

**ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ЛАНОК ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ ГО-  
СТРОМУ ТА ХРОНІЧНОМУ ІЛЕЇТІ У ЩУРІВ****Запорізький державний медичний університет (м. Запоріжжя)**

Дана робота є фрагментом НДР «Роль порушень взаємовідносин лімфоїдного та епітеліального компартментів імунної системи слизових оболонок в розвитку експериментальної патології», державний реєстраційний номер 0112U005642.

**Вступ.** Актуальність проблеми неспецифічних запальних захворювань кишківника (ЗЗК) обумовлена високим і зростаючим рівнем захворюваності, прогресуючим перебігом і маловивченим етіопатогенезом. Пік захворюваності припадає на 20-40 років, це найбільш працездатні члени суспільства [19].

Накопичено багато даних про те, що рецептори спадкового імунітету специфічно контролюють імунні процеси в організмі і можуть відігравати роль в розвитку ЗЗК. Основними з таких рецепторів, важливими для розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних образів (pathogen-associated molecular patterns-PAMP) мікроорганізмів та індукції генів адаптивної імунної відповіді – є Toll-подібні рецептори (Toll-like receptor – TLRs), які відносяться до образрозпізнаючих рецепторів – PRR (pattern-recognition receptors) [2]. В літературі є данні про те, що вже у 18 – 21-тижневих плодів людини виявляються TLR2 та TLR4 в нормі на базолатеральній поверхні кишкового епітелію ворсинок і на думку деяких авторів, зміна їх експресії може бути пов'язана з патогенезом ЗЗК [16]. В цілому, збудження TLR після розпізнавання PAMP призводить до каскадної активації у клітині MyD88 та фактора транскрипції NF-κB результатом чого є зміна експресії великої кількості генів прозапальних цитокінів, в перш за все TNFα, IL-6, та IL-1β, та активація адаптивного імунітету. Функціонально активний NF-κB в значній концентрації знайдено при ЗЗК в поліморфноядерних лейкоцитах, які секретують велику кількість запальних цитокінів [18]. Проте, даних за експресію TLR-2, TLR-4, та транскрипційного фактору NF-κB у лімфоцитах кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) при ЗЗК майже немає.

Не вирішеним є питання щодо якісної терапії ЗЗК основу яких складають 5-аміносалицілати, локальні та системні кортикостероїди, імуносупресори та інгібітори цитокінів. Мета базисної терапії – блокування основних ланок імунних і запальних реакцій. У

цьому аспекті викликає особливий інтерес використання для терапевтичної корекції таких препаратів як статини, імуномодельючі ефекти яких відкриті зовсім недавно. Симвастатин належить до класу препаратів котрі знижують рівень холестерину в крові за рахунок пригнічення 3-гідроксі-3-метіл-коензім А редуктази. Однак виявлені інші, холестерин-незалежні ефекти статинів. Статини пригнічують експресію MHC II ендотеліоцитами і макрофагами людини, викликають підвищення активності Th2-лімфоцитів, зменшують синтез цитокінів Th1-лімфоцитами здвигаючи Th1/Th2-баланс в бік останніх; пригнічують експресію молекул адгезії ендотеліоцитами і знижують інтенсивність трансендотеліальної міграції, пригнічують хемотаксис за рахунок зниження експресії рецепторів хемокинів на В- і Т-лімфоцитах і макрофагах, послаблюють TLR4-опосередковану NF-κB активацію в MyD88-залежному шляху [8].

Родина інтерлейкіну-1 складається з двох прозапальних цитокінів – IL-1α, IL-1β, які зв'язуються з двома IL-1 рецепторами (IL-1R1 і IL-1R2) і антагоніста IL-1R (IL-1ra). IL-1α та IL-1β важливі медіатори запальної реакції, вони беруть участь в різних клітинних процесах, включаючи проліферацію, диференціацію та апоптоз. Тому викликає інтерес застосування у терапії ЗЗК препаратів, мішенню яких є цитокіни, зокрема IL-1β. З цією метою ми застосували антагоніст рецепторів інтерлейкіна-1 (АІЛ-1).

**Мета дослідження.** Вивчення експресії TLR-2, TLR-4, NF-κB лімфоцитами тонкої кишки щурів в умовах розвитку експериментального гострого та хронічного індометацин-індукованого ілеїту, та при корекції його симвастатином та рекомбінантним антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1.

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведені на 70 самцях-щурах лінії Вістар вагою 110-160 грам. Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Тварини були розподілені на сім груп по 10 щурів: група 1 – контрольні тварини, група 2 – тварини з експериментальною патологією – гострим

індометацин-індукованим ілеїтом (ГІ), група 3 – тварини з експериментальною патологією – хронічним індометацин-індукованим ілеїтом (ХІ), група 4 – тварини з ГІ яким вводили симвастатин, група 5 – тварини з ХІ яким вводили симвастатин, група 6 – тварини з ГІ яким вводили АРІЛ-1 (виробництво ВАТ «РЭСБИО» м. Санкт-Петербург, Росія.), група 7 – тварини з ХІ яким вводили АРІЛ-1. ГІ індукували одноразовим підшкірним введенням 0,15% розчину індометацину (Sigma, США) в дозі 15 мг/кг, ХІ індукували двохразовим підшкірним введенням 0,15% розчину індометацину в дозі 10 мг/кг з інтервалом між ін'єкціями 24 години [13]. Симвастатин вводили внутрішньочеревно в дозі 20 мг/кг через 24 години після останньої ін'єкції індометацину (при ГІ на протязі 3 днів, та при ХІ на протязі 12 днів). АРІЛ-1 вводили підшкірно в дозі 3 мг/кг через 24 години після останньої ін'єкції індометацину (при ГІ на протязі 3 днів, та при ХІ на протязі 5 днів). Тварин виводили з експерименту декапітуванням під наркозом (групи 2, 4, 6 – на 4 добу; групи 3, 5, 7 – на 13 добу). Вилучали ділянки клубової кишки і на 20 годин занурювали в фіксатор Буена.

Структуру популяції TLR-2<sup>+</sup>, TLR-4<sup>+</sup>, та NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних та денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротаційному мікромомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, 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 гематоксилином-еозіном або інкубували з моноклональними антитілами (МКАТ) до TLR-2 та TLR-4 (NucultBiotech, Нідерланди) кон'югованими з флуоресцеїна ізотіоціанатом (FITC) на протязі 18 годин у вологій камері при T = 4°C. Для дослідження структури популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів зрізи інкубували з первинними кролячими моноклональними антитілами (МКАТ) до субодиниці p50 та її прекурсора p105 NF-κB щура (Santa Cruz Biotechnology, США) протягом 18 годин у вологій камері при T = 4°C. Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубували 60 хвилин (T = 37°C) з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика, кон'югованими з FITC. Після інкубації всі зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і розміщували в суміші гліцерину і фосфатного буфера (1:9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Зображення, що отримується на мікроскопі Primo Star (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) за допомогою 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) негайно вводили в комп'ютер. При цьому в автоматичному режимі визначалися області зі статистично значущою флуоресценцією,

характерною для лімфоїдних клітин експресуючих рецептори. Обчислювалися морфометричні і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин. При фарбуванні МКАТ досліджували TLR-2<sup>+</sup>, TLR-4<sup>+</sup>, NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцити, розташовані у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) і в ізольованих лімфоїдних вузликах (ІЛВ) клубової кишки.

Всі одержані експериментальні дані обробляли на персональному комп'ютері пакетом прикладних і статистичних програм EXCEL з пакету MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6. 0 (Stat-Soft, 2001). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Для виявлення вірогідності різниць результатів досліджень в дослідних і контрольних групах тварин визначали коефіцієнт Стюдента (t), після чого визначали можливість різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез приймали рівним 0,05.

### Результати досліджень та їх обговорення.

Розвиток ГІ та ХІ у тварин супроводжувався макроскопічними змінами в тонкому кишківнику, а саме наявністю вираженого набряку, гіперемії, множинних ерозій і виразок. При гістологічному дослідженні тканин забарвлених гематоксилином-еозіном ми спостерігали ознаки запалення з пошкодженням епітеліального бар'єру, дефектами ворсинок і сильною інфільтрацією власної пластинки слизової оболонки нейтрофілами, макрофагами і лімфоцитами.

Аналіз серійних зрізів клубової кишки щурів лінії Wistar показав, що розвиток як ГІ, так і ХІ супроводжується односпрямованим збільшенням у досліджуваних зонах клубової кишки сумарної щільності популяції TLR-2<sup>+</sup> лімфоцитів (у ВПСОВ при ГІ на 19%, при ХІ на 45%; в ІЛВ при ГІ на 92%, при ХІ в 2 рази, p < 0,05) (**рис. 1А**), зменшенням TLR-4<sup>+</sup> лімфоцитів (у ВПСОВ при ГІ в 2 рази, при ХІ в 2 рази; в ІЛВ при ГІ на 45%, при ХІ в 2 рази, p < 0,05) (**рис. 1В**), а кількість NF-κB<sup>+</sup> лімфоцитів зменшилась тільки при ГІ (у ВПСОВ на 26%, в ІЛВ на 25%, p < 0,05) і не змінилась при ХІ у порівнянні з контролем (**рис. 1С**). При цьому щільність TLR-2 на імунопозитивних лімфоцитах зростала в обох досліджуваних морфофункціональних зонах КАЛТ незалежно від тривалості патологічного процесу, концентрація білка NF-κB зростала тільки при ХІ, а щільність TLR-4 зростала у ВПСОВ тільки при ГІ.

Ефекти від введення симвастатину на TLR-2-експресуючі клітини залежали від тривалості перебігу експериментальної патології: в умовах ГІ їх кількість знижувалась (у ВПСОВ на 11%, в ІЛВ на 26%, p < 0,05), а в умовах ХІ навпаки збільшувалась (у ВПСОВ на 24%, в ІЛВ на 69%, p < 0,05) (**рис. 1Д**). Сумарна щільність TLR-4<sup>+</sup> лімфоцитів збільшувалась тільки в ІЛВ як при ГІ (на 20%, p < 0,05) так і при ХІ (на 31%, p < 0,05) (**рис. 1Е**). Кількість NF-κB<sup>+</sup> лімфоцитів зростала при ГІ (в ВПСОВ на 24%, в ІЛВ на 17%, p < 0,05) і зменшувалась при ХІ (в ВПСОВ на 41%, в ІЛВ на 33%, p < 0,05) (**рис. 1F**). Введення симвастатину при ГІ призвело до збільшення концентрації

NF-κB в лімфоцитах ІЛВ і до зменшення щільності TLR-2 та TLR-4 в обох морфофункціональних зонах, тоді як в умовах XI спостерігалось переважно зменшення щільності TLR-2, TLR-4 і концентрації NF-κB в лімфоцитах КАЛТ.

Введення АРІЛ-1 експериментальним тваринам супроводжувалось різноспрямованими ефектами на сумарну щільність популяції TLR-2<sup>+</sup> лімфоцитів при ГІ: АРІЛ-1 викликав їх збільшення в ІЛВ (на 35%,  $p < 0,05$ ) та зменшення в ВПСОВ (на 24%,  $p < 0,05$ ), при XI зменшення тільки в ІЛВ (на 22%,  $p < 0,05$ ) (рис. 1Г). На TLR-4 імунопозитивні клітини АРІЛ-1 чинив односпрямований ефект: призвів до збільшення цих клітин в обох морфофункціональних зонах як при ГІ (в ВПСОВ на 21%, в ІЛВ на 24%,  $p < 0,05$ ) так і при XI (в ВПСОВ на 24%, в ІЛВ на 98%,  $p < 0,05$ ) (рис. 1Н). Сумарна щільність популяції NF-κB<sup>+</sup> лімфоцитів під впливом АРІЛ-1 збільшувалась при ГІ (в ВПСОВ на 18%, в ІЛВ на 35%,

$p < 0,05$ ) і зменшувалась при XI (в ВПСОВ на 44%, в ІЛВ на 29%,  $p < 0,05$ ) (рис. 1І). Введення АРІЛ-1 при ГІ супроводжувались збільшенням щільності TLR-2, зменшенням TLR-4 та концентрації NF-κB у лімфоцитах ВПСОВ, ці ж показники в ІЛВ тільки зменшувались. При XI введення АРІЛ-1 також призводило до переважного зниження щільності TLR-2, TLR-4 та концентрації NF-κB в клітинах КАЛТ.

TLRs відіграють важливу роль у вродженому імунитеті і в ініціації адаптивної імунної відповіді. Бактеріальні продукти, такі як ліпополісахарид (ЛПС) і пептидоглікан знаходяться у високій концентрації в кишківнику і здатні, здійснюючи передачу сигналу через TLR-2 і TLR-4, активувати NF-κB, який регулює транскрипцію прозапальних молекул (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, IL-12, iNOS, ICAM-1, VCAM-1), що беруть участь у гострому і хронічному запаленні кишківника [3]. Mokuino Y. et al. показали, що ліпополісахарид через TLR-4 може індукувати проліферацію

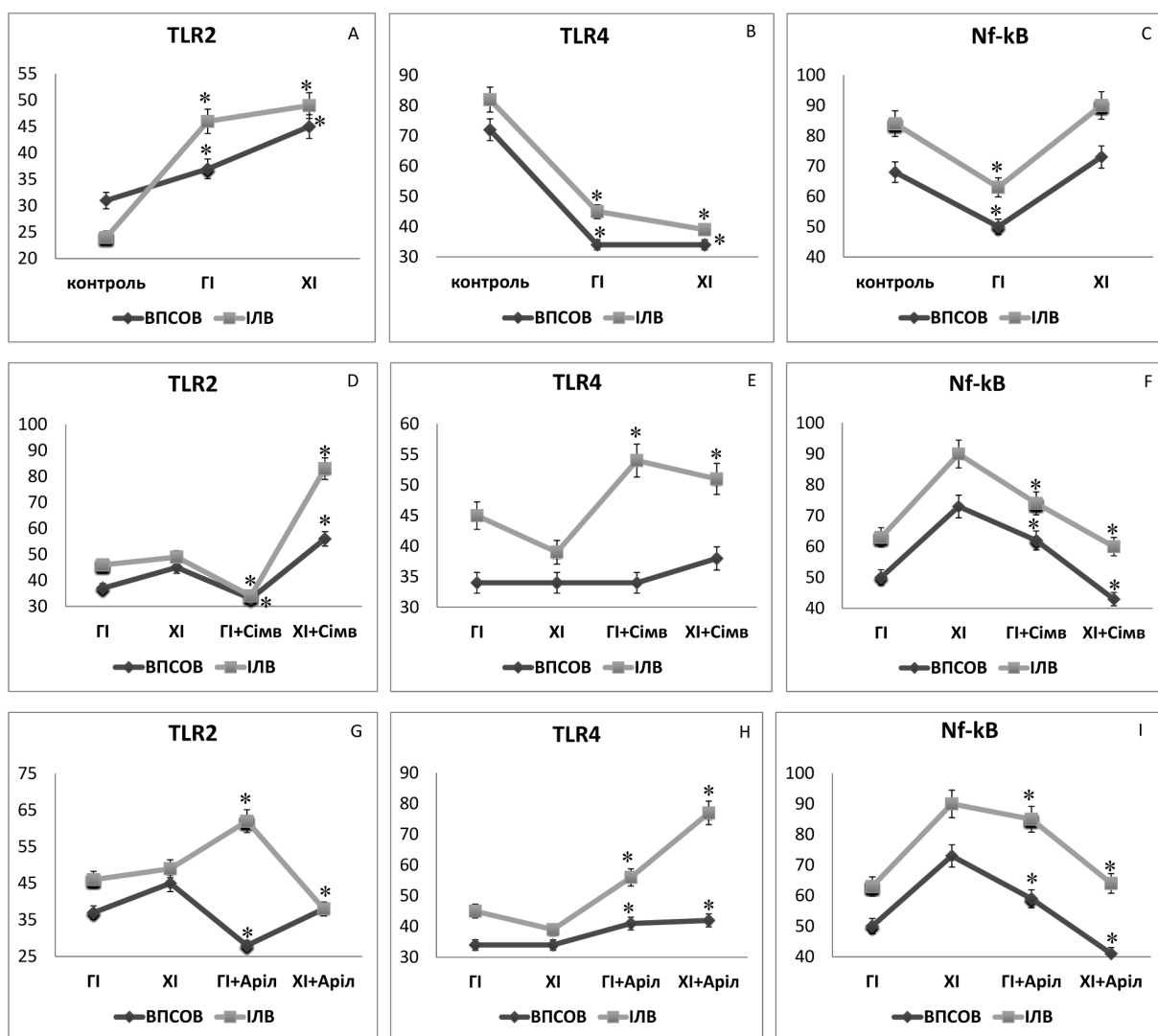


Рис. 1. Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup> та NF-κB<sup>+</sup> – клітин у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки при розвитку гострого (ГІ) та хронічного ілеїту (ХІ) (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) і арілу (G, H, I) експериментальним тваринам, \* –  $p < 0,05$ .

та секрецію  $\gamma\delta$  Т-клітинами  $IFN\gamma$  незалежним від Т-клітинного рецептора способом [12].

TLRs важливі для функціонування адаптивного імунітету. Один класичний приклад – TLR-залежна регуляція розвитку, експансії, і продукції антитіл В-лімфоцитами. TLRs також впливають на активність Т-лімфоцитів які експресують ці рецептори. Наївні  $CD4^+$  та  $CD8^+$  Т-клітини експресують TLR-2 та TLR-4. Активація TLR-2 на  $CD4^+$  лімфоцитах може стимулювати фенотип подібний Th1. В доповнення до впливу на функцію Th1, передача сигналів через TLR-2 впливає на розвиток та функцію Th17 [6]. Takano M. et al. продемонстрували активацію TLRs в  $\gamma\delta$  Т-клітинах [20]. TLR модулюють супресорну активність  $CD4^+CD25^+$  регуляторних Т-клітин. Що стосується антигенпрезентуючих клітин, такі як дендритні клітини, стимуляція TLRs збільшує презентацію антигенів, експресію костимулюючих молекул і Т-клітинну поляризацію цитокінів, які сприяють диференціюванню наївних Т-клітин у різні типи Т-хелперів, зокрема Th-17, які причетні до розвитку різних аутоімунних захворювань людини, в ініціації яких важливу роль грає співвідношення Th17/Treg [7]. Gonzalez-Navajas J. M. et al показали що делеція TLR-4 в  $CD4^+$  Т клітинах призвела до збільшення продукції  $IFN\gamma$  та важкого коліту у мишей [4]. Активація та підвищення рівня NF- $\kappa$ B було зареєстровано в кишківнику пацієнтів з ЗЗК, кількість якого корелює зі ступенем запалення слизової оболонки останнього [17], а також у гризунів з експериментальним колітом [14]. Таким чином, індуктори та продукти NF- $\kappa$ B активації мають безпосереднє відношення до запальних захворювань кишківника.

Lee J. Y. et al. продемонстрував що симвастатин пригнічує експресію прозапальних генів, блокуючи передачу сигналів через NF- $\kappa$ B і послаблює DSS-індукований гострий коліт у мишей [9]. Деякі автори показали, що статини сприяють зменшенню запалення при експериментальній патології як у тварин

[10], так у пацієнтів з хворобою Крона [5]. Баланс IL-1 та IL-1ra грає важливу роль в регуляції запалення та імунної відповіді. Maeda S. et al. вказали на дисбаланс між IL-1 $\beta$  і IL-1ra який може відігравати роль у патогенезі ЗЗК [11]. IL-1ra показав ефективність протизапальної терапії при деяких хронічних запальних захворюваннях [15], а людський рекомбінантний IL-1ra (Anakinra) був схвалений у США для лікування ревматоїдного артриту [21], проте висока ціна обмежує його широке застосування, та спонукає до пошуку і вивчення більш дешевих аналогів. Наші співвітчизники показали високу проти-запальну та антиальтеративну активність препарату АРІЛ-1 при експериментальному ішемічному інсульті та фригопротекторну дію при гострій холодовій травмі у щурів [1].

### Висновки.

1. Розвиток ілеїту односпрямовано збільшує у КАЛТ кількість TLR-2 $^+$  лімфоцитів, зменшує чисельність TLR-4 $^-$  і NF- $\kappa$ B $^-$  клітин, призводить до переважного зростання щільності PRR та концентрації NF- $\kappa$ B у лімфоцитах, найбільш виразного для TLR-2.

2. Ефекти введення симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ГІ зменшувалась кількість TLR-2 $^-$  та зростала TLR-4 $^-$  і NF- $\kappa$ B $^+$  лімфоцитів, при ХІ симвастатин викликав збільшення TLR-2 $^-$ , TLR-4 $^+$  та зменшення NF- $\kappa$ B $^+$  лімфоцитів, знижуючи при цьому щільність TLR-2, TLR-4 і концентрацію NF- $\kappa$ B в лімфоцитах КАЛТ.

3. Введення АРІЛ-1 збільшували кількість TLR-4 $^-$ лімфоцитів, різноспрямовано змінювали чисельність TLR-2 $^-$  та NF- $\kappa$ B $^+$  лімфоцитів, знижали щільність на них рецепторів вродженого імунітету.

**Перспективи подальших досліджень.** Спираючись на проведені нами дослідження вважаємо доцільним і перспективним вивчення інтенсивності експресії PRR при експериментальному коліті у щурів.

### Література

1. Супрун Е. В. Експериментальне вивчення особливостей антиальтеративної активності АРІЛ-1 / Е. В. Супрун, С. М. Дроговоз, Є. М. Коваленко // Ліки. – 2005. – № 3-4. – С. 43-47.
2. Хаитов Р. М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р. М. Хаитов, М. В. Пашенков, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66-76.
3. Barnes P. J. Nuclear factor- $\kappa$ B, a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases / P. J. Barnes, M. Karin // N. Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 336. – P. 1066-1071.
4. Gonzalez-Navajas J. M. TLR4 signaling in effector  $CD4^+$  T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice / J. M. Gonzalez-Navajas, S. Fine, J. Law [et al.] // J. Clin. Invest. – 2010. – Vol. 120. – P. 570-581.
5. Grip O. Atorvastatin reduces plasma levels of chemokine (CXCL10) in patients with Crohn's disease / O. Grip, S. Janciauskiene // PLoS One. – 2009. – Vol. 4(5). – P. 5263.
6. Harrington L. E. Interleukin 17-producing  $CD4^+$  effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages / L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan [et al.] // Nat. Immunol. – 2005. – Vol. 6. – P. 1123-1132.
7. Mai J. Th 17 cells interplay with Foxp3 $^+$  Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity / J. Mai, H. Wang, X. F. Yang // Front. Biosci. – 2010. – Vol. 15. – P. 986-1006.
8. Chansrichavala P. Atorvastatin attenuates TLR4-mediated NF- $\kappa$ B activation in a MyD88-dependent pathway / P. Chansrichavala, U. Chantharakri, P. Sritara [et al.] // Asian Pac. J. Allergy Immunol. – 2009. – Vol. 27(1). – P. 49-57.
9. Lee J. Y. Simvastatin inhibits NF- $\kappa$ B signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates acute murine colitis / J. Y. Lee, J. S. Kim, J. M. Kim [et al.] // Ist. Immunopharmacol. – 2007. – Vol. 7(2). – P. 241-248.
10. Leung B. P. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis / B. P. Leung, N. Sattar, A. Crilly [et al.] // J. Immunol. – 2003. – Vol. 170(3). – P. 1524-1530.
11. Maeda S. Mucosal imbalance of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in canine inflammatory bowel disease / S. Maeda, K. Ohno, K. Nakamura [et al.] // Vet. J. – 2012. – Vol. 194(1). – P. 66-70.

12. Mokuno Y. Expression of toll-like receptor 2 on gamma delta T cells bearing invariant V gamma 6/V delta 1 induced by Escherichia coli infection in mice / Y. Mokuno, T. Matsuguchi, M. Takano [et al.] // J. Immunol. – 2000. – Vol. 165(2). – P. 931-940.
13. Nandi J. TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis / J. Nandi, B. Saud, J. Zinkievich [et al.] // Mol. Cell. Biochem. – 2010. – Vol. 336(1-2). – P. 17-24.
14. Neurath M. Local administration of antisense phosphothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kB abrogates established experimental colitis in mice / M. F. Neurath, S. Pettersson, K. H. Meyer zum Buschenfelde [et al.] // Nat. Med. – 1996. – Vol. 2(9). – P. 998-1004.
15. Neven B. Long-term efficacy of the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in ten patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease/chronic infantile neurologic, cutaneous, articular syndrome / I. Marvillet, C. Terrada, A. Ferster [et al.] // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62(1). – P. 258-267.
16. Robert D. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: Toll-like receptors on fetal enterocyt / R. D. Fusunyan, N. N. Nanthakumar, M. E. Baldeon [et al.] // Pediatr. Res. – 2001. – Vol. 49(4). – P. 589-593.
17. Rogler G. Nuclear factor kappa B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa / G. Rogler, K. Brand, D. Vogl [et al.] // Gastroenterology. – 1998. – Vol. 115(2). – P. 357-369.
18. Shih D. Q. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease / D. Q. Shih, S. R. Targan // World J. Gastroenterol. – 2008. – Vol. 14. – P. 390-400.
19. Stange E. F. European evidence based consensus on the diagnostic and management of Crohn's disease: definitions and diagnostic / E. F. Stange, S. P. L. Travis, S. Vermeire [et al.] // Gut. – 2006. – Vol. 55 (Suppl. 1). – P. 115.
20. Takano M. Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in Escherichia coli infection in mice / M. Takano, H. Nishimura, Y. Kimura [et al.] // Infect. Immun. – 1998. – Vol. 66(7). – P. 3270-3278.
21. Thompson R. C. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) as a probe and as a treatment for IL-1 mediated disease / R. C. Thompson, D. J. Dripps, S. P. Eisenberg // Int. J. Immunopharmacol. – 1992. – Vol. 14(3). – P. 475-480.

УДК 612. 017. 11:616. 344-002-036. 1]-085. 015. 4-092. 9

### **ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ЛАНОК ВРОДЖЕНОГО ІМУНІТЕТУ ПРИ ГОСТРОМУ ТА ХРОНІЧНОМУ ІЛЕЇТІ У ЩУРІВ**

**Жеребятъев О. С., Kamiшний О. М.**

**Резюме.** В експерименті досліджувалась можливість фармакологічної корекції гострого та хронічного ілеїту у щурів симвастатином та рекомбінантним антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 з акцентом на вивчення інтенсивності експресії TLR-2, TLR-4, білка NF-kB та щільності їх в лімфоцитах тонкої кишки. Для визначення імунопозитивних клітин було застосовано метод прямої та непрямой імунофлюоресценції з використанням моноклональних антитіл. Ми встановили, що введення препаратів при розвитку експериментальної патології супроводжувалося зміною експресії вищевказаних рецепторів.

**Ключові слова:** тонка кишка, ілеїт, TLR-2, TLR-4, NF-kB, симвастатин, рекомбінантний антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРИЛ-1).

УДК 612. 017. 11:616. 344-002-036. 1]-085. 015. 4-092. 9

### **ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЗВЕНЬЕВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ИЛЕИТЕ У КРЫС**

**Жеребятъев А. С., Камышный А. М.**

**Резюме.** В эксперименте исследовалась возможность фармакологической коррекции острого и хронического илеита у крыс симвастатином и рекомбинантным антагонистом рецепторов интерлейкина-1, с акцентом на изучение интенсивности экспрессии TLR-2, TLR-4, белка NF-kB и плотности их в лимфоцитах тонкой кишки. Для определения иммунопозитивных клеток был применен метод прямой и непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител. Мы установили, что введение препаратов при развитии экспериментальной патологии сопровождалось изменением экспрессии вышеуказанных рецепторов.

**Ключевые слова:** тонкая кишка, илеит, TLR-2, TLR-4, NF-kB, симвастатин, рекомбинантний антагоніст рецепторів інтерлейкіна-1 (АРИЛ-1).

UDC 612. 017. 11:616. 344-002-036. 1]-085. 015. 4-092. 9

### **Pharmacological Correction of the Innate Immunity Links in Rats with Acute and Chronic Ileitis**

**Zherebiatiev A. S., Kamyshnyi A. M.**

**Abstract.** Inflammatory bowel diseases (IBD) such as ulcerative colitis and Crohn's disease are chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, and are associated with substantial morbidity including frequent hospitalization and surgery, reductions in quality of life and increased mortality. The pathogenesis of IBD is complex and multifactorial. Statin drugs are widely used worldwide for treatment of hyperlipidemia in addition to cholesterol-lowering effect, statins reduce many of the mediators involved in IBD-specific inflammation including C-reactive protein, interferon gamma, interleukins 6 and 8, and NF-kappa B.

*The aim of research.* The aim of this study was to investigate the possibility of simvastatin and recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 for pharmacological correction of acute and chronic ileitis in rats with a focus on the expression intensity studies of TLR-2 TLR-4, NF- $\kappa$ B protein with lymphocytes of small intestine.

*Materials and methods.* Male Wistar rats were housed in standard wire-mesh bottom cages at constant temperature of 25°C. The rats were given water and standard laboratory diet ad libitum with no restriction prior to indomethacin injection. For induction of an ileitis, rats received subcutaneous dose of indomethacin. For histological examination, sections were stained with haematoxylin and eosin. The immunopositive cells was determined using a direct and indirect immunofluorescence technique with using a monoclonal antibody. Images were taken by using a fluorescence microscope PrimoStar (ZEISS, Germany) with a computer-assisted video system AxioCam 5c (ZEISS, Germany) including the NIH-Image software (NIH Image version 1.46). All statistical analyses were performed using EXCEL MS Office 2010 (Microsoft Corp., USA), STATISTICA 6. 0 (Stat-Soft, 2001) software. Results are expressed as mean values  $\pm$  SEM. Differences were considered statistically significant if the p value was  $< 0.05$ .

*Results.* It has been established that acute and chronic ileitis development was accompanied with the increase in quantity of TLR-2<sup>+</sup> cells and with decrease in quantity of TLR-4<sup>+</sup> i NF- $\kappa$ B<sup>+</sup> lymphocyte in lymphoid structures of ileum. Simvastatin and recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 administration to experimental animal resulted in multidirection action on the expression of receptors with lymphocytes of small intestine.

*Conclusions.* We established that drug administration during the development of experimental pathology was accompanied by changes in the expression of TLR-2, TLR-4 and NF- $\kappa$ B protein.

**Key words:** small intestine, ileitis, TLR-2, TLR-4, NF- $\kappa$ B, simvastatin, recombinant antagonist of receptors of interleukin-1 (ARIL-1).

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.*

*Стаття надійшла 3. 12. 2013 р.*