A), IL-17A (B), NLRP3 (C), c-Rel (D), FFAR2 (E), HMGB1 (F) у зразках товстої кишки щурів з колітом у порівнянні з контрольними щурами. В якості референс-гену був використаний ген GAPDH. * — $p < 0,05$.

відновленні епітеліоцитів кишківника і епітеліального бар'єру при коліті [Bersudsky M. et al., 2014]. Деякі дослідження показують, що дефектні за NLRP3 інфламасомою миші захищені від розвитку коліта [Hirota S. A. et al., 2011]. Аномальна активація NF- κ B пов'язана з гострим і хронічним запаленням кишківника у щурів і відіграє ключову роль в регуляції генів цитокінів у пацієнтів з ЗЗК [Visekruna A. et al., 2015].

Нами були виявлені регіональні відмінності в розподілі популяції імунних клітин по всій довжині кишківника (від клубової кишки до дистального відділу товстої кишки) експериментальних тварин. Найбільша щільність TLR2⁺-лімфоцитів виявлена в проксимальному відділі товстої кишки, TLR4⁺-лімфоцитів — у клубовій кишці, NOD2⁺-лімфоцитів — у клубовій кишці і дистальному відділі товстої кишки, RIGI⁺-лімфоцитів — у дистальному відділі товстої кишки.

На сьогодні лише деякі дослідження описують регіональні зміни експресії PRR в різних відділах кишківника. Наші результати збігаються з даними отриманими С. F. Ortega-Cava et al. (2003) які показали, що TLR2 експресується на більш високому рівні епітеліоцитами в проксимальному відділі товстої кишки, ніж в дистальному. З іншого боку, вони показали, що TLR4 інтенсивніше експресується епітелієм товстої кишки, ніж тонкої, хоча наші результати описують протилежну ситуацію. Нарешті, NOD2 в основному експресується в клубовій кишці. Це узгоджується з асоціацією мутацій NOD2 з ХК [Barrett J. C. et al., 2008].

Ми встановили, що розвиток ЕГІ супроводжується вірогідною зміною

кількості імунопозитивних клітин: збільшенням TLR2⁺-лімфоцитів (на 19-92%), зменшенням TLR4⁺-лімфоцитів (на 45% - в 2 рази) і NF-κB⁺-лімфоцитів (на 25-26%). Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості TLR2⁺-лімфоцитів (на 45% - в 2 рази) і NOD2⁺-лімфоцитів (на 20%) на фоні зменшення TLR4⁺-лімфоцитів (в 2 рази) і RIGI⁺-клітин (на 18%) (рис. 3А, 4В). Ефекти від введення симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшилась кількість TLR2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів та збільшилась TLR4⁺- і NF-κB⁺ лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав зменшення NF-κB⁺ і NOD2⁺-лімфоцитів та збільшення TLR2⁺- і TLR4⁺-лімфоцитів. Ефекти від введення АРІЛ-1 теж залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшувалась кількість TLR2⁺-, NOD2⁺-, RIGI⁺-лімфоцитів та збільшувалась кількість TLR4⁺- і NF-κB⁺-лімфоцитів, введення АРІЛ-1 тваринам з ЕХІ викликало зменшення TLR2⁺-, NOD2⁺-, NF-κB⁺-лімфоцитів, та збільшення TLR4⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів. Розвиток ЕК супроводжується збільшенням TLR2⁺-лімфоцитів (на 40-88%), TLR4⁺-лімфоцитів (на 30-52%) і NF-κB⁺-лімфоцитів (на 23-33%) у дистальному відділі товстої кишки (рис. 3С), на відміну від проксимального відділу, де спостерігалось зменшення кількості всіх досліджуваних імунопозитивних клітин.

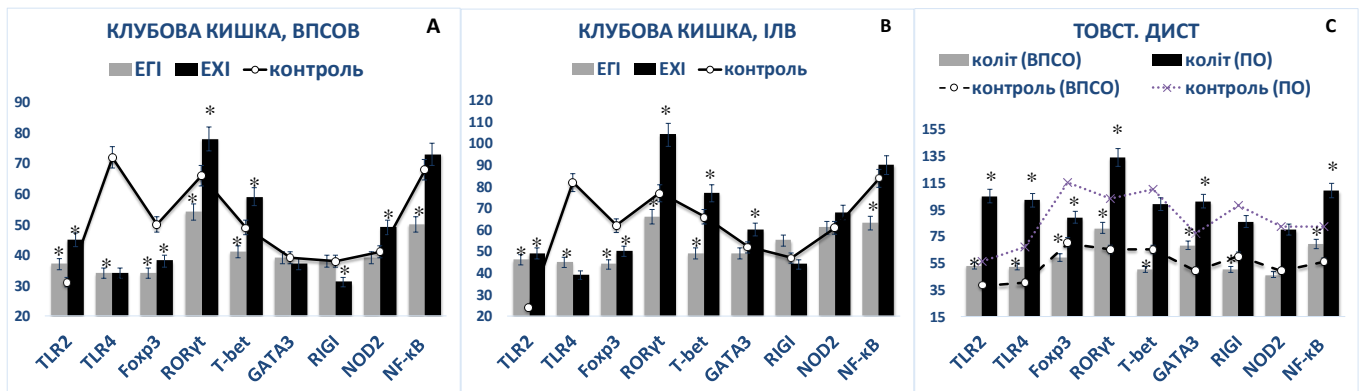


Рис. 3 (А-С). Сумарна щільність (на 1мм²) TLR2⁺-, TLR4⁺-, NF-κB⁺-, NOD2⁺-, RIGI⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, RORγt⁺-, Foxp3⁺-імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (КЛУБОВА КИШКА, ВПСОВ) та ізолюваних лімфоїдних вузликах (КЛУБОВА КИШКА, ІЛВ) клубової кишки при розвитку експериментального гострого (ЕГІ) та хронічного ілеїту (ЕХІ) (А, В); у власній пластинці слизової оболонки (ТОВСТ. ДИСТ, ВПСО) і підслизовій основі (ТОВСТ. ДИСТ, ПО) дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (С), *— p<0,05

Введення симвастатину і АРІЛ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості TLR2⁺-, TLR4⁺-, NOD2⁺-, RIGI⁺-імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки. Однак в проксимальному відділі збільшилась кількість NF-κB⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів. Також розвиток ЕГІ, ЕХІ та ЕК індукує зміну щільності цих PRR рецепторів і концентрації NF-κB в лімфоцитах, що свідчить про активацію вродженої ланки імунної системи. Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників, зокрема E. Cario (2008) встановила, що

TLR2 відіграють ключову роль у підтримці цілісності слизової оболонки в мишачій моделі пошкодження епітеліального бар'єру кишківника. Разом з тим є протилежні погляди на цю проблему. Так, А. М. Mowat (2010) показав, що нокаут за TLR2 не перешкоджає розвитку ЗЗК у експериментальних тварин. Відомо, що порушення експресії RIGI у мишей призводить до серйозних пошкоджень і запальної інфільтрації в слизовій оболонці кишки [Wang X. et al., 2000]. Крім того, зміна рівня експресії RLR може впливати на баланс субпопуляцій Т-хелперів, впливаючи на рівень утворення прозапальних Th17 і Th1-клітин [Negishi H. et al., 2012]. Наші результати про здатність симвастатину впливати на прозапальні сигнали в кишківнику опосередковано підтверджуються іншими авторами. Симвастатин інгібує гострі та хронічні запальні реакції холестерин-незалежним способом, перешкоджаючи ендотеліальній адгезії і міграції лейкоцитів у місцях запалення [Maher B. et al., 2009]. Введення симвастатину значно знижує активність DSS-індукованого коліту у мишей за оцінкою маси тіла, довжини ободової кишки і гістологічного бала в дозозалежній манері [Lee J. et al., 2007].

Що стосується розподілу різних субпопуляцій Т-хелперів, ми спостерігали поступове збільшення числа T-bet⁻, GATA3⁺, RORγt⁺, Foxp3⁺-лімфоцитів, від клубової кишки до дистальних відділів товстої кишки. Ми встановили що, розвиток ЕГІ супроводжується зменшенням кількості імунопозитивних клітин: T-bet⁻ (на 16-26%), RORγt⁺ (на 14-18%) і Foxp3⁺-лімфоцитів (на 29-32%). При цьому кількість GATA3⁺-лімфоцитів не змінювалась. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості T-bet⁻ (на 17-20%), GATA3⁻ (на 15%) і RORγt⁺-лімфоцитів (на 18-35%), а також зменшенням Foxp3⁺-лімфоцитів (на 19-24%) (див. рис. 3А, 4В). Ефекти від введень симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшилась кількість RORγt⁺-лімфоцитів та збільшилась GATA3⁻ і Foxp3⁺-лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав зменшення T-bet⁻ і RORγt⁺-лімфоцитів. Ефекти від введень АРІЛ-1 теж залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшувалась кількість T-bet⁻ і RORγt⁺-лімфоцитів та збільшувалась кількість GATA3⁻ і Foxp3⁺-лімфоцитів, введення АРІЛ-1 тваринам з ЕХІ викликало зменшення T-bet⁻ і RORγt⁺-лімфоцитів, та збільшення GATA3⁺-лімфоцитів.

Розвиток ЕК супроводжується збільшенням GATA3⁻ (на 31-39%) і RORγt⁺-лімфоцитів (на 25-30%) і зменшення T-bet⁻ (на 23%) і Foxp3⁺-лімфоцитів (на 16-23%) в дистальному відділі товстої кишки (рис. 3А, 4В), на відміну від проксимального відділу де спостерігалось зменшення практично всіх досліджуваних імунопозитивних клітин окрім RORγt⁺-лімфоцитів.

Введення симвастатину і АРІЛ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості всіх досліджуваних імунопозитивних клітин у дистальному відділі товстої кишки. Однак у проксимальному відділі збільшилась кількість T-bet⁻-лімфоцитів і не змінилась кількість GATA3⁺-лімфоцитів при введенні симвастатину, а також Foxp3⁺-лімфоцитів при введенні АРІЛ-1. Всі ці зміни

супроводжуються переважним зменшенням концентрації транскрипційних факторів T-bet і Foxp3 та збільшенням GATA3 і ROR γ t в імунопозитивних клітинах.

Як повідомляли T. L. Denning et al. (2011), існує зворотна кореляція між числом Th17 і Treg клітинами по всій довжині кишківника у мишей, число Th17 поступово зменшується від дванадцятипалої до товстої кишки, а число Treg максимальне в товстій кишці. У нашій роботі було показано наростання кількості T-хелперів від клубової кишки до дистального відділу товстої кишки. Участь різних субпопуляцій T-хелперів в імунопатогенезі ЗЗК було визначено і в інших дослідженнях [Neurath M.F. et al., 2002; Dambacher J. et al., 2009; Ohtani K. et al., 2010].

При вивченні експресії AhR і Atg16 у нормі та в експериментальних тварин ми встановили що, розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідною зміною кількості імунопозитивних клітин: збільшенням AhR⁺-лімфоцитів (на 25%) та зменшенням Atg16⁺-лімфоцитів (на 17%). Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості AhR⁺-лімфоцитів (на 50%), при цьому кількість Atg16⁺-лімфоцитів не змінилась. Ефекти від введення симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ не змінилась кількість AhR⁺- і Atg16⁺-лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав збільшення AhR⁺-лімфоцитів при не змінній кількості Atg16⁺-лімфоцитів. Ефекти від введення АРІІ-1 не залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ та ЕХІ зменшувалась кількість AhR⁺- і Atg16⁺-лімфоцитів. Розвиток ЕК не супроводжувався змінами досліджуваних імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки, на відміну від проксимального відділу, де спостерігалось збільшення Atg16⁺-лімфоцитів (на 30%). Введення симвастатину і АРІІ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості AhR⁺- і Atg16⁺-лімфоцитів в дистальному і проксимальному відділі товстої кишки. Однак в дистальному відділі при введенні симвастатину не змінилась кількість Atg16⁺-лімфоцитів. При розвитку цієї патології також підвищилась концентрація Atg16 в лімфоцитах, що свідчило проте, що фактори навколишнього середовища безпосередньо пов'язані з ЗЗК. Отримані нами дані частково збігаються з результатами інших дослідників. Зокрема T. Saitoh et al. (2008) продемонстрували, що миші позбавлені Atg16L1 в гемопоетичних клітинах дуже чутливі до DSS-індукованого коліта, який був послаблений шляхом ін'єкції анти-IL- β та IL-18 антитіл, що вказує на важливість Atg16L1 в пригніченні запалення кишківника.

Таким чином, у нашій роботі ми виявили цілий ряд патофізіологічних і функціональних змін в кишківнику щурів з експериментальними ілеїтом і колітом, які є експериментальним аналогом ЗЗК у людини. В цілому виявлені нами закономірності дозволяють виділити основні ключові ланки розвитку і прогресії ЗЗК які представлені на схемі (рис. 4).

1. Порушення з боку вродженої ланки імунної системи полягає у виявлених нами змінах розподілу TLR2⁺- та TLR4⁺-лімфоцитів та зміні експресії NOD- і RIG-подібних рецепторів. TLRs можуть індукуватися не тільки PAMP а і DAMP,

зміни рівня мРНК якого ми виявили. Під час дії клітинного стресу або пошкодження, HMGB1 може зв'язуватися з декількома PRR і сприяти запаленню [Xiaorong Z. et al., 2015]. Ми виявили зміни рівня експресії мРНК c-Rel субодиниці NF-κB і кількості NF-κB⁺-лімфоцитів в експерименті. NF-κB сприяє транскрипції IL-1β, синтез якого відбувається за безпосередньої участі інфламасоми і бере участь у запаленні. Збільшення рівня експресії мРНК NLRP3-інфламасоми та IL-1β у тварин з патологією, яке було нами продемонстровано, вказує на безпосереднє залучення їх в розвиток і підтримку ЗЗК. Активація вродженої ланки імунної системи в подальшому запускає набутий імунітет, що призводить до залучення різних субпопуляцій Т-хелперів в патологічний процес, яке проявляється змінами клітинного складу T-bet⁺ (Th1), GATA3⁺ (Th2), RORγt⁺ (Th17) і Foxp3⁺-клітин (Treg) в кишківнику. Важливе значення у розвитку ЗЗК відіграє співвідношення між числом Th17 і Treg-клітин. Treg клітини мають імуносупресивну активність і пригнічують ненормальну або гіперімунну відповідь, а Th17 є потужними прозапальними клітинами. Зменшення чисельності субпопуляції натуральних Treg-клітин призводить до розвитку аутоімунних захворювань [Walker L. S., 2009]. Тому ми вважаємо що порушення балансу Th17 / Treg та Th1 / Th2 безпосередньо сприяє розвитку ЗЗК.

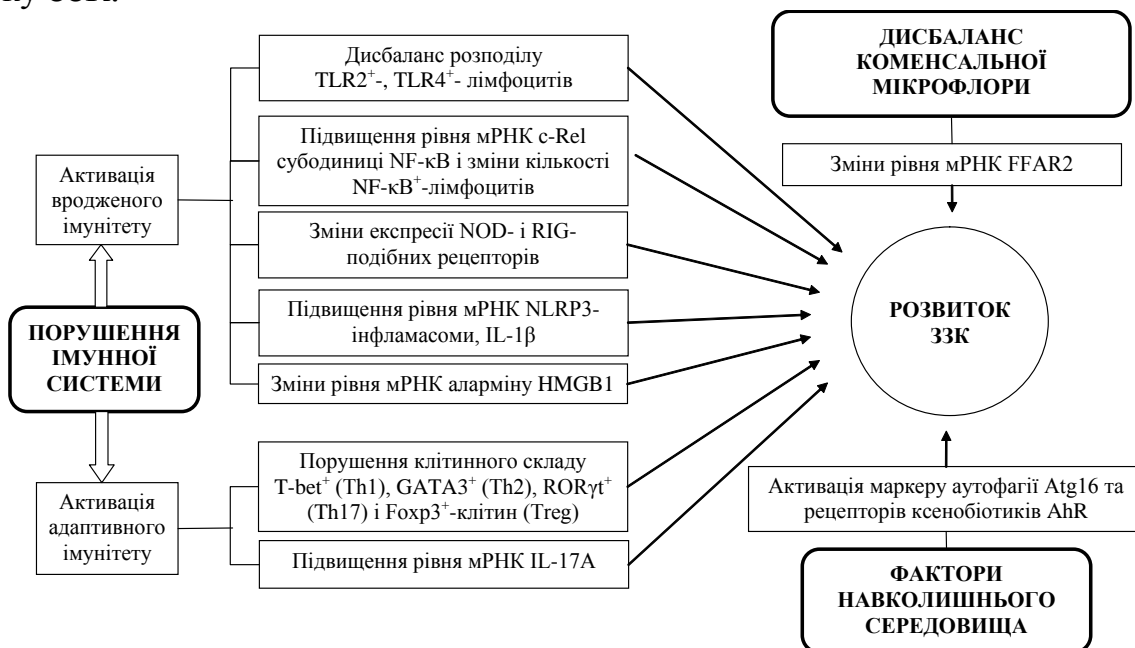


Рис. 4. Імунні механізми розвитку запальних захворювань кишківника.

2. Дисбаланс коменсальної мікрофлори, що змінює рівень лігандів для PRR може призводити до активації вродженого імунітету. Було показано, що рецептор коротколанцюгових жирних кислот — FFAR2 — впливає на диференціювання Т-клітин, особливо Treg [Smith P. M. et al., 2013]. Ми виявили зміни рівня мРНК FFAR2 в кишківнику експериментальних тварин і вважаємо, що зменшення числа Treg викликане змінами в складі кишкової мікрофлори і концентрації коротколанцюгових жирних кислот. Це може сприяти порушенню контролю за

ауто- і гіперімунними реакціями в кишківнику, приводячи в подальшому до ЗЗК.

3. Вплив факторів навколишнього середовища через AhR, які також регулюють диференціювання Т-хелперів. Наявність цього рецептора необхідна для створення певних популяцій імунних клітин в кишківнику [Veldhoen M. et al., 2008]. Зв'язок між апоптозом, стресом ендоплазматичного ретикулума і аутофагією включає кілька рівнів і ймовірно відрізняється між типами клітин. Ген *ATG16l1* кодує однойменний білок ATG16L1, який безпосередньо бере участь у процесі аутофагії. Таким чином, існує зв'язок між AhR, апоптозом, відповіддю на стрес ендоплазматичного ретикулума, аутофагією та ATG16L1, і виявлені нами зміни кількості AhR⁺- та Atg16⁺-лімфоцитів у тварин з ілеїтом та колітом яскраво нам це доводять.

ВИСНОВКИ

Запальні захворювання кишківника — важлива медична та економічна проблема, яка обумовлена зростанням захворюваності, важким безперервним перебігом, ускладненнями та економічними витратами на лікування. Роль вроджених та адаптивних компонентів кишково-асоційованої лімфоїдної тканини в механізмах розвитку експериментальних запальних захворювань кишківника вивчена недостатньо. Не встановлені закономірності змін клітинного складу Т-хелперів та лімфоцитів що несуть на своїй поверхні рецептори вродженого імунітету при цих же захворюваннях. Ціла низка невирішених питань потребують комплексного дослідження кишково-асоційованої лімфоїдної тканини за умов розвитку експериментальних запальних захворювань кишківника і в динаміці їх патогенетично-обґрунтованої корекції.

1. Розвиток експериментальної патології у щурів супроводжується вірогідним підвищенням рівня мРНК прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-17A (при гострому ілеїті в 4,3 і 6,5 разів; при хронічному ілеїті в 2 і 56 разів; при коліті в 3,5 і 8 разів), транскрипційною індукцією генів NLRP3-інфламасоми та рецептора коротколанцюгових жирних кислот FFAR2 (при гострому ілеїті в 4,3 і 8 разів; при хронічному ілеїті в 8 і 7 разів; при коліті в 71 і 1,4 рази); аларміну HMGB1 (при гострому ілеїті в 16 разів; при хронічному ілеїті в 3 рази) та c-Rel субодиниці NF- κ B (при гострому ілеїті в 4,1 разів; при хронічному ілеїті в 4,8 разів).

2. Розвиток експериментальних запальних захворювань кишківника індукує збільшення кількості TLR2⁺-, NOD2⁺- і NF- κ B⁺-клітин та зменшення кількості TLR4⁺- і RIGI⁺-клітин, а також зміну щільності цих паттерн-розпізнавальних рецепторів і концентрації NF- κ B в лімфоцитах, що свідчить про активацію вродженої ланки імунної системи.

3. Експериментальні ілеїт та коліт призводять до залучення адаптивної ланки імунної системи в розвиток патології, а саме вірогідне зменшення Th1 при гострому ілеїті на 16-26%; при коліті на 23-45% і збільшення Th2 при хронічному ілеїті на 15%; при коліті на 31-39%), а також активації прозапальної Th17-ланки і недостатності

імуносупресорної Т-регуляторної ланки імунітету (зменшення Treg при гострому ілеїті на 29-32%; при хронічному ілеїті на 19-24%; при коліті на 16-46% і збільшення Th17 при хронічному ілеїті на 18-35%; при коліті на 25-30%). Ці зміни супроводжуються переважним зменшенням концентрації транскрипційних факторів T-bet і Foxp3 та збільшенням GATA3 і ROR γ t в імунопозитивних клітинах.

4. В умовах розвитку патології у щурів вірогідно зростає кількість AhR⁺-лімфоцитів (при гострому ілеїті на 25%; при хронічному ілеїті на 50%) та щільність цих рецепторів, а також зменшується кількість Atg16⁺-лімфоцитів при гострому ілеїті на 17% і підвищується концентрація Atg16 в лімфоцитах, це свідчить що фактори навколишнього середовища безпосередньо пов'язані із запальними захворюваннями кишківника.

5. Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з експериментальною патологією справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки ілеїту й коліту. За силою ефекту АРІЛ-1 чинить більш виражену дію. При цьому введення симвастатина і АРІЛ-1 впливає на вроджений імунітет змінюючи кількість NOD2⁺- і RIGI⁺-лімфоцитів, баланс TLR2⁺ / TLR4⁺-клітин, щільність TLR2 і TLR4 рецепторів, кількість NF- κ B⁺-лімфоцитів і концентрацію NF- κ B в клітинах; впливає на активацію адаптивних компонентів кишково-асоційованої лимфоїдної тканини, змінюючи співвідношення Th1 / Th2 і Treg / Th17 в лимфоїдних структурах тонкої та товстої кишок і змінюючи рівень сигналізації через AhR рецептори і концентрацію Atg16 в клітинах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Жеребят'єв О. С. Вплив експериментального ілеїту на експресію TLR-2 лімфоцитами тонкої кишки / О. С. Жеребят'єв, О. М. Камишний // Запорожский медицинский журнал. — 2013. — №4. — С. 81–84. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки).*
2. Жеребят'єв О. С. Фармакологічна корекція ланок вродженого імунітету при гострому та хронічному ілеїті у щурів / О. С. Жеребят'єв, О. М. Камишний // Вісник проблем біології та медицини. — 2014. — №4. — С. 99–104. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки).*
3. Zhrebiatiev A. Simvastatin and Recombinant Antagonist of Receptors of Interleukin-1 Modulate Toll-like Receptors in Experimental Acute Pleitis in Rat / A. Zhrebiatiev, A. Kamyshnyi // Res. Mol. Med. — 2014. — №2 (3). — P. 11–16. *(внесок дисертанта — отримання експериментальних даних та їх статистична обробка).*
4. Жеребят'єв А. С. Роль транскрипционных факторов T-bet и GATA-3 в развитии острого илеита у крыс / А. С. Жеребят'єв, А. М. Камышный // Российский иммунологический журнал. — 2014. — № 3. — С. 314–316. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних, проведенні їх статистичної обробки та формулюванні висновків).*

5. Жеребятъев А. С. Влияние симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 на экспрессию TLR-2 лимфоцитами у крыс с экспериментальным оксазолоновым колитом / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // Современная медицина: актуальные вопросы: сб. ст. по материалам XXVIII междунар. науч.-практ. конф. — 2014. — №2 (28). — С. 127–137. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки)*.
6. 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. *(внесок дисертанта — отримання експериментальних даних та їх статистична обробка)*.
7. Zherebiatiev A. S. Expression of aryl hydrocarbon receptor and ATG16L1 protein in experimental oxazolone-induced colitis in rats / A. S. Zherebiatiev, A. M. Kamyshny // Фізіологічний журнал. — 2015. — № 5 (61). — С. 57–64. *(внесок дисертанта полягає у проведенні імунофлюоресцентного дослідження, обробки даних та підготовки матеріалу до друку)*.
8. Жеребятъев А.С. Региональные особенности распределения клеток врожденного и адаптивного иммунитета в различных отделах кишечника как определяющие факторы локализации патологического процесса / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2015. — № 2 (114). — С. 46–51. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки)*.
9. Жеребятъев А. С. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-лимфоцитов и паттернраспознающие рецепторы — экспрессия лимфоцитами кишечника при оксазолоновом колите у крыс и после введения ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А-редуктазы и антагониста рецепторов интерлейкина-1 / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // Иммунология. — 2015. — № 3 (36). — С. 139–144 *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки)*.
10. Жеребятъев А.С. Экспрессия паттерн-распознающих рецепторов и транскрипционных регуляторов дифференцировки Т-хелперов лимфоцитами кишечника при экспериментальном илеите и при введении симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный, В. А. Камышная // Медицинская иммунология. — 2015. — № 2. — С. 119–126. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки)*.
11. Жеребятъев О. С. Вплив симвастатину та антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на експресію аріл-гідрокарбонівих рецепторів (AHR) в умовах експериментального гострого ілеїту / О. С. Жеребятъев, О. М. Камишний // Гастроентерологія. — 2015. — №1 (55). — С. 42–45. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки)*.

12. Жеребятъев А. С. Влияние симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 на экспрессию образраспознающих рецепторов и транскрипционных регуляторов дифференцировки Т-хелперов лимфоцитами кишечника при экспериментальном оксазолониндуцированном колите у крыс / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2015. — № 3 (15). — С. 42-47. *(внесок дисертанта полягає у отриманні експериментальних даних та проведенні їх статистичної обробки).*
13. Zherebiatiev A. S. Expression levels of proinflammatory cytokines and NLRP3 inflammasome in an experimental model of oxazolone-induced colitis / A. S. Zherebiatiev, A. M. Kamyshnyi // Iran. J. Allergy Asthma Immunol. — 2016. — № 1 (15). P. 39–45. *(внесок дисертанта — отримання даних та проведення їх статистичної обробки).*
14. Пат. 72775 Україна (МПК G01N 21/00) Спосіб ідентифікації натуральних CD25⁺Foxp3⁺ регуляторних Т-клітин (nTreg) у гістологічних зрізах / Камишний О. М., Топол І. О., Деген А. С., Луц І. Ю., Прозорова Т. М., Жеребятъев О. С. (Україна). Заявлено — 29.02.12; Опубл. 27.08.12, Бюл. № 16 *(Внесок дисертанта — аналіз результатів дослідження).*
15. Пат. 102400 Україна (МПК G01N 21/00) Спосіб виділення РНК з фіксованих в рідині Буена та залитих в парафінові блоки зразків тканин / Камишний О. М., Жеребятъев О. С., Топол І. О., Деген А. С., Тарасевич Ю. В., Прозорова Т. М., Путілін Д. А., Камишна В. А. (Україна). Заявлено — 12.05.2015; Опубл. 26.10.15, Бюл. № 20 *(Внесок дисертанта — аналіз літератури та результатів дослідження).*
16. Жеребятъев А. С. Сравнительная характеристика экспрессии рецепторов врожденного иммунитета клетками иммунной системы в условиях развития экспериментального острого и хронического илеита / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // Фізіологія: від молекул до організму: матеріали ІІІ конф. молодих вчених. — Київ, 2013. — С. 12–13. *(Внесок дисертанта — проведення досліджень, статистична обробка матеріалу, написання тез).*
17. Жеребятъев А. С. Особенности экспрессии TLR-2 лимфоцитами тонкого кишечника при развитии хронического илеита / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // SCIENCE4HEALTH 2013. Клинические и теоретические аспекты современной медицины: материалы V междунар. науч. конф. — Москва, 2013. С. 80–81. *(Внесок дисертанта — проведення досліджень та статистична обробка матеріалу).*
18. Zherebiatiev A. S. Foxp3⁺ regulatory T cells in rats with experimental ileitis / A. S. Zherebiatiev, A. M. Kamyshnyi, V. K. Leshchynska // Сучасні аспекти медицини і фармації: тези всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з між нар. участю. — Запоріжжя, 2014. — С. 47. *(Внесок дисертанта — проведення досліджень, статистична обробка матеріалу, написання тез).*
19. Жеребятъев А. С. Особенности экспрессии транскрипционного фактора NF-κB и TLR-4 при экспериментальной патологии / А. С. Жеребятъев, О. А. Коновалова, А. М. Камышный // Імунологія та алергологія: наука і практика. — 2014. — №4 (додаток). —

С. 142–143. *(Дисертантом самостійно проведено збір первинного матеріалу).*

20. Zherebiatiev A. S. Effect of Simvastatin and recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 on expression of aryl hydrocarbon receptors in experimental colitis in rats / A. S. Zherebiatiev, A. M Kamyshnyi // Колопроктологія: матеріали междунар. об'єд. конгресса асоц. колопроктологів Росії і першого ESCP/ECCO регіонального мастер-класа. — Москва, 2015. — №1(51) (приложение). — С. 101. *(Дисертант брав участь у постановці експерименту, оформлював матеріал у вигляді тез).*

21. Zherebiatiev A. S. Regularities of expression of membrane-associated and cytoplasmic pattern recognition receptors, as well as transcriptional regulation of T-helper cells by lymphocytes in experimental ileitis and conduct of the simvastatin and aril-1 [Електронний ресурс] / A. S. Zherebiatiev, A. M Kamyshnyi // 10th Congress of ECCO, CCIB Barcelona. — 2015. — Режим доступу до ресурсу: https://www.ecco-ibd.eu/index.php/publications/congress-abstract-s/abstracts-2015/item/do_p073-regularities-of-expression-of-membrane-associated-and-cytoplasmic-pattern-recognition-receptors-as-well-as-transcriptional-regulation-of-t-helper-cells-by-lymphocytes-in-experimental-ileitis-and-conduct-of-the-simvastatin-and-aril-1.html. *(Дисертант брав участь у постановці експерименту, обробляв отримані дані, оформлював матеріал у вигляді тез).*

22. Zherebiatiev A. S. Free fatty acid receptor-2 activate to promote experimental acute and chronic ileitis in rats / A. S. Zherebiatiev, M. A. Spivak, A. M Kamyshnyi // Сучасні аспекти медицини і фармації: тези всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, присвячена дню науки. — Запоріжжя, 2015. — С. 51. *(Внесок дисертанта — проведення досліджень, написання тез).*

23. Жеребят'єв О.С. Закономірності експресії PRR і транскрипційних регуляторів диференціровки Т-хелперів лімфоцитами кишківника при експериментальному коліті у щурів і на фоні введення антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 / О. С Жеребят'єв, В. К. Лещинська // Здобутки теоретичної медицини — в практику охорони здоров'я: тези всеукраїнської наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів. — Запоріжжя, 2015. — С. 52–53. *(Внесок дисертанта — проведення досліджень, статистична обробка матеріалу, написання тез).*

24. Zherebiatiev A. S. Transcription factor c-rel plays a role in driving experimental acute and chronic ileitis in rats / A. S. Zherebiatiev, A. M Kamyshnyi // Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології: матеріали всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 50-річчю кафедри патологічної анатомії та кафедри патофізіології Запорізького державного медичного університету — Запоріжжя, 2015. — С. 51. *(Дисертантом представлені матеріали власного аналізу та узагальнення літературних даних).*

25. Zherebiatiev A. S. Indomethacin-induced ileitis in rats is mediated by the NLRP3 inflammasome / A. S. Zherebiatiev, A. M Kamyshnyi // 4th European Congress of Immunology. — Vienna, 2015. — P. 292. *(Внесок дисертанта — проведення збір первинного матеріалу, статистична обробка матеріалу, написання тез).*

АНОТАЦІЯ

Жеребятсьєв О.С. Імуноопосередковані механізми розвитку експериментальних запальних захворювань кишківника та можливості їх корекції. — На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04. — патологічна фізіологія. — Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2016.

Дисертація присвячена удосконаленню знання про закономірності та механізми змін функціонального стану кишково-асоційованої лімфоїдної тканини щурів за умов розвитку експериментального ілеїту та коліту і в динаміці їх патогенетично-обґрунтованої корекції симвастатином та антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 (APIL-1). Для цього використовувалися гістологічні, морфометричні, імунофлюоресцентні методи дослідження, метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу, комп'ютерний аналіз зображень, статистичні методи. У результаті роботи ми виявили і виділили основні ключові ланки розвитку і прогресії ЗЗК: порушення з боку вродженої ланки імунної системи, що полягає у змінах розподілу TLR2⁺, TLR4⁺ і NF-κB⁺-лімфоцитів, змінах експресії NOD- і RIG-подібних рецепторів, змінах рівня мРНК прозапальних цитокінів IL-1β і IL-17A, індукцією генів NLRP3-інфламасоми та рецептора коротколанцюгових жирних кислот FFAR2, аларміну HMGB1 та c-Rel субодиниці NF-κB. Порушення з боку адаптивної ланки імунної системи, а саме зсув співвідношення Th1 / Th2 і Treg / Th17. Залучення факторів навколишнього середовища, що підтверджується виявленими змінами кількості AhR⁺ та Atg16⁺-лімфоцитів а також концентрації Atg16 в лімфоцитах. Доведено що введення симвастатину й APIL-1 щурам з експериментальною патологією справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки ілеїту й коліту, впливає на ланки вродженого та адаптивного імунітету та змінює рівень сигналізації через AhR рецептори і концентрацію Atg16 в клітинах.

Ключові слова: тонка кишка, товста кишка, експериментальний ілеїт, експериментальний коліт, симвастатин, рекомбінантний антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (APIL-1).

АННОТАЦИЯ

Жеребятсьєв А.С. Иммуноопосредованные механизмы развития экспериментальных воспалительных заболеваний кишечника и возможности их коррекции. — На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04. — патологическая физиология. — Запорожский государственный медицинский университет МЗ Украины, Запорожье, 2016.

Диссертация посвящена совершенствованию знания о закономерностях и механизмах изменений функционального состояния кишечного-ассоциированной

лимфоидной ткани крыс в условиях развития экспериментального илеита и колита и в динамике их патогенетически-обоснованной коррекции симвастатином и антагонистом рецепторов интерлейкина-1 (АРИЛ-1). Исследования проведены на 200 крысах (самцах) линии Wistar, массой 120-150 г. Для индукции экспериментального острого и хронического илеита у крыс использовали индометациновую модель заболевания. Для индукции экспериментального колита у крыс использовали оксазолоновую модель заболевания. Для фармакологической коррекции патологии нами использовались симвастатин и АРИЛ-1. Для выполнения поставленных в диссертации задач использовались гистологические, морфометрические, иммунофлюоресцентные методы исследования, метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР), компьютерный анализ изображений и математический классификационный анализ, методы статистического анализа полученных результатов. Структуру и функциональное состояние лимфоидной популяции КАЛТ крыс изучали на основании анализа серийных гистологических срезов и данных гистологических характеристик при окраске гематоксилин-эозином, данных реакции прямой или непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных или поликлональных антител для идентификации TLR2⁺-, TLR4⁺-, NF-κB⁺-, NOD2⁺-, RIGI⁺-, T-bet⁺-, GATA3⁺-, RORγt⁺-, Foxp3⁺-, AhR⁺- и Atg16⁺-клеток. Оценка относительного уровня мРНК c-Rel, FFAR2, NLRP3, IL-1β, IL-17A и HMGB1 проводилась с помощью метода ОТ-ПЦР. В результате установлено, что развитие экспериментальной патологии у крыс сопровождается повышением уровня мРНК провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-17A, NLRP3-инфламмосомы, рецептора короткоцепочечных жирных кислот FFAR2 и алармина HMGB1. В отличие от экспериментального острого и хронического илеита и при которых уровень экспрессии мРНК c-Rel субъединицы NF-κB повысился, при развитии экспериментального колита он наоборот снизился. Впервые выяснены особенности экспрессии при ВЗК рецепторов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, NOD2 и RIGI клетками адаптивного звена — лимфоцитами. Доказано, что паттерн-распознающие рецепторы в условиях ВЗК индуцируются не только патоген-ассоциированными молекулярными образцами микроорганизмов, но и ассоциированными с повреждением молекулярными образцами, в частности HMGB1, изменение уровня мРНК которого мы обнаружили. Установлены изменения уровня экспрессии мРНК c-Rel субъединицы NF-κB и количества NF-κB⁺-лимфоцитов в эксперименте. Установлено вовлечение адаптивного звена иммунной системы в развитие патологии, а именно смещение соотношения Th1 / Th2 в сторону последних, а также смещение соотношения Treg / Th17 в сторону активации провоспалительного звена и недостаточности иммуносупрессорного звена иммунитета. Показано вовлечение факторов окружающей среды и кишечной микрофлоры в развитие экспериментальных ВЗК, а именно — в условиях развития патологии у крыс возрастает количество AhR⁺-лимфоцитов и уменьшается количество Atg16⁺-лимфоцитов. Доказано, что введение симвастатина и АРИЛ-1 крысам с экспериментальной патологией

оказывает положительное влияние на клинические и морфологические признаки илеита и колита; влияет на врожденный иммунитет, изменяя баланс TLR2⁺ / TLR4⁺-клеток и плотность TLR2 и TLR4, количество NF-κB⁺-лимфоцитов и концентрацию NF-κB в клетках, количество NOD2⁺- и RIGI⁺-лимфоцитов; влияет на адаптивный иммунитет, изменяя соотношение T-bet⁺ / GATA3⁺- и Foxp3⁺ / RORγt⁺-клеток в кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани, изменяет уровень сигнализации через AhR рецепторы и концентрацию Atg16 в клетках.

Таким образом, проведенные исследования позволили экспериментально обосновать целесообразность применения симвастатина и АРИЛ-1 для разработки новых подходов патогенетической коррекции состояния иммунной системы у пациентов с ВЗК.

Ключевые слова: тонкая кишка, толстая кишка, экспериментальный илеит, экспериментальный колит, симвастатин, рекомбинантный антагонист рецепторов интерлейкина-1 (АРИЛ-1).

SUMMARY

Zherebiatiev A. S. Immune-mediated mechanisms of inflammatory bowel disease and possibility of their correction. — As manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Medical Sciences, specialty 14.03.04. — pathological physiology. — Zaporozhye State Medical University Ministry of Healthcare of Ukraine, Zaporozhye, 2016.

The thesis is devoted to improving knowledge of the regularities and mechanisms of changes in the functional state of the gut-associated lymphoid tissue of rats with an experimental ileitis and colitis in the dynamics of their pathogenic grounded correction by simvastatin and recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 (ARIL-1). We used histological, morphometric, immunofluorescence methods, real-time reverse transcription polymerase chain reaction, computer image analysis, statistical methods. We found and identified the main key links in the development and progression of IBD, disorders of the innate immune system is to change the distribution of TLR2⁺-, TLR4⁺- and NF-κB⁺-lymphocytes, changes of expression NOD- and RIG-like receptors, changes in mRNA expression levels of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-17A, induction of gene expression of NLRP3 inflammasome and short-chain fatty acid receptors FFAR2, alarmin HMGB1 and c-Rel subunit of NF-κB. Disorders of the adaptive immune system, namely change of T-bet⁺ / GATA3⁺-cells and Foxp3⁺ / RORγt⁺-cells ratio. Influence of environmental factors, as evidenced by the change of amount of AhR⁺- and Atg16⁺-lymphocytes and concentration of the Atg16 in lymphocytes. In our study, we proved that the administration of simvastatin ARIL-1 to rats with experimental pathology has positive effect on clinical and morphological signs of ileitis and colitis, and also influence on innate and adaptive immunity, changes in signaling via the AhR receptors and concentration of the Atg16 in cells.

Key words: small intestine, colon, experimental ileitis, experimental colitis, simvastatin, recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 (ARIL-1).

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

APIL-1	– антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1
ВПСО	– власна пластинка слизової оболонки товстої кишки
ВПСОВ	– власна пластинка слизової оболонки ворсинок клубової кишки
ЕГІ	– експериментальний гострий ілеїт
ЕК	– експериментальний коліт
ЕХІ	– експериментальний хронічний ілеїт
ЗЗК	– запальні захворювання кишківника
ІІВ	– ізольовані лімфоїдні вузлики клубової кишки
ПО	– підслизова основа товстої кишки
AhR	– аріл-гідрокарбоніві рецептори
ATG16L1	– білок пов'язаний з аутофагією 16L1
FFAR2	– рецептор коротколанцюгових жирних кислот
Foxp3	– фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Treg
GATA3	– фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Т-хелперів 2 типу
HMGB1	– група білків з високою електрофоретичною рухливістю 1 (алармін)
NF-κB	– ядерний фактор κB
NLR	– NOD-like рецептори
NLRP3	– інфламасома
PRR	– паттерн-розпізнавальні рецептори
RORγt	– фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Т-хелперів 17 типу
T-bet	– фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Т-хелперів 1 типу
TLR	– Toll-like рецептори
c-Rel	– субодиниця NF-κB
Th1	– Т-хелпери 1 типу
Th2	– Т-хелпери 2 типу
Th17	– Т-хелпери 17 типу
Treg	– Т-регуляторні клітини

Підписано до друку 19.04.2016 р. Гарнітура Times New Roman.

Папір друкарський. Формат 60×90/16. Умовн. друк. арк. 0,9.

Обл.-вид. арк. 0,9. Друк — ризограф.

Наклад — 100 прим. Зам. № 6833.

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