

Міністерство охорони здоров'я України  
Запорізький державний медичний університет

На правах рукопису

ЖЕРЕБЯТЬЄВ ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ

УДК: 616.34-002-036-08-097-092.9

ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ  
КИШКІВНИКА ТА МОЖЛИВОСТІ ЇХ КОРЕКЦІЇ

14.03.04 — патологічна фізіологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Науковий керівник  
Камишний Олександр Михайлович,  
доктор медичних наук, доцент

Запоріжжя — 2015

## ЗМІСТ

	стор.
ЗМІСТ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	8
ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	18
1.1 Роль вродженого імунітету при ЗЗК.....	18
1.2 Роль набутого імунітету при ЗЗК.....	27
1.3 Застосування антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 й статинів для корекції імунних порушень при ЗЗК.....	31
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	39
2.1 Загальний алгоритм досліджень та його обґрунтування....	39
2.2 Експериментальні тварини.....	43
2.3 Групи експериментальних досліджень.....	44
2.4 Експериментальні моделі.....	45
2.4.1 Моделювання гострого та хронічного ілеїту.....	45
2.4.2 Моделювання коліту.....	45
2.4.3 Фармакологічна корекція гострого ілеїту, хронічного ілеїту та коліту.....	47
2.5 Методи оцінки розвитку патології.....	48
2.5.1 Клінічна оцінка активності коліту та ілеїту.....	48
2.5.2 Оцінка макроскопічних проявів ураження кишківника.....	49
2.5.3 Оцінка мікроскопічних проявів ураження кишківника.....	50
2.6 Методи імунофлюоресцентного дослідження.....	51
2.6.1 Методика дослідження експресії TLR2 і TLR4 рецепторів за допомогою реакції прямої	

	імунофлюоресценції.....	3 51
2.6.2	Методика дослідження експресії NF-κB, NOD2, RIGI, T-bet, GATA3, RORγt, Foxp3, Atg16 і AhR рецепторів за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції.....	56
2.7	Метод молекулярно-генетичного дослідження.....	59
2.7.1	Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін.....	59
2.7.2	Виділення тотальної РНК.....	60
2.7.3	Зворотна транскрипція (виділення κДНК).....	61
2.7.4	Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.....	62
2.8	Методи статистичних досліджень.....	65
РОЗДІЛ 3	РОЗВИТОК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ мРНК IL-1β, IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 В КИШКІВНИКУ ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН.....	66
3.1	Оцінка розвитку ілеїту та коліту у щурів лінії Wistar, а також оцінка впливу симвастатину й АРІЛ-1, які застосовували для фармакологічної корекції.....	67
3.1.1	Клінічні, макроскопічні та мікроскопічні ознаки гострого ілеїту у щурів лінії Wistar та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	67
3.1.2	Клінічні, макроскопічні та мікроскопічні ознаки хронічного ілеїту у щурів лінії Wistar та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	70
3.1.3	Клінічні, макроскопічні та мікроскопічні ознаки коліту у щурів лінії Wistar та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	73

3.2	Особливості експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 у кишківнику щурів лінії Wistar у нормі та в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та експериментального коліту.....	75
3.2.1	Рівні експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 у зразках клубової кишки контрольних щурів і тварин з експериментальним гострим та хронічним ілеїтом.....	75
3.2.2	Рівні експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 у зразках товстої кишки контрольних щурів і тварин з експериментальним колітом.....	77
РОЗДІЛ 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН.....		81
4.1	Особливості експресії TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI в ізольованих лімфоїдних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та на фоні введень симвастатину й АРІІ-1 експериментальним тваринам.....	82
4.1.1	Експресія TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕГІ та на фоні введень симвастатину й АРІІ-1.....	82
4.1.2	Експресія TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕХІ та на фоні введень	

	5
симвастатину й АРІЛ-1.....	97
4.2 Особливості експресії TLR2, TLR4, NF-κB, NOD2, RIGI у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального коліту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам.....	102
4.2.1 Експресія TLR2, TLR4, NF-κB, NOD2, RIGI у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	102
4.2.2 Експресія TLR2, TLR4, NF-κB, NOD2, RIGI у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	116
<b>РОЗДІЛ 5 ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ T-bet, GATA3, RORγt і Foxp3 У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН.....</b>	<b>131</b>
5.1 Особливості експресії T-bet, GATA3, RORγt і Foxp3 в ізольованих лімфоїдних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам.....	133
5.1.1 Експресія T-bet, GATA3, RORγt і Foxp3 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕГІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	133

5.1.2	Експресія T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕХІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	145
5.2	Особливості експресії T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального коліту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам.....	150
5.2.1	Експресія T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	150
5.2.2	Експресія T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	160
РОЗДІЛ 6 ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ AhR І Atg16 У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН.....		174
6.1	Особливості експресії AhR і Atg16 в ізольованих лімфоїдних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам.....	175
6.1.1	Експресія AhR і Atg16 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕГІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.....	175

6.1.2	Експресія AhR і Atg16 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕХІ та на фоні введень симвастатину й АРІЛ-1.....	183
6.2	Особливості експресії AhR і Atg16 у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального коліту та на фоні введень симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам.....	185
6.2.1	Експресія AhR і Atg16 у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введень симвастатину й АРІЛ-1.....	185
6.2.2	Експресія AhR і Atg16 у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введень симвастатину й АРІЛ-1.....	193
	РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ...	203
	ВИСНОВКИ.....	233
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	235

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ARIL-1	антагоніст рецепторів інтерлейкіна-1
ВПСО	власна пластинка слизової оболонки товстої кишки
ВПСОВ	власна пластинка слизової оболонки ворсинок клубової кишки
ДК	дендритні клітини
ЕПІ	експериментальний гострий ілеїт
ЕК	експериментальний коліт
ЕХІ	експериментальний хронічний ілеїт
ЗЗК	запальні захворювання кишківника
ЗТ-ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу
ІЛВ	ізолювані лімфоїдні вузлики клубової кишки
КАЛТ	кишково-асоційована лимфоїдна тканина
КЛЖК	коротколанцюгові жирні кислоти
МКАТ	моноклональні антитіла
НВК	неспецифічний виразковий коліт
ПО	підслизова основа товстої кишки
СЕР	стрес ендоплазматичного ретикулума
УО <sub>1ф</sub>	умовні одиниці інтенсивності флюоресценції
ХК	хвороба Крона
AhR	аріл-гідрокарбонові рецептори
ATG16L1	білок пов'язаний з аутофагією 16L1
DAMP	асоційовані з пошкодженням молекулярні образи
FFAR2	рецептор коротколанцюгових жирних кислот
FITC	флюоресцеїна ізотіоціонат
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 електрофоретичної рухливістю 1 (алармін)
NF-κB	ядерний фактор κB
NLR	NOD-like рецептори
NLRP3	інфламасома
PAMP	патоген-асоційовані молекулярні образи
PRR	паттерн-розпізнавальні рецептори
RLR	RIG-like 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

## ВСТУП

**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 [1]. 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 [2]. В Україні кількість хворих за останні 11 років збільшилася майже вдвічі [3].

Етіопатогенез ЗЗК складається з чотирьох основних компонентів: факторів навколишнього середовища, кишкової мікрофлори, стану імунної системи та генетичної схильності організму [4]. 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) [5]. Ряд досліджень продемонстрував важливу роль TLR і NLR у розвитку ЗЗК [6, 7], а зміни в сигнальному шляху RIG-like рецепторів можуть звернути фізіологічні реакції на патологічні, індукуючи надлишкову продукцію  $INF\gamma$  [8]. Нещодавні дослідження, присвячені вивченню ролі шляху NF- $\kappa$ B, сприяли ширшому розумінню патофізіології ЗЗК [9]. c-Rel-субодиниця NF- $\kappa$ B контролює диференціювання  $CD4^+$ -клітин, а NF- $\kappa$ B-залежна продукція прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і IL-17A безпосередньо індукуює розвиток ЗЗК [10]. NLRP3-інфламасома сприяє дозріванню IL-1 $\beta$ , її активація є критичним механізмом патогенезу ЗЗК [11]. Асоційовані з пошкодженням молекулярні образи (damage-associated

molecular patterns, DAMP) також можуть індукувати вроджений імунітет і запалення. Одним з таких є група білків з високою електрофоретичної рухливістю 1 (High Mobility Group Box 1 protein, HMGB1) [12]. Ще одним індуктором розвитку ЗЗК є зміни інтенсивності аутофагії [13]. Дефіцит ATG16L1 порушує формування аутофагосоми і деградацію білків. Але даних про особливості такої експресії в умовах ЗЗК зовсім немає.

Коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) є найбільш численними мікробними метаболітами у кишківнику, вони активують клітини через рецептор FFAR2, який експресується на клітинах імунної системи в слизових оболонках, передбачаючи важливу роль КЛЖК при ЗЗК [14]. Індуктором розвитку ЗЗК може бути вплив ксенобіотиків, які є лігандами специфічних рецепторів — арил-гідрокарбонових (AhR). Вони активуються факторами навколишнього середовища, модулюють активність імунних та не імунних клітин в кишківнику і можуть бути важливою ланкою між навколишнім середовищем і імунними порушеннями при ЗЗК [15]. 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, GATA3, ROR $\gamma$ t та Foxp3 можуть бути одними з факторів, що підтримують прогресування патологічного процесу [16, 17].

На сьогоднішній день єдиним ефективним методом лікування ЗЗК залишається «базисна» терапія, мета якої — гальмування запалення та проведення протирецидивної терапії, проте стійка ремісія при лікуванні цими засобами досягається лише у 30% хворих [18]. Це призводить до необхідності пошуку ефективніших методів лікування ЗЗК. 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 [19, 20]. Важливу роль в регуляції запалення та імунної

відповіді грає баланс між потужним прозапальним цитокіном IL-1 $\beta$  та антагоністом рецепторів IL-1 (IL-1ra). Людський рекомбінантний IL-1ra (Anakinra) був схвалений у США для лікування системних запальних захворювань [21], проте зависока ціна обмежує його широке застосування в Україні, та спонукає до пошуку і вивчення більш дешевих аналогів. Тому ми звернули увагу на можливість застосування симвастатина й антагоніста рецепторів інтерлейкіна-1 (АІЛ-1) для корекції імунних порушень при експериментальних ЗЗК у тварин.

Все це свідчить про медичну й соціальну значущість проблеми, перспективність її вивчення, обумовлює актуальність дослідження.

**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 $\beta$  і IL-17A, NLRP3-інфламасоми, c-Rel субодиниці NF- $\kappa$ 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<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>- і NF-κB<sup>+</sup>-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<sup>+</sup> (Th1), GATA3<sup>+</sup> (Th2), RORγt<sup>+</sup> (Th17) і Foxp3<sup>+</sup>-клітин (Treg) у лімфоїдних структурах тонкої та товстої кишок у цих же експериментальних групах.

4. Дослідити особливості експресії маркера 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), імунофлюоресцентні (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 імуофлюоресцентного 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 $\beta$  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<sup>+</sup> / TLR4<sup>+</sup>-клітин і щільність TLR2 і TLR4, кількість NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів і концентрацію NF- $\kappa$ B в клітинах, кількість NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-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 АРІІ-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, імуофлюоресцентного 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 обговорені 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.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Інтерес до вивчення запальних захворювань кишківника (ЗЗК) до яких відносять неспецифічний виразковий коліт (НВК) та хворобу Крона (ХК) досі не згасає. Важкий безперервний перебіг, часті рецидиви, розвиток місцевих і системних ускладнень та несприятливий прогноз супроводжується значним зниженням якості життя хворих, що робить ЗЗК важливою медико-соціальною проблемою і штовхає до більш поглибленого вивчення причин їх розвитку і патогенезу та пошуку кращих методів лікування цих захворювань [22]. Захворюваність на НВК у різних географічних місцевостях коливається від 0,5 до 24,5 випадків на 100 000 населення, ХК — від 0,1 до 16 / 100 000, а поширеність ЗЗК сягає 396 / 100 000 населення. У Європі страждають від цих хвороб понад 2 млн. жителів [23]. Кількість хворих в Україні за останні 11 років збільшилася майже вдвічі, що дає змогу судити про загальну тенденцію зростання захворюваності на ЗЗК в Україні [3].

#### 1.1 Роль вродженого імунітету при ЗЗК

Згідно з сучасними уявленнями, у механізмі розвитку ЗЗК важливу роль відіграють фактори навколишнього середовища, генетична схильність організму, дисбаланс динамічної рівноваги між мікроорганізмами, особливо коменсальною мікрофлорою і захисними реакціями організму господаря на межі слизової оболонки кишківника [24].

Кишковий бар'єр — динамічна багат шарова структура, яка складається з бактеріальної біоплівки, слизу, клітин епітелію і кишково-

асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ). Дисфункція цього комплексу створює передумови розвитку запального процесу в кишківнику [25]. В цьому відіграють провідну роль різні класи рецепторів, які розпізнають патоген-асоційовані молекулярні образи (pathogen-associated molecular patterns — PAMP) мікроорганізмів і займають центральне місце у вродженому імунитеті. До них відносяться паттернрозпізнавальні рецептори (PRR): мембранні та ендосомальні Toll-like рецептори (TLR), цитоплазматичні NOD-like рецептори (NLR) та сенсори вірусних РНК — RIG-like рецептори (RLR).

Існує багато сучасних досліджень в яких йдеться мова про значення TLR у розвитку ЗЗК. Зокрема, Tanaka et al. при вивченні експресії Toll-подібних рецепторів у слизовій оболонці кишківника пацієнтів з ЗЗК виявив збільшення рівня TLR2 і TLR4 в клубовій кишці у порівнянні зі здоровими волонтерами [6]. Candia et al. визначили, що у пацієнтів з ЗЗК відбувається збільшення вироблення розчинної форми TLR2 мононуклеарними клітинами власної пластинки слизової оболонки кишківника [26]. Cario E. встановила, що TLR2 відіграють ключову роль у підтримці цілісності слизової оболонки в моделі пошкодження епітеліального бар'єру кишківника у мишей [27].

Не менш важливе значення ніж TLR у розвитку ЗЗК відіграють NOD-like рецептори. Вони беруть участь у розпізнаванні внутрішньоклітинних патогенів і розвитку запалення [7]. Сигнали від цих рецепторів сприяють виробленню антимікробних пептидів і презентації мікробних антигенів через посилення активності молекул МНС (головний комплекс гістосумісності). Поліморфізми гена NOD2 змінюють функцію клітин Панета і таким чином викликають порушення вироблення антимікробних пептидів а також підвищують схильність до ЗЗК [28]. Cho знайшов мутації в генах NLR у пацієнтів зі ХК [29]. Ідентифікація NOD2 як гена схильності до ХК припустила важливу роль генетично-обумовлених взаємодій між кишковою мікробіотою та організмом господаря і неадекватною активацією імунної системи при ЗЗК [30].

NLR розпізнає внутрішньоклітинний бактеріальний антиген MDP (мурамілдіпептид) і рекрутує адаптерні білки з подальшою активації шляху ядерного фактора κB (NF-κB). Цей шлях зазвичай призводить до посилення транскрипції прозапальних генів.

Недавні дослідження, присвячені вивченню ролі шляху NF-κB, сприяли ширшому розумінню патофізіології ЗЗК. Наприклад, інгібування NF-κB в епітеліальних клітинах спричинило зниження антимікробного захисту, посилення бактеріальної транслокації і підвищення запальної відповіді [9]. Родина транскрипційних факторів NF-κB складається з п'яти членів: RelA (p65), c-Rel, RelB, p50 / p105 і p52 / p100. Димери цих білків знаходяться в неактивному стані в комплексі з інгібуючими білками родини IκB. IκB кінза (IKK) бере участь у деградації IκB. Для канонічного NF-κB сигнального шляху потрібен регуляторний білок IKKγ / NEMO і каталітична субодиниця IKK2 (IKKβ) що веде до ядерної транслокації RelA. Прозапальні цитокіни, такі як TNF-α та бактеріальні антигени можуть викликати цей процес. Альтернативний шлях включає IKK1 і сприяє накопиченню в ядрі p52 / RelB димерів. Цей шлях має важливе значення для розвитку лімфоцитів. У мишей, дефектних за регуляторним білком NEMO в епітеліальних клітинах, розвивається спонтанний коліт в ранньому періоді життя [31]. NF-κB-залежні прозапальні ефекти в макрофагах і Т-клітинах в більш пізніх стадіях коліту, можуть зменшити початкову захисну роль епітеліального NF-κB. Згідно з цим спостереженням, втрата IKKβ в макрофагах і нейтрофілах послаблює хронічний коліт у IL10<sup>-/-</sup> мишей [32].

Фактор транскрипції c-Rel є унікальним членом родини NF-κB, головним чином завдяки своїй специфічній участі в диференціюванні та функціонуванні В- і Т-клітин. Ряд недавно проведених досліджень показав, що c-Rel потрібен для розвитку в тимусі Treg клітин, які зобов'язані подавити активність аутореактивних Т-клітин і обмежити тривалість і силу нормальної Т-клітинної відповіді [33]. C-Rel також контролює диференціювання CD4<sup>+</sup> клітин під час різних аутоімунних реакцій, наприклад, розвиток Th1 при

експериментальній аутоімунній енцефалопатії включає с-Rel-індуковану експресію IL-12 антиген-презентуючими клітинами. І нарешті с-Rel відіграє важливу роль у регуляції експресії цитокінів активованими T-клітинами [34]. У зрілих B-клітинах, с-Rel виконує подвійну роль у сприянні клітинного поділу і виживанні, коли ці клітини активуються. Хоча BCR, CD40, TLR4, і TLR9 сигнали швидко мобілізують с-Rel димери у B-клітинах що покояться, дослідження на с-Rel<sup>-/-</sup> мишах показали, що він необхідний для мітоген-індукованого поділу B-клітин та їх виживання [35]. При відсутності с-Rel, мітоген-активовані B-клітини показали підвищений рівень апоптозу [36]. С-Rel сприяє виживанню цих клітин шляхом інгібування шляхів клітинної смерті через пряму індукції транскрипції генів, що кодують антиапоптозні білки родини Bcl-2 — A1/Blf-1 та Bcl-XL [10]. Кілька звітів засвідчили зв'язок SNP у межах або поблизу локусу *REL* з підвищеною чутливістю до деяких аутоімунних захворювань та раку. Ці *REL*-асоційовані захворювань включають ревматоїдний артрит [37], целиацію [38], псоріаз [39], НВК [40] та B-клітинну лімфому [41]. Ці поліморфізми, асоційовані з підвищеною чутливістю до аутоімунних захворювань розташовані в межах *REL* інтронів: SNP в 4 інтроні пов'язаний з ревматоїдним артритом і ХК, в 2 інтроні — з целиацію. Незважаючи на те що експресія с-Rel сприймається пов'язаною з кровотворними клітинами, він також зазвичай експресується на низькому рівні в ендотеліальних і епітеліальних клітинах, і втрата або зниження експресії с-Rel в певних типах клітин, в тому числі епітеліальних, підвищує чутливість до аутоімунних захворювань [42]. Якщо ці *REL* поліморфізми змінюють експресію білка Rel, можна припустити, що їх вплив на аутоімунні захворювання пов'язан зі зміною експресії генів-мішеней *REL*. Таким чином, с-Rel представляє інтерес при вивченні аутоімунних захворювань.

Можливість розвитку ЗЗК пов'язують також з родиною RIG-like рецепторів, яка складається з кількох компонентів: RIGI (retinoic acid-inducible gene 1), MDA5 (melanoma differentiated-associated gene-5) та LGP2 (laboratory of genetics and physiology-2), які були ідентифіковані як

найважливіші регулятори індукованого вірусом противірусного імунітету, здатні до зондування внутрішньоклітинної вірусної РНК, і які передають сигнали через адаптерні білки (MAVS/IPS-1/VISA/Cardif), призводячи до активації IRF-3 і NF-κB та збільшення виробництва інтерферону у відповідь на вірусну інфекцію [43]. Як відомо, продукція INF — двобічний процес, що у випадку дизрегуляції може бути небезпечним для господаря, призводячи до хронічної цитотоксичності, запалення й аутоімунної патології. Порушення RIGI у мишей привело до серйозних пошкоджень і запальної інфільтрації в слизовій оболонці товстої кишки [44]. На додаток до цих запальних ефектів, кількість псерових бляшок була значно нижче у RIGI-дефіцитних мишей та було виявлено що він контролює транскрипційну активність Gαi2, негативного регулятора T-клітинних реакцій, які можуть опосередковувати моделюючі ефекти RIGI [45]. Збільшення експресії RLR у структурах КАЛТ може призводити до надлишкової продукції INF, що в свою чергу, є одним із факторів ризику розвитку ЗЗК [46]. Крім того, зміна рівня експресії RLR може впливати на баланс субпопуляцій T-хелперів, впливаючи на рівень утворення прозапальних Th17 й Th1-клітин [47].

Аутофагія — фундаментальна і еволюційно високо-консервативна відповідь на голодування, представляє лізосомальний шлях, який бере участь в обігу клітинних макромолекул і органел і грає важливу роль в різних біологічних процесах — інфекція, імунітет, рак і старіння [48]. Аутофагія активується різними факторами включаючи стрес ендоплазматичного ретикулума (СЕР) і включає утворення аутофагосом з подвійною мембраною, які поглинають вміст клітини та пізніше зливаються з лізосомами. Зв'язок між СЕР і аутофагією включає кілька рівнів і ймовірно відрізняється серед різних типів клітин. СЕР може активувати аутофагію через здатність IRE1 зв'язувати TRAF2 і активувати JNK або через PERK-опосередковане інгібування eIF2α [49]. Цікаво, що Spalinger et al. виявили ATG16L1 як фактор генетичного ризику специфічний для ХК, але не для НВК [50]. Разом з ідентифікацією поліморфізмів поблизу іншого гена, залученого в аутофагію

— IRGM, ці дослідження разом виявили раніше непередбачену роль аутофагії в патогенезі ХК. Розуміння участі ATG16L1 при ХК виникає з досліджень *Atg16l1* дефіцитних мишей. Дефіцит ATG16L1 порушує залучення кон'югату Atg12-ATG5 до мембрани, наслідком якого є порушення формування аутофагосом і деградації білків. Стимуляція ATG16L1<sup>-/-</sup> макрофагами з ліпополісахаридом (ЛПС) призвела до високої секреції IL-1 $\beta$  і IL-18 за допомогою TRIF-залежної активації каспази-1, показуючи, що ATG16L1 регулює ЛПС-індуковану активацію інфламасоми. Дефіцит ATG16L1 в кістковому мозку призвів до підвищеної чутливості мишей до DSS коліту, який можна послабити заблокувавши IL-1 $\beta$  і IL-18 [51]. Клітини Панета ATG16L1-гіпоморфних мишей також показали зміну експресії генів, що беруть участь у передачі сигналів PPAR і метаболізмі ліпідів разом зі збільшенням продукції адипоцитокінів, лептину та адипонектину, залучаючи їх до регуляцію запалення кишківника [52]. Стратегія нокаут / відновлення *in vitro* показала, що варіант *ATG16L1*<sup>T300A</sup> нагадує функцію NOD2 [53], демонструючи порушення захвату *Salmonella Typhimurium* в аутофагосомі, не впливаючи на базальну аутофагію [54]. Відповідно до цього, аутофагія може запускатися NOD1 або NOD2 у відповідь на внутрішньоклітинну інфекцію з інвазивними бактеріями, які стимулюють залучення ATG16L1 до плазматичної мембрани [55]. *ATG16L1*<sup>T300A</sup> асоціюється з порушенням NOD2-залежної індукції аутофагії при стимуляції MDP [56]. Таким чином, ці два генетичні фактори ризику (NOD2 і ATG16L1) функціонують у загальному шляху, який включає бактеріально-індуковану аутофагію та індукцію антиген-специфічних Т-клітин, і цей шлях також порушується у разі відсутності нормально функціонуючого NOD2 [57]. Ці дослідження показують, схожість декількох генетичних факторів ризику ЗЗК (NOD2, XBP1 і ATG16L1) впливати на функції епітелію кишківника і особливо на клітини Панета і одночасно регулювати запальні шляхи в епітеліальних і міелоїдних клітинах. Отже, функції цих епітеліальних клітин, які певно чутливі до

модифікацій навколишнього середовища, можуть бути важливими факторами, що визначають схильність до розвитку ЗЗК.

Деякі NLR реагують на різні PAMP і призводять до вивільнення родини прозапальних цитокінів, включаючи IL-1 $\beta$ , IL-18 та IL-33 через формування інфламасоми [58]. На підставі участі NLR, інфламасоми згруповані в основні типи: NLRP1, NLRP2, NLRP3 і NLRP4 (IPAF). NLRP3 направляє перетворення прокаспазу-1 в каспазу-1 з подальшим утворенням IL-1 $\beta$  і IL-18 [59]. Формування NLRP3 інфламасоми викликається PAMP з різними структурами, такими як ЛПС, длРНК, PGN и LTAs при стимуляції разом з позаклітинною АТФ [11]. Основний зв'язок між IL-1 / IL-18 та ЗЗК полягає в тому що ХК і НВК асоціюванні з однонуклеотидним поліморфізмом рецептора IL-18. Було виявлено зниження секреції IL-1 $\beta$  після стимуляції міелоїдних клітин MDP у пацієнтів, з ризик-асоційованими NOD2 варіантами [60]. Ці генетичні дослідження показують, що недостатня вроджена IL-1 $\beta$  (і можливо IL-18) активність може бути ризиком ХК і НВК, можливо на рівні епітеліального бар'єру [61]. Експресія IL-1 $\beta$  у порівнянні з антагоністом рецепторів IL-1 (IL-1ra), збільшена в кишківнику при ЗЗК [62]. Більш того, введення анти-IL-1 $\beta$  або IL-1ra пом'якшує перебіг експериментального коліту у тварин, тоді як нейтралізація IL-1ra посилює його тяжкість [63]. Генетична делеція каспази-1, послаблює функцію NLRP3 інфламасоми а відтак IL-1 $\beta$  та IL-18 процесінг і пом'якшує перебіг DSS коліту [64]. Ці дослідження свідчать, що надмірна продукція IL-1 та IL-18 може сприяти хронічному кишковому запаленню.

Щоб узгодити ці дані з генетичними дослідженнями, розумно розглянути можливість того, що неадекватна відповідь на мікрофлору може обумовити схильність до ЗЗК через неконтрольований адаптивний імунітет [65]. Крім того, шлях IL-1 може перетинатися з іншим, первинним (генетично опосередкованим) ризиком. Наприклад, експресія IL-1 $\beta$  збільшена в *Atg16ll<sup>-/-</sup>* міелоїдних клітинах і підвищення IL-1 $\beta$  може бути результатом дисфункції клітин Панета [66].



Родина IL-1 не єдина група прозапальних білків. Багато інших білків можуть індукувати вроджений імунітет і запалення. Ці білки зазвичай розглядаються як асоційовані з пошкодженням молекулярні образи (damage-associated molecular patterns — DAMP) [67]. Можливо, одним з найбільш вивчених DAMP є негістоновий ядерний білок HMGB1 (High Mobility Group Box 1 protein). У своїй «повсякденній роботі», він підсилює зв'язування регуляторних білків з рядом генів, в тому числі з тими, що мають важливе значення для регулювання аутофагії [68]. Після вивільнення із клітини, під час дії клітинного стресу або пошкодження, HMGB1 може зв'язуватися з декількома PRR і сприяти запаленню [69].

В даний час визнано, що HMGB1 має широкий спектр ефектів, які охоплюють індукцію вироблення цитокінів, проліферацію клітин, хемотаксис, ангіогенез і клітинну диференцію. На додаток до ефектів на імунних клітинах, HMGB1 може модулювати діяльність кровотворних, епітеліальних і нервових клітин і бути посередником системних ефектів, таких як лихоманка і відповідь гострої фази. HMGB1 після низки посттрансляційних модифікацій активно секретується і формує запальні комплекси з олдНК, ЛПС, IL-1, які взаємодіють з IL-1R, TLR2, TLR4, TLR9, Siglec-10 і RAGE. HMGB1 може утворювати комплекси з IL-1 $\alpha$  і IL-1 $\beta$ , посилювати імунну відповідь а також керувати патогенезом найрізноманітніших імуноопосередкованих захворювань [70]. HMGB1 також індукує залучення запальних клітин [71], сприяє дозріванню дендритних клітин [72] і проліферації активованих Т-клітин [73]. З усіх цих причин, HMGB1 вважається потужним медіатором запалення і бере участь в запальних та аутоімунних захворюваннях, таких як ревматоїдний артрит, червоний вовчак, діабет і ЗЗК [74, 75]. У своєму дослідженні Vitali et al. показали що інгібування HMGB1 покращує перебіг DSS-індукованого коліту у мишей. [76].

Людський організм асоційований з численними мікроорганізмами навколишнього середовища. ШКТ містить понад  $10^{14}$  мікроорганізмів і більш

ніж 1000 видів які в основному містяться в товстій кишці і не доступні для культивування звичайними методами [77, 78]. Приклад мікробного механізму який впливає на запальну відповідь організму хазяїна, і який залежить від харчового раціону, пов'язаний з коротколанцюговими жирними кислотами (short-chain fatty acids — SCFA). Вільні жирні кислот (ВЖК) вже давно розглядаються як ключові сигнальні молекули в численних фізіологічних і патологічних процесах. Нещодавня ідентифікація родини рецепторів, сполучених з G-білком (G-protein-coupled receptors — GPCR) які зв'язують ВЖК показала новий потенційний механізм участі їх у різних патологічних станах [79]. Серед таких рецепторів — FFAR2 який активуються SCFA і експресуються клітинами імунної та нервової систем а також у ШКТ, зокрема колоноцитами й ентероцитами тонкої і товстої кишки. SCFA є основними метаболітами присутніми в товстій кишці ссавців. Вони виробляються мікрофлорою ШКТ шляхом ферментації вуглеводів і харчових волокон [80]. Залучення FFAR2 в запальний процес підтвердилось різними групами вчених [81, 82]. Maslowskiet et al. показали, що стимулювання FFAR2 ацетатом дозволило зменшити коліт-асоціювану запальну реакцію. У FFAR2<sup>-/-</sup> мишей посилюється запалення у випадках гострого та хронічного коліту, артриту і астми. Це може бути пов'язано з посиленням залученням імунних клітин [83]. Навпаки Sina et al. повідомили, що в моделі гострого коліту FFAR2<sup>-/-</sup> мишей збільшилася смертність в порівнянні з контрольними, незважаючи на зниження залучення популяції імунних клітин, зменшення запалення та послаблення пошкодження тканин кишківника. Підвищена смертність була приписана септичним ускладненням. У моделі хронічного коліту, нестача FFAR2 призвела до зменшення запалення без будь-яких ознак сепсису та летальності. Автори зазначили біпотенціальную патофізіологічну роль імунних клітин, які будучи фактором захисту проти гострої бактеріальної трансміграції зумовлюють негативну роль при хронічній запальній реакції. [81]. Порівняння ряду робіт підкреслює, що біологічні та молекулярні відповіді на SCFA відрізняються між різними типами імунних

клітин. Це може бути пов'язано з різним часом участі цих клітин в запальній реакції [84].

В імунній системі FFAR2 експресуються на еозинофілах, базофілах, нейтрофілах, моноцитах, дендритних клітинах і тучних клітинах слизових оболонок передбачаючи, важливу роль КЦЖК в імунних реакціях [14]. SCFA добре відомі своїми протизапальними ефектами за рахунок модуляції хемотаксису імунних клітин, вироблення активних форм кисню, а також секреції цитокінів. Бутірат викликає протизапальний ефект шляхом інгібування IL-12 і посилення секреції IL-10 [85], пригнічує вироблення прозапальних молекул TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , оксиду азоту і зниженням активності NF- $\kappa$ B [86].

## 1.2 Роль набутого імунітету при ЗЗК

Численні дослідження свідчать, що різні субпопуляції Т-хелперів безпосередньо залучені в патогенез ЗЗК. Серед молекул, що експресуються CD4<sup>+</sup> Т-клітинами і претендують на роль їх маркерів найбільш надійними, як вважають, є транскрипційні фактори. T-bet є фактором транскрипції, який регулює диференціювання Т-клітин у напрямку Т-хелперів 1 типу (Th1); GATA3 — фактор транскрипції, який спрямовує диференціювання Т-лімфоцитів у напрямку Т-хелперів 2 типу (Th2) [16]. Те що ці клітини задіяні безпосередньо в імунопатогенез ЗЗК засвідчили дослідження Ohtani et al. які показали значне посилення експресії GATA3 в слизовій оболонці кишківника у дітей з ЗЗК [87], а Vamias et al. показали що розвиток хронічного ілеїту асоційовано зі значним збільшенням експресії мРНК IL-5 і IL-13 — цитокінів Th2 типу в лімфоцитах кишківника [88]. Так, Neurath et al. показали акумуляцію Т-клітин експресуючих T-bet у власній пластинці кишківника у пацієнтів з ХК, а також більш високу експресію T-bet в цих клітинах [89].

Також Matsuoka et al. продемонстрував, що рівні мРНК білка T-bet вище в CD4<sup>+</sup> мононуклеарних клітинах власної пластинки у пацієнтів з ХК в порівнянні з контролем [90]. Фактор транскрипції Foxp3 керує фенотипічним перетворенням наївних Т-клітин в Treg та є більш специфічним маркером Т-регуляторних клітин, ніж більшість маркерів клітинної поверхні. На противагу цьому, Т-хелпери 17 типу (Th17) є новою і важливою субпопуляцією Т-хелперів, які можуть мати відношення до пошкодження тканин при таких захворюваннях, як енцефаломієліт, ЗЗК, ревматоїдний артрит і алергічна гіперчутливість дихальних шляхів [17]. Основним регулятором диференціювання Th17 є транскрипційний фактор ROR $\gamma$ t. У тварин, дефіцитних по ядерному рецептору ROR $\gamma$ t, послаблюються експериментально-індуковані аутоімунні захворювання. Переміщення диференційованих Th17 в організм мишей з лімфопенією призводить до розвитку коліту. Ці дані доводять, що Th17 клітини відіграють центральну роль в патогенезі ЗЗК [91]. Dambacher et al. засвідчили, що пацієнти з ХК мають підвищений рівень IL-17A в слизовій оболонці кишківника, власна пластинка містить підвищену кількість Th17 клітин, а фактор транскрипції ROR $\gamma$ t експресований на більш високих рівнях [92].

Різноманітні субпопуляції Th є досить пластичними і на ранніх стадіях розвитку можуть диференціюватися в інші клітини. Яскравим підтвердженням цього є виявлення подвійних позитивних Foxp3<sup>+</sup>ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> Т-лімфоцитів, які можуть надалі диференціюватися як в регуляторні клітини, що перешкоджають розвитку аутоімунних захворювань, так і в прозапальні Th17-клітини. Тому, експресія лімфоцитами транскрипційних факторів Foxp3 або ROR $\gamma$ t ще не є свідченням їхнього термінального диференціювання й зовсім не факт, що ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> клітини врешті-решт поповнять пул Th17-клітин, а не Treg [93]. Ueno et al. показали, що кількість циркулюючих подвійних IL-17 і Foxp3 експресуючих CD4<sup>+</sup> Т-клітин збільшується у пацієнтів з ЗЗК. Коекспресія ROR $\gamma$ t і Foxp3 в цих клітинах передбачає перетворення з Treg Th17-клітин. Це пов'язано зі зниженням супресорної функції Foxp3 CD4<sup>+</sup> Т-

лімфоцитів [94]. Крім того, Аууoub et al. повідомив що Treg секретують IL-17 *ex vivo* і конститутивно експресують ROR $\gamma$ t, поділяють деякі фенотипічні і функціональні особливості зі звичайними клітинами Th17, експресуючи високі рівні хемокінових рецепторів CCR4 і CCR6 і низькі рівні CXCR3. Однак, на відміну від звичайних Th17, вони експресують низькі рівні CD161 і не секретують IL-22 і TNF- $\alpha$  *ex vivo*. Секреція IL-17 і конститутивна експресія ROR $\gamma$ t людськими клітинами пам'яті Treg припускає, що на додаток до їх відомих супресорних функцій ці клітини, ймовірно, грають додаткові, поки що не описані, прозапальні функції [95]. Таким чином, зміни експресії GATA3, T-bet, ROR $\gamma$ t, Foxp3 в КАЛТ при ЗЗК можуть бути одними з факторів, що підтримують прогресування патологічного процесу.

Аріл-гідрокарбонові рецептори (AhR) активуються великою кількістю факторів навколишнього середовища, модулюють активність імунних та не імунних клітин в кишківнику, і можуть бути важливою ланкою між навколишнім середовищем і імунними порушеннями, що лежать в основі патогенезу ЗЗК [15]. AhR були спочатку охарактеризовані як регулятори метаболізму ксенобіотиків, зокрема, поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАВ) і діоксинів [96]. Дослідження, проведені на AhR<sup>-/-</sup> мишах показали підвищену запальну відповідь на цигарковий дим що містить діоксин і діоксин-подібні хімічні речовини, з підвищенням рівня TNF- $\alpha$  та IL-6 [97]. Крім того, дослідження показали, що ПАВ і діоксин-подібні хімічні речовини, присутні в цигарковому димі діють як потужний AhR-агоніст. AhR активно експресовані в кишківнику, особливо в епітеліальних клітинах тонкої кишки. Крім того, пероральне або внутрішньочеревне введення AhR-агоністів призвело до швидкої індукції експресії CYP1A1 в кишкових криптах. Таким чином, повсюдна наявність ксенобіотиків, таких як ПАВ і цигарковий дим, здатні активувати сигнальні AhR шляхи в клітинах слизової оболонки ШКТ [98].

Нещодавно були визначені потужні AhR агоністи — прозапальні метаболіти арахідонової кислоти (лірохін A4) і триптофан. Цікаво, що деякі

грампозитивні та грамнегативні бактерії, присутні в кишківнику людини, також можуть виробляти триптофан, і таким чином, генерувати AhR ліганди у вигляді індолів. З іншого боку, індолнегативні бактерії виробляють оксигенази, які перешкоджають ідоловим сигналам. Взяті разом ці спостереження дозволяють припустити, що відносний розподіл індол позитивних / негативних бактерій може модулювати кишковий епітелій і функцію імунних клітин [99]. AhR відіграють важливу роль у розвитку T-ефекторних і T-клітин пам'яті і як наслідок у розвитку ЗЗК. Th17 характеризуються високою експресією AhR в комбінації з IL-17A, IL-17F і IL-22 цитокінами. Активація клітин Th17 за допомогою FICZ (AhR-агоніст короткої дії) збільшує секрецію цих цитокінів та індукує експресію генів AhR. Підтверджує взаємозв'язок між AhR і Th17 той факт, що Th17 клітини AhR<sup>-/-</sup> мишей не можуть секретувати IL-22, припускаючи, що активація AhR необхідна для IL-22 в цій субпопуляції T-клітин [100]. Епітеліальні клітини кишківника також можуть експресувати IL-22, що сприяє вивільненню антимікробних пептидів. Немає жодних доказів, що AhR ліганди керують цією секрецією, але враховуючи роль NF-κB в клітинах Панета і взаємодію NF-κB-AhR, останній може модулювати вроджені імунні функції слизової оболонки ШКТ. На користь цих взаємодій свідчить те, що експресія IL-22 активується в слизовій кишківника пацієнтів з ХК і грає важливу роль в експериментальному коліті. AhR також може впливати на диференціювання Treg шляхом збільшення кількості TGF-β або опосередковано через дендритні клітини (ДК) [101]. Mottet et al. припустили оскільки Th17 сприяють імунній відповіді а Treg, як відомо, зменшують імунну реактивність, баланс Treg / Th17 служить відмінною ознакою ефективної імунної відповіді і толерантності до аутоантигенів при хронічних інфекціях або аутоімунних захворюваннях та припустили, що AhR змінює баланс Treg / Th17 клітин через зміну цитокінового мікрооточення [102]. Механізм може бути пов'язаний з тим, що TGF-β індукує диференціювання Treg, тоді як присутність IL-6 веде до TGF-β-залежного диференціювання Th17 [103].

Kawajiri et al. показали, що у  $AhR^{-/-}$  мишей розвивається коліт і вони мають схильність до розвитку раку товстої кишки [104]. Можна зробити висновок з отриманих даних про фізіологічну важливість цього рецептора в рості клітин [105], апоптозі [106], складних перехресних взаємодій з NF- $\kappa$ B [107] і відповіді на CEP [108].

### **1.3 Застосування антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 й статинів для корекції імунних порушень при ЗЗК**

Не вирішеним є питання щодо якісної терапії ЗЗК основу яких складають 5-аміносаліцилати, локальні та системні кортикостероїди, імуносупресори та інгібітори цитокінів. В даний час проходить клінічні випробування велика група препаратів, метою яких є блокада ключових цитокінів або їх сигнальних шляхів які беруть участь у патогенезі цих захворювань (табл. 1.1) [109].

Вчені припускають, що ці препарати будуть залишатися домінуючою областю інтересів у сфері терапії ЗЗК. Тим не менш, антицитокінова терапія не є вирішенням всіх проблем. Справа в тому, що цитокінові взаємодії в запаленій слизовій оболонці набагато складніші, ніж передбачалося раніше, і що вони регулюються численними мікробними, генетичними та імунологічними факторами. Ключовою особливістю цитокінових взаємодій в кишківнику є здатність їх проходити просторові межі, і цілком імовірно, що блокада одного цитокіну у пацієнтів з ЗЗК може призвести до розвитку альтернативних компенсаторних прозапальних цитокінових шляхів. Крім того, патофізіологічні механізми, які запускають і регулюють запалення слизової оболонки кишківника можуть відрізнятися між пацієнтами, що і пояснює, чому таргетна терапія не ефективна у багатьох випадках [109].

Таблиця 1.1

## Цитокини або цитокинові сигнальні шляхи, як терапевтичні мішені при ЗЗК

Цитокин або сигнальна молекула	Захворювання	Переваги	Недоліки	Етап дослідження	Терапевтичний агент
<b>IFN<math>\beta</math></b>	НВК	Імунорегуляторні цитокини націлені на регуляторні клітини	Обмеження чи неефективність у клінічних випробуваннях	Клінічні випробування (Фаза II)	Рекомбінантний IFN $\beta$
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	ХК	Імовірна біологічна активність у дослідженнях	Обмежена ефективність у клінічних випробуваннях	Клінічні випробування (Фаза II)	Фонтолізумаб
<b>TNF</b>	НВК, ХК	Центральний прозапальний цитокин в патогенезі ЗЗК	Підвищений ризик інфекції легенів і туберкульоз	Схвалено при ЗЗК	Інфліксимаб, Адаліумаб і Голіумаб
<b>TGF<math>\beta</math></b>	ХК	Таргетинг SMAD7 відновлює TGF $\beta$ -чутливість клітин	Довгострокова токсичність й ефекти незрозумілі	Клінічні випробування (Фаза I)	SMAD7 антисмислові олігонуклеотиди
<b>IL-6R</b>	ХК	Імовірна біологічна активність в мишачих моделях і <i>ex vivo</i> дослідженнях з клітинами пацієнтів з ЗЗК	Відповідь можна побачити тільки в підгрупах пацієнтів; лікувальний вплив на слизову оболонку незрозумілий	Клінічні випробування (Фаза II)	Тоцилізумаб
<b>IL-10</b>	ХК	Імовірна біологічна активність в мишачих моделях захворювання	Обмеження чи неефективність у клінічних випробуваннях	Клінічні випробування (Фаза II)	Рекомбінантний IL-10



Продовження табл. 1.1

<b>Цитокін або сигнальна молекула</b>	<b>Захворювання</b>	<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>	<b>Етап дослідження</b>	<b>Терапевтичний агент</b>
<b>IL-11</b>	ХК	Імуностимулюючий цитокін	Обмеження чи неефективність у клінічних випробуваннях	Клінічні випробування (Фаза II)	Рекомбінантний IL-11
<b>IL-12, IL-23</b>	ХК	Імовірна біологічна активність в мишачих моделях	Відповідь тільки в підгрупах пацієнтів	Клінічні випробування (Фаза I-II)	Уstekinumab та Бриакінумаб (ABT874)
<b>IL-13</b>	НВК	Імовірна біологічна активність в мишачих моделях	Ефективність наразі невідома	Клінічні випробування (Фаза II)	Анрукінумаб та Тралокінумаб
<b>IL-17A</b>	ХК	Імовірний біологічна активність в деяких моделях запалення	Загострення захворювання і вплив на тканинний гомеостаз	Клінічні випробування (Фаза II)	Секукінумаб
<b>JAK3</b>	НВК (ХК)	Таргетинг декількох ключових цитокінів одночасно	Токсичність незрозуміла і не ефективні в дослідженні при ХК	Клінічні випробування (Фаза II)	Тофацітініб

Примітки: ЗЗК — запальні захворювання кишківника; НВК — неспецифічний виразковий коліт; ХК — хвороба Крона; TGFβ — трансформуючий фактор росту-β; TNF — фактор некрозу пухлини.

ДК і макрофаги є ключовими антиген-презентуючими клітинами, які виявлені в запаленій слизовій оболонці кишківника при ЗЗК [110]. Після активації компонентами коменсальної мікрофлори через TLR, ці клітини виробляють велику кількість прозапальних цитокінів, таких як IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 і TNF [111]. Родина інтерлейкіну-1 складається з двох прозапальних цитокінів — IL-1 $\alpha$  й IL-1 $\beta$ , які зв'язуються з двома IL-1 рецепторами (IL-1R1 і IL-1R2) і антагоніста IL-1R (IL-1ra). IL-1 $\alpha$  й IL-1 $\beta$  важливі медіатори запальної реакції, вони беруть участь в різних клітинних процесах, включаючи проліферацію, диференціацію та апоптоз. Не менш важливу роль в регуляції запалення та імунної відповіді грає баланс між IL-1 і IL-1ra. Значне зменшення співвідношення IL-1ra і IL-1 було виявлено в слизовій оболонці кишківника пацієнтів з ХК і НВК, що свідчить про посилення активації системи IL-1 при ЗЗК [62], а Maeda et al. вказали на дисбаланс між IL-1 $\beta$  й IL-1ra який може відігравати роль у патогенезі ЗЗК [112].

Подальші дослідження в мишачих моделях коліту показали, що члени родини IL-1 виявляють плейотропні ефекти, які залежать від стадії захворювання. IL-1 $\beta$  сприяє вродженій імунній патології в викликаному *Helicobacter hepaticus* запаленні кишківника шляхом залучення гранулоцитів і активації лімфоїдних клітин [113]. У сукупності, літературні дані свідчать про те, що IL-1 відіграє помітну роль в ініціації ніж у підтримці запалення товстої кишки. Тим не менш, блокада членів родини IL-1 показала позитивний вплив в мишачих моделях гострого та хронічного коліту [114]. IL-1ra показав ефективність протизапальної терапії при деяких хронічних запальних захворюваннях [115], а людський рекомбінантний IL-1ra (Anakinra) був схвалений у США для лікування ревматоїдного артриту [21], проте зависока ціна обмежує його широке застосування в Україні, та спонукає до пошуку і вивчення більш дешевих аналогів.

Мета базисної терапії — блокування основних ланок імунних і запальних реакцій. У цьому аспекті викликає особливий інтерес використання для терапевтичної корекції таких препаратів як статини,

імуномоделюючі ефекти яких відкриті зовсім недавно. Симвастатин належить до класу препаратів котрі знижують рівень холестерину в крові за рахунок пригнічення 3-гідрокси-3-метилглутарил коензим А-редуктази. Однак виявлені інші, холестерин-незалежні ефекти статинів. Встановлено, що в їх основі лежить зниження синтезу проміжних продуктів метаболізму холестерину, зокрема геранілгераніл пірофосфату (geranylgeranyl-pyrophosphate, GGPP) і фарнезил пірофосфату (farnesyl-pyrophosphate, FPP). Приєднання гідрофобних молекул GGPP і FPP до білків називається прениляцією (ізопрениляцією). Прениляції піддаються білки, що містять карбокситермінальну послідовність СааХ (де С — цистеїн, а — аліфатична амінокислота і Х — будь-яка амінокислота). У людському геномі містяться гени більше 100 відомих і гіпотетичних протеїнів які містять СааХ послідовність. З них близько 40 належать до сімейства малих ГТФаз і виконують функцію внутрішньоклітинних молекулярних перемикачів, до яких відносяться білки CDC42, RAC і гомолог RAS. Особливістю цих протеїнів є те, що вони можуть знаходитися в двох станах — неактивному, після приєднання до них молекул гуанозиндифосфату (guanosine diphosphate, GDP) і активному, зв'язуючись з молекулою гуанозинтрифосфату (guanosine triphosphate, GTP). При заміні GDP на GTP (за допомогою іншого білка), конформація білка-перемикача змінюється, він зв'язується з молекулою-мішенню і активує її. Незабаром після того, як молекула у включеному стані активує свою мішень, гідролітична частина білка відщеплює термінальний фосфат від пов'язаного нуклеозидтрифосфата, і білок повертається в GDP-зв'язаний стан, тобто вимикається [116]. Пренилюватись також можуть і білки RAB-сімейства пов'язані з RAS G-протеїнів (більше 60 представників), більшість з яких містять СС або СХС С-термінальну послідовність. Ці білки складають до 2% білка клітини і необхідні для здійснення процесів внутрішньоклітинного везикулярного транспорту [117]. Також прениляція білків відіграє важливу роль у функціонуванні клітин імунної системи [118].

Статини пригнічують експресію МНС 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 [119]. Показано, що статини зменшують синтез прозапальних цитокінів *in vitro* а також *in vivo*. Так, Yilmaz et al. продемонстрували зниження продукції IL-6, IL-8, IL-12 і TNF-α в культурах ДК при додаванні симвастатину або аторвастатину [120]. Leung et al. було виявлено зменшення вмісту циркулюючого IL-6, пригнічення СП-індукованої продукції TNF-α, IL-6 і IL-12 *in vitro* при колаген-індукованому артриті у мишей, що отримували симвастатин [121]. Застосування аторвастатину призводить до зниження вмісту TNF-α і IL-β в міокарді при експериментальному діабеті у собак [122]. Симвастатин зменшує вміст сироваткового TNF-α при люпус-подібному захворюванні у мишей лінії *gld.apoE<sup>-/-</sup>* [123]. Yokota et al. показали зменшення синтезу IL-6 і IL-8 синовіальними фібробластами хворих на ревматоїдний артрит при додаванні в культури симвастатину [124]. Lee et al. продемонстрували що симвастатин пригнічує експресію прозапальних генів, блокуючи передачу сигналів через NF-κB і послаблює DSS-індукований гострий коліт у мишей [125]. Деякі автори показали, що статини сприяють зменшенню запалення при експериментальній патології як у тварин [126], так і у пацієнтів з ХК [127].

У таблиці 1.2 підсумовані результати використання статинів при різних експериментальних аутоімунних захворюваннях [128].

Таблиця 1.2

## Результати застосування статинів при експериментальних аутоіммунних захворюваннях

Автор	Рік	Препарат	Клінічний ефект	Імунологічні ефекти
Експериментальний аутоіммунний енцефаліт				
Sattler [129]	2005	Симвастатин	-	Не виявлені.
Greenwood [130]	2003	Ловастатин	+	Пригнічення міграції лейкоцитів через гематоенцефалічний бар'єр.
Експериментальний артрит				
Yamagata [131]	2007	Правастатин	+	Зниження продукції прозапальних цитокінів та MMP1 спленоцитами.
Leung [121]	2003	Симвастатин	+	Зсув балансу Th1 / Th2 у бік Th2, пригнічення антиген-специфічної відповіді на СІІ.
Експериментальний аутоіммунний увеоретиніт				
Gegg [132]	2005	Ловастатин	+	Зсув балансу Th1 / Th2 у бік Th2.
Thomas [133]	2005	Аторвастатин	-	Не виявлені.
Експериментальний аутоіммунний міокардит				
Tang [134]	2007	Аторвастатин	+	Зменшення локальної продукції TNF- $\alpha$ и IFN- $\gamma$ .
Liu [135]	2005	Аторвастатин	+	Зсув балансу Th1 / Th2 у бік Th2.
Експериментальний системний червоний вовчак				
Aprahamian [123]	2006	Симвастатин	+	Зсув балансу Th1 / Th2 у бік Th2.
Lawman [136]	2004	Аторвастатин	+	Зменшення експресії МНС II, пригнічення проліферації Т-лімфоцитів.

Таким чином, згідно з оглядом літератури, ЗЗК широко поширені у всьому світі і характеризуються високою інвалідизацією, смертністю, тенденцією до хронізації та пізнім діагностуванням. Це обумовлює необхідність своєчасного патогенетичного лікування. Разом з тим існуючі на сьогодні методи лікування ЗЗК є недостатньо ефективними, мають безліч побічних ефектів, викликають короткочасний терапевтичний ефект та не завжди доступні широким верствам населення внаслідок високої вартості, що робить актуальною проблему пошуку нових методів їх лікування. Тому ми звернули увагу на можливість застосування симвастатина й антагоніста рецепторів інтерлейкіна-1 (АРІЛ-1) для корекції імунних порушень при експериментальних ЗЗК у тварин.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Загальний алгоритм досліджень та його обґрунтування

Зручним підходом до вивчення складності патогенезу ЗЗК у людини є індукція цих захворювань у тварин. Тваринні моделі ЗЗК є обов'язковими для правильного розуміння гістологічних і морфологічних змін в ШКТ. Отже, ці моделі відіграють ключову роль у розробці нових терапевтичних засобів для лікування та аналізу можливих механізмів дії конкретного препарату. Різні моделі були розроблені для вивчення ЗЗК; вони включають в себе хімічно-індуковані моделі, модель адаптивного переносу, моделі спонтанного коліту, генно-інженерні та трансгенні моделі. Серед них, широко використовуються хімічно-індуковані моделі, оскільки вони мають гарну відтворюваність і прості в розвитку.

Хоча жодна з цих моделей не слугує повним адекватним відтворенням людської хвороби і мають як і всі інші моделі обмеження, вони схожі певною мірою з важливими імунологічними та гістологічними аспектами ЗЗК у людини а деякі характерні патологічні особливості добре вивчені, залежно від способу моделювання що використовується. Експериментальні моделі коліту та ілеїту дозволяють нам аналізувати компоненти патогенезу на різних етапах розвитку патології, включаючи гостру, відновну і хронічну фази. Вони також дозволяють нам виявити деякі ключові імунологічні процеси, а також нові гени які тісно пов'язані зі схильністю до ЗЗК.

Нами була обрана оксазолон-індукована модель коліту оскільки для неї характерно залучення дистального відділу товстої кишки а гістологічні характеристики і підвищена секреція Th2-залежних цитокінів (IL-4, IL-5, IL-

13) у власній пластинці слизової оболонки кишківника цих щурів, в деяких моментах, аналогічні характеристикам, які були відзначені у людей з НВК. Як і інші моделі, оксазолонівий коліт залежить від лінії використаних тварин і потребує індивідуальної оптимізації. Прикладом цього може слугувати те, що оксазолон в більш низьких дозах може викликати змішаний Th1 / Th2-залежний коліт [137].

Також ми використовували індометацин-індуковану модель гострого та хронічного ілеїту. Механізм, за допомогою якого індометацин індукує кишкове виразкування полягає в інгібуванні простагландин-синтетази, що призводить до дефіциту простагландинів, зниження резистентності слизової оболонки кишківнику, що викликає транслокацію бактерій, бактеріальних токсинів і жовчних кислот, запалення, некроз, і виразкування кишківника. Нестероїдні протизапальні лікарські засоби призводять до кишкової гіпермоторики і мікросудинних порушень, що ведуть до активації нейтрофілів і експресії iNOS, і тим самим спричинюють ушкодження кишківника [138, 139]. Механізми, що відповідають за гостре пошкодження в порівнянні з хронічним запаленням яке індуковано індометацином, дуже різні. Більшість досліджень присвячено тільки гострій фазі запалення кишківника індукованого дуже високими (летальними) дозами індометацину. Ми обрали для роботи дві моделі ентеропатії з використанням сублетальних доз індометацину (10-15 мг / кг), які індукують гостре і хронічне запалення в тонкій кишці [140].

Пошук шляхів лікарської корекції ЗЗК також є актуальною проблемою сучасної експериментальної та клінічної медицини. Розуміння патофізіологічних та імунологічних основ реалізації запалення в кишківнику дозволяє таргетно впливати на основні ланки патогенезу лікарськими речовинами, тобто адресно впливати тільки на хворі клітини і не діяти на органи і системи, які не залучені в цей процес. Як засіб фармакологічної корекції нами було обрано симвастатин — препарат класу інгібіторів 3-гідрокси-3-метилглутарил коензим А-редуктази, який на додаток до



зниження рівня холестерину, чинить різні плейотропні ефекти, в тому числі імуномоделюючі та протизапальні. Дослідження, проведені на тваринних моделях свідчать, що статини інгібують як гостре так і хронічне запалення холестерин-незалежним способом [141]. Також ми застосували антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1, мішенню якого є рецептори до цитокінів, зокрема прозапальний IL-1 $\beta$ .

У відповідності з поставленими метою та завданнями дослідження, нами був запропонований алгоритм експериментального блоку, що дозволяє дослідити 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. Дизайн дослідження схематично представлений на рисунку 2.1.

## Дизайн дослідження

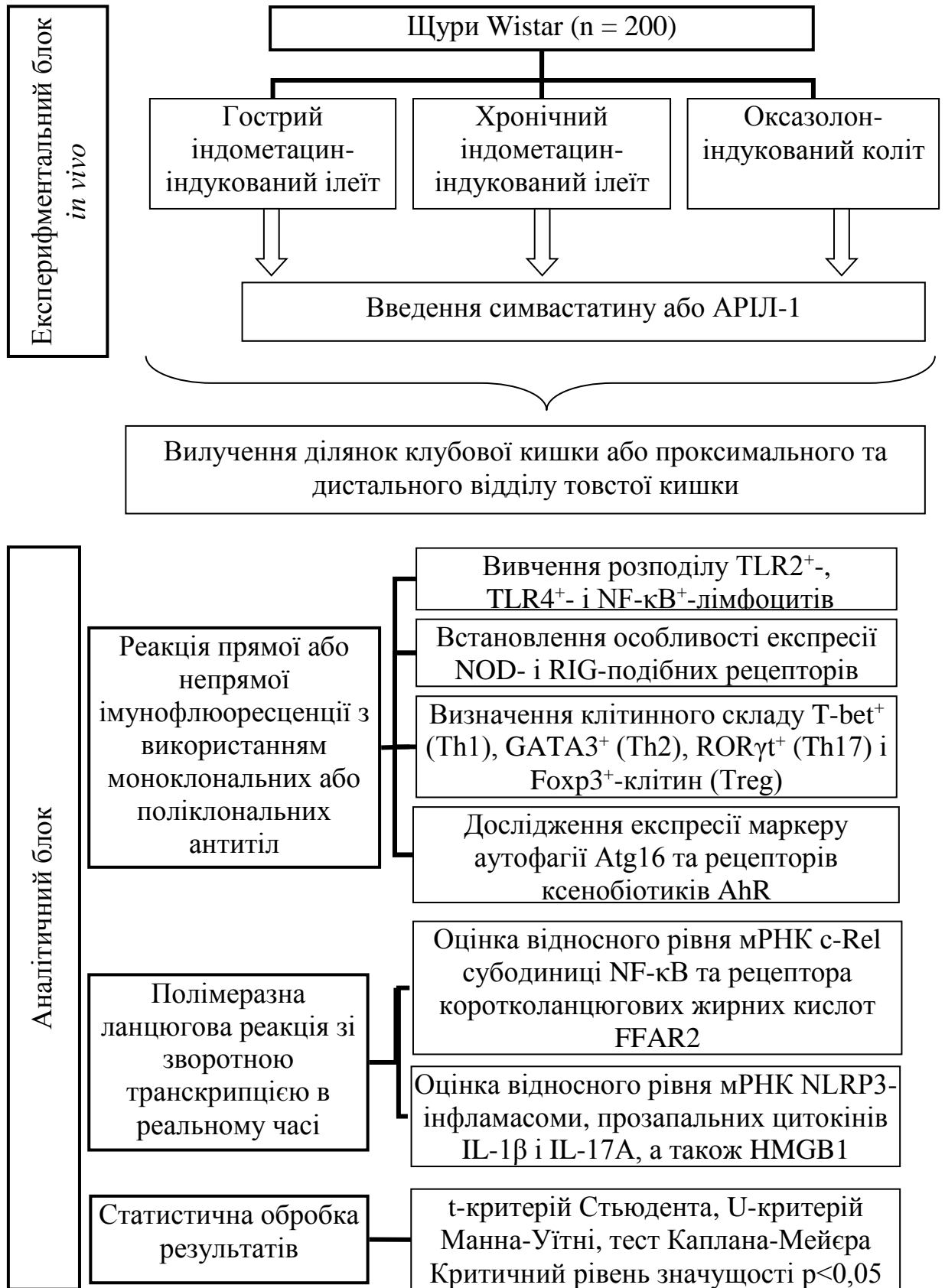


Рис. 2.1 Схема дизайну дослідження.

## 2.2 Експериментальні тварини

Дослідження проведені на 200 щурах (самцях) лінії Wistar, масою 120-150 г, оскільки ці тварини легко піддаються відтворенню експериментальних моделей і зручні для проведення досліджень. Тварини, використані в експериментах, були отримані з розплідника об'єднання ветеринарної медицини ПП «Біомодельсервіс» міста Києва. Щури перебували в умовах природного освітлення при вільному доступі до води та їжі. Акліматизація (карантин) — мінімум 7 днів перед початком дослідження за тих самих умов, що й основного дослідження. Всі дослідження були проведені в осінне-зимовий період у віварії Запорізького державного медичного університету. Тварини перебували при температурі повітря 18-21 °С, при світловому дні 7-00 — 19-00, з вільним доступом до їжі та води. Комісія з біомедичної етики ДУ «Запорізький державний медичний університет (№ 7 від 24 вересня 2015 р.) встановила, що дослідження проведені з дотриманням основних положень «Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин», затверджених указом МОЗ України №753 від 12 серпня 1997г., Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових задач (Strasbourg, 18.III.1986), Указу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. «Про заходи по подальшому удосконаленню організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин» і Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006). Тварин зважували до ініціації патології, а також після цього кожен день. В останній день експерименту тварин з 18-00 позбавляли їжі і наступного дня з 10-00 виводили з експерименту методом одномоментної декапітації під наркозом (етамінал натрію 40 мг / кг внутрішньочеревно). Вилучали ділянки клубової кишки, проксимального і дистального відділу товстої кишки для подальших досліджень.

### 2.3 Групи експериментальних досліджень

Експериментальні тварини були розподілені на десять груп у випадковому порядку (табл. 2.1). Група 1 — контрольні тварини яким одноразово підшкірно вводили 5% розчин  $\text{NaHCO}_3$  (контроль по відношенню до тварин з експериментальним гострим та хронічним ілеїтом) або інтраректально вводили 50% розчин етанолу (контроль по відношенню до тварин з експериментальним колітом); 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 АРІЛ-1; група 9 — тварини з ЕХІ яким вводили АРІЛ-1; група 10 — тварини з ЕК яким вводили АРІЛ-1.

Таблиця 2.1

#### Розподіл щурів в експериментальних серіях

Серії досліджень	Кількість тварин
1. Контрольні тварини	20
2. Тварини з експериментальним гострим ілеїтом	20
3. Тварини з експериментальним хронічним ілеїтом	20
4. Тварини з експериментальним колітом	20
5. Тварини з гострим ілеїтом + симвастатин	20
6. Тварини з хронічним ілеїтом + симвастатин	20
7. Тварини з колітом + симвастатин	20
8. Тварини з гострим ілеїтом + АРІЛ-1	20
9. Тварини з хронічним ілеїтом + АРІЛ-1	20
10. Тварини з колітом + АРІЛ-1	20
Всього тварин	200

## 2.4 Експериментальні моделі

### 2.4.1 *Моделювання гострого та хронічного ілеїту.*

Для індукції ЕГІ та ЕХІ у щурів використовували індометацинову модель захворювання, яка є однією з найбільш поширених експериментальних моделей запалення тонкої кишки [140, 142]. Індометацин (1-(4-хлоробензоїл)-5-метокси-2-метиліндол-3-оцтова кислота) є похідним індолоцтової кислоти і належить до групи нестероїдних протизапальних лікарських засобів. Виявляє сильну гальмуючу дію на простагландиновий синтез шляхом інгібування циклооксигенази.

Щури отримували воду і стандартний корм без обмежень аж до ін'єкції індометацину. Гостре запалення кишківника було викликано однією підшкірної ін'єкцією індометацину (15 мг / кг), тоді як хронічне запалення кишківника індукували двома підшкірними ін'єкціями індометацину (10 мг / кг) щоденно з 24-годинним інтервалом. Індометацин (Sigma-Aldrich, США, № за каталогом I7378) готували розчиненням препарату (1,5 мг / мл) в теплому (37 °С) 5% розчині  $\text{NaHCO}_3$  перед ін'єкціями. Час, що минув з дня введення останньої ін'єкції препарату, в подальшому викладі матеріалу інтерпретували як тривалість перебігу патології. Тварин виводили з експерименту на 4 добу після останньої ін'єкції індометацину при ЕГІ, та на 13 добу при ЕХІ.

### 2.4.2 *Моделювання коліту.*

Для індукції ЕК у щурів використовували оксазолонову модель захворювання, яка є однією з найбільш поширених експериментальних Th2-опосередкованих моделей і має важливе значення для дослідження патогенезу та лікування виразкового коліту [143]. Механізм дії полягає в тому що оксазолон (4-етоксіметілен-2-феніл-2-оксазолін-5-он) є гаптенем, і викликає реакцію гіперчутливості уповільненого типу та запалення

опосередковане типовими МНС II-реактивними CD4<sup>+</sup> Т-клітинами. В цій моделі, початкові токсичні ефекти індукуючого агента призводять до наповнення власної пластинки оксазолон-модифікованими бактеріальними антигенами та індукції імунної відповіді, що призводить до подальшого запалення [144]. Індукований оксазолоном коліт також залежить від наявності IL-13 продукуючих інваріантних НКТ-клітин. Таким чином, ця модель є одною з декількох моделей які підходять для вивчення Th2-залежної імунної відповіді при запаленні кишківника [137].

Моделювання проводили згідно з найпоширеною методикою запропонованою Wirtz et al. в модифікації Zhang et al. [145, 146].

Для цього в 1 день ретельно виголюють ділянку шкіри розміром 1,5 см × 1,5 см на спині між лопатками (щоб уникнути злизування оксазолону твариною) за допомогою електричної бритви. Контрольних щурів обробляють сенсibiliзуючим розчином без оксазолону. За допомогою піпетки наносять 200 мкл сенсibiliзуючого розчину на поголену ділянку шкіри. Розчин адсорбується досить швидко. На 8-й день щурів зважують та наркотизують (1,2 % розчин кетаміну (96 мг / кг), внутрішньочеревно). Гумовий катетер S8 (Rüsch, Німеччина) під'єднують до наповненого розчином оксазолону шприцу. Після засипання тварині вставляють катетер в товсту кишку на 8 см від ануса і повільно вводять 1 мл розчину оксазолону в просвіт товстої кишки. Видаляють катетер з товстої кишки і тримають щура вниз головою у вертикальному положенні протягом 60 с для рівномірного розподілу розчину в кишківнику. Повертають тварину в клітку для пробудження.

Час, що минув з дня введення останньої ін'єкції препарату, в подальшому викладі матеріалу інтерпретували як тривалість перебігу патології. Тварин виводили з експерименту на 6 добу після інтравектальної інстиляції оксазолону.

Сенсibiliзуючий розчин готували змішуванням ацетону й оливкової олії в об'ємному співвідношенні 4:1. Потім розчиняють 60 мг оксазолону

(Sigma-Aldrich, США, № за каталогом E0753) в 2 мл суміші ацетон / оливкова олія, щоб отримати 3% (вага / об'єм) розчин оксазолону.

Розчин оксазолону для інтраректальної інстиляції готували розчиненням 20 мг оксазолону в 2 мл 50% розчину етанолу, щоб отримати 1% (вага / об'єм) розчин.

#### *2.4.3 Фармакологічна корекція гострого ілеїту, хронічного ілеїту та коліту.*

Для фармакологічної корекції нами використовувались наступні препарати:

1) інгібітор 3-гідрокси-3-метилглутарил коензим А-редуктази — симвастатин (Sigma-Aldrich, США, № за каталогом S6196). Розчин препарату готують за методикою запропонованою Bernard et al. наступним чином: 4 мг симвастатину розчиняють в 0,1 мл 96% розчині етанолу та 0,15 мл 0,1 N NaOH, інкубують при 50 °C впродовж 2 годин, а потім доводять рН до 7 та об'єм до 1,0 мл [121].

Таким чином отримують 0,4% розчин який вводять внутрішньочеревно в дозі 20 мг / кг, з розрахунку 5 мл / кг маси. Введення здійснювали один раз на добу (10-00) через 24 години після моделювання патології. При ЕГІ протягом 3 днів, при ЕХІ протягом 12 днів, при ЕК протягом 5 днів.

2) антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1). Субстанцію АРІЛ-1 отримано в Державному науково-дослідному інституті особливо чистих біопрепаратів Федерального медико-біологічного агентства Росії «ДНДІ ОЧБ» (Санкт-Петербург). Субстанція АРІЛ-1 складається з 153 амінокислот, отримана за допомогою генно-інженерних технологій та є ліофільно висушеним білком ІЛ-1ра, який продукується рекомбінантним штамом E. coli BL21.

АРІЛ-1 розчиняли в воді для ін'єкцій щоб отримати 0,03% розчин та вводили підшкірно в дозі 3 мг / кг, з розрахунку 10 мл / кг маси. Введення здійснювали один раз на добу (10-00) через 24 години після моделювання

патології. При ЕГІ протягом 3 днів, при ЕХІ протягом 12 днів, при ЕК протягом 5 днів.

Вибір доз для введення визначали на підставі експериментальних даних, наведених в літературі по дослідженню вищевказаних препаратів у щурів [147, 148].

Як експерименти без вживання препаратів, так і експерименти із застосуванням препаратів проведені в абсолютно однакових, стандартизованих умовах з використанням перерахованих методик.

## **2.5 Методи оцінки розвитку патології**

Дослідження тканин клубової кишки, проксимального та дистального відділу товстої кишки проводили для верифікації та підтвердження діагнозу, реєстрації динаміки процесу, який моделювали, а також для оцінки впливу препаратів, які застосовували для лікарської корекції.

### *2.5.1 Клінічна оцінка активності коліту та ілеїту.*

Клінічні ознаки коліту оцінювали щоденно відповідно до модифікованої бальної системи з підрахуванням валідованого клінічного індексу активності захворювання (disease activity index — DAI), що змінюється від 0 до 4 відповідно наступним параметрам: втрата маси тіла, консистенція випорожнень та поведінка тварини [149, 150]. Втрату маси тіла оцінювали наступним чином: (0) 0%; (1) 1–5%; (2) 6–10%; (3) 11–15%; (4) > 15%. Втрату маси тіла підраховували як відсоткову різницю між початковою вагою тіла (день 1) та поточною вагою тіла на кожен експериментальний день. Оцінка діареї (консистенція випорожнень): (0) правильно сформовані гранули; (1) м'яке чи пастоподібне випорожнення; (2) водянисте випорожнення (волога пляма навколо ануса до 1 см<sup>2</sup>); (3) водянисте



випорожнення (волога пляма навколо ануса більше ніж 1 см<sup>2</sup> і охоплює нижню частину живота; (4) рідкий стілець (пляма доходить до грудей). Поведінка: (0) нормальна; (1) зниження активності та помірно піднята шерсть; (2) тварина брудна, зменшення спонтанних рухів і апатія; (3) скуйовджена шерсть, тварина майже не рухається та не реагує на інших тварин; (4) спонтанна смерть. Отримані параметри оцінки підсумовані разом, щоб отримати загальний DAI в діапазоні від 0 (здорова тварина) до 12 (максимально хвора тварина).

### *2.5.2 Оцінка макроскопічних проявів ураження кишківника.*

Для макроскопічної оцінки змін в кишківнику щурів умиряють і видаляють сегменти товстої кишки (8 см товстої кишки від анального отвору) та клубової кишки (довжиною 10 см) і розкривають їх шляхом розрізу в поздовжньому напрямку. Потім промивають сегменти кишок в фізіологічному розчині щоб видалити залишки фекалій, розтягують слизовою оболонкою вгору і утримуючи шпильками на чашці Петрі заповненій воском негайно досліджують та виставляють бали. «Запалення» визначали як область гіперемії і потовщення стінки кишківника. Сегменти кишок були розглянуті незалежно двома спостерігачами, які не знали про лікування.

Пошкодження слизової оболонки товстої кишки при коліті оцінювали за шкалою від 0 до 5 відповідно до критеріїв Morris et al. [151]: (0) пошкоджень немає; (1) є одна область запалення (червоного кольору), виразки відсутні; (2) є виразки, області запалення відсутні; (3) є виразки, є одна область запалення; (4) є більше 2 виразок, запалення присутня в одній області; (5) є більше 2 виразок, область запалення має розмір > 1 см.

Пошкодження слизової оболонки клубової кишки при ілеїті оцінювали за шкалою від 0 до 8 відповідно до критеріїв Morris et al. в модифікації Jagtap et al. [151, 152]: (0) немає видимих змін; (1) є області гіперемії; (2) є ураження, що мають діаметр 1 мм або менше; (3) є ураження, що мають діаметр 2 мм або менше (кількість < 5); (4) є ураження, що мають діаметр 2

мм або менше (кількість 5-10); (5) є ураження, що мають діаметр 2 мм або менше (кількість > 10); (6) є ураження, що мають діаметр більше 2 мм (кількість < 5); (7) є ураження, що мають діаметр більше 2 мм (кількість 5-10); (8) є ураження, що мають діаметр більше 2 мм (кількість > 10).

### *2.5.3 Оцінка мікроскопічних проявів ураження кишківника.*

Для гістологічної оцінки уражень вирізають фрагменти тканини клубової кишки і дистального відділу (0,5 см від анального отвору) товстої кишки довжиною 0,5 см від кожної тварини, промивають в фізіологічному розчині і фіксують у фіксаторі Буена (70% пікринової кислоти / 25% формаліну (37%) / 5% крижаної оцтової кислоти) протягом 20 годин при кімнатній температурі. Після 2-годинного відмивання фіксатора в проточній холодній воді тканину проводять в висхідних концентраціях етанолу 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%-1, 100%-2, розчинах етанол 100% + хлороформ 2:1, етанол 100% + хлороформ 1:1, етанол 100% + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ( $t = + 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), на 1 годину поміщають в рідкий парапласт ( $t = + 56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) і потім укладають в парапластові блоки. На ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) готують серійні зрізи товщиною 5 мкм, які потім депарафінують в ксилолі, проводять регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%) і відмивають у 0,1 М фосфатному буфері ( $\text{pH} = 7,4$ ). З метою оглядового забарвлення гістологічні зрізи фарбують гематоксиліном і еозином та виставляють бали «сліпим спостерігачем» відповідно до гістологічної системи балів, описаної нижче. Перегляд і цифрові фотографії 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).

Гістологічний аналіз товстої кишки проводили за шкалою від 0 до 5 відповідно до критеріїв Voivivant et al. [144]: (0) не спостерігали зміни; (1) є

мінімальні розсіяні слизові клітинні запальні інфільтрати з / без мінімальної епітеліальної гіперплазії; (2) є помірно розсіяні / дифузні клітинні запальні інфільтрати, які подекуди поширюються у підслизову оболонку та пов'язані з ерозіями, з мінімальною / помірною епітеліальною гіперплазією та мінімальним / помірним вичерпанням муцину з келихоподібних клітин; (3) є помірні / середні клітинні запальні інфільтрати, які подекуди були трансмуральні, часто пов'язані з укриванням виразками, з середньою епітеліальною гіперплазією та вичерпанням муцину; (4) є значні клітинні запальні інфільтрати, які часто були трансмуральні та пов'язані з укриванням виразками, зі значною епітеліальною гіперплазією та вичерпанням муцину; (5) є значні трансмуральні запалення з тяжким укриванням виразками та втратою кишкових залоз.

Гістологічний аналіз клубової кишки проводили за шкалою від 0 до 3 відповідно до критеріїв Colpaert et al. [153]: (0) не спостерігали зміни; (1) є збільшення клітинних запальних інфільтратів та / або деформовані ворсинки та / або втрата епітелію; (2) є виразки та / або некроз та / або лімфоїдні фолікули; (3) є трансмуральний некроз та / або перитоніт (всі бали  $\times 2$  при тяжкості ураження більше ніж фокусне).

## **2.6 Методи імунофлюоресцентного дослідження**

*2.6.1 Методика дослідження експресії TLR2 і TLR4 рецепторів за допомогою реакції прямої імунофлюоресценції.*

Для ідентифікації TLR2 і TLR4 у гістологічних зрізах кишківника застосовували прямий імунофлюоресцентний метод. Структуру популяції TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-клітин вивчають на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів й даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для цього експериментальних тварин в останній день досліджень позбавляють

їжі і після 16 годин голодування, після одномоментної декапітації під наркозом вилучають фрагменти клубової кишки, проксимального (5 см від анального отвору) та дистального відділів (0,5 см від анального отвору) товстої кишки довжиною 0,5 см від кожної тварини і поміщають в фіксатор Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після 2-годинного відмивання фіксатора в проточній холодній воді зразки проводять в висхідних концентраціях етанолу 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%-1, 100%-2, розчинах етанол 100% + хлороформ 2:1, етанол 100% + хлороформ 1:1, етанол 100% + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ( $t = + 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), на 1 годину поміщають в рідкий парапласт ( $t = + 56 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) і потім укладають в парапластові блоки. Для проведення наступного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) роблять 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, проксимального та дистального відділів товстої кишки які потім депарафінують в ксилолі, проводять регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивають у 0,1 М фосфатному буфері ( $\text{pH} = 7,4$ ) і інкубують з моноклональними антитілами до TLR2 або TLR4 миші які кон'юговані з флуоресцеїна ізотіоціанатом (FITC) впродовж 18 годин у вологій камері ( $t = + 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (табл. 2.2). Після інкубації зрізи тричі по 10 хв промивають у 0,1 М фосфатному буфері ( $\text{pH}=7,4$ ), наносять на зрізи суміш гліцерин / фосфатний буфер у співвідношенні 1:9 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчають за допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Зображення, що отримуються на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводять в комп'ютер. При цьому виключається ефект «вигорання» препарату, пов'язаний з поступовим руйнуванням молекули FITC під впливом тривалого ультрафіолетового

опромінення. Досліджують не менше 200 полів зору. В автоматичному режимі визначають області зі статистично значущою флюоресценцією. Щільність рецепторів визначали враховуючи інтенсивність флюоресценції ідентифікованих імунопозитивних клітин і неспецифічну флюоресценцію препарату (так званий «фон»). На підставі цих показників обраховувалася коректована клітинна флюоресценція (в умовних одиницях інтенсивності флюоресценції  $UO_{I\Phi}$ ). В результаті класифікаційного аналізу ідентифікували імунопозитивні лімфобласти площею (Area)  $\geq 30,0$   $\mu\text{m}^2$ ; середні лімфоцити  $16,0 > \text{Area} \geq 11,0$   $\mu\text{m}^2$ ; малі лімфоцити  $11,0 > \text{Area} \geq 5,0$   $\mu\text{m}^2$ . Це дозволило обчислити абсолютну (кількість клітин на 1  $\text{mm}^2$  площі тканини) і відносну (%) щільність розподілу різних імунопозитивних лімфоцитів різних класів в досліджуваних зонах кишківника. При інкубації з моноклональними антитілами досліджують TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-клітини, розташовані в ізольованих лімфоїдних вузликах (ІЛВ) 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. Підтвердження експресії лімфоцитами TLR2<sup>+</sup>-рецепторів в кишківнику представлено на рисунку 2.2.

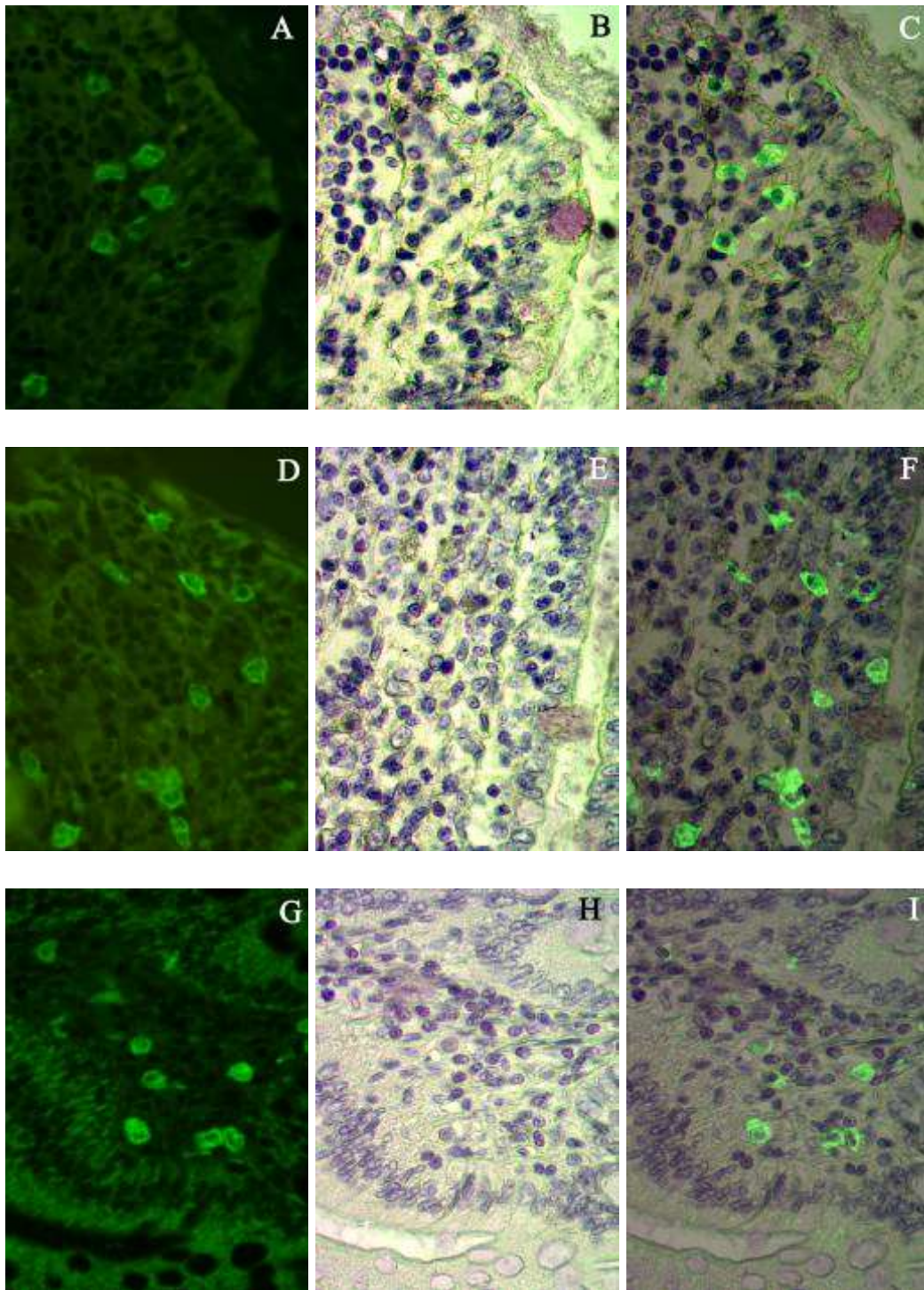


Рис. 2.2 (А-І). Експресія TLR2<sup>+</sup>-рецепторів (А, В, С), AhR<sup>+</sup>-рецепторів (D, E, F) і Atg16<sup>+</sup>-рецепторів (G, H, I) лімфоцитами клубової кишки контрольної групи тварин. Реакція прямої імунофлюоресценції (А). Реакція непрямой імунофлюоресценції (D, G). Дофарбовані зрізи гематоксилином Майера для додаткової візуалізації (В, Е, Н). Злиття двох зображень (С, F, I). Збільш. × 400.

## Антитіла використані в імуофлюоресцентному дослідженні

Специфічність	Клон	Ізотип	Кон'югат	Виробник (номер за каталогом)
TLR2	6C2	Rat IgG2b	FITC	Hycult Biotech, Netherlands, HM1047F
TLR4	MTS 510	Rat IgG2a	FITC	Hycult Biotech, Netherlands, HM1029F
NF-κB	E-10	Mouse IgG <sub>1</sub> *	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-8414
NOD2	H-300	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-30199
RIGI	H-300	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-98911
T-bet	H-210	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-21003
GATA3	H-48	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-9009
RORγt	H-190	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-28559
Foxp3	150D/ E4	Mouse IgG <sub>1</sub> *	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-130666
AhR	H-211	Rabbit IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-5579
Atg16	C-20	Goat IgG*	—	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-70133
Anti-goat	—	Rabbit IgG	FITC	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-2777
Anti-rabbit	—	Mouse IgG	FITC	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-2359
Anti-mouse	—	Rabbit IgG	FITC	Santa Cruz Biotechnology, USA, sc-358916

Примітки: (\*) — антитіла можуть бути використані у щурів.

2.6.2 *Методика дослідження експресії NF-κB, NOD2, RIGI, T-bet, GATA3, RORγt, Foxp3 Atg16 і AhR рецепторів за допомогою реакції непрямой імунофлюоресценції.*

Для ідентифікації NF-κB, NOD2, RIGI, T-bet, GATA3, RORγt, Foxp3 Atg16 і AhR у гістологічних зрізах кишківника застосовували непрямий імунофлюоресцентний метод. Структуру популяції імунопозитивних клітин вивчають на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів й даних їх морфометричних і денситометричних характеристик. Для цього експериментальних тварин в останній день досліджень позбавляють їжі і після 16 годин голодування, після одномоментної декапітації під наркозом вилучають фрагменти клубової кишки, проксимального (5 см від анального отвору) та дистального відділів (0,5 см від анального отвору) товстої кишки довжиною 0,5 см від кожної тварини і поміщають в фіксатор Буена на 20 годин при кімнатній температурі. Після 2-годинного відмивання фіксатора в проточній холодній воді зразки проводять в висхідних концентраціях етанолу 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%-1, 100%-2, розчинах етанол 100% + хлороформ 2:1, етанол 100% + хлороформ 1:1, етанол 100% + хлороформ 1:2, хлороформ, хлороформ + парапласт (MkCormick, США) 1:3 ( $t = + 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), на 1 годину поміщають в рідкий парапласт ( $t = +56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) і потім укладають в парапластові блоки. Для проведення наступного дослідження на ротаційному мікротомі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) роблять 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, проксимального та дистального відділів товстої кишки які потім депарафінують в ксилолі, проводять регідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивають у 0,1 М фосфатному буфері (pH = 7,4) і інкубують з моноклональними антитілами до NF-κB, Foxp3 або поліклональними антитілами до NOD2, RIGI, T-bet, GATA3, RORγt, Atg16 і AhR рецепторів впродовж 18 годин у вологій камері ( $t = + 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (див. табл. 2.2). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зрізи інкубують 60 хв у вологій камері ( $t = + 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) з вторинними антитілами в розведенні 1:64. В якості вторинних антитіл



використовують антитіла до повної молекули IgG кролика, кози або миші, кон'юговані з FITC. Після інкубації зрізи тричі по 10 хв промивають у 0,1 М фосфатному буфері (рН = 7,4), наносять на зрізи суміш гліцерин / фосфатний буфер у співвідношенні 1:9 для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчають за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Зображення, що отримуються на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (для FITC) за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина) негайно вводять в комп'ютер. Досліджують не менше 200 полів зору. Подальше вивчення зображення здійснюють за методикою, аналогічною описаній в пункті 2.6.1. Зразки зображень експресії транскрипційних факторів ROR $\gamma$ t, T-bet і Foxp3 лімфоцитами в клубовій кишці при розвитку EXI представлено на рисунку 2.3. При інкубації з антитілами досліджують NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, RIGI<sup>+</sup>-, T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>-, AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-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. Підтвердження експресії лімфоцитами AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-рецепторів в кишківнику представлено на рисунку 2.2. Потрібно враховувати що показники концентрації та вмісту NF- $\kappa$ B, T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t, Foxp3 та Atg16 в імунопозитивних клітинах є відносними, а не абсолютними величинами.

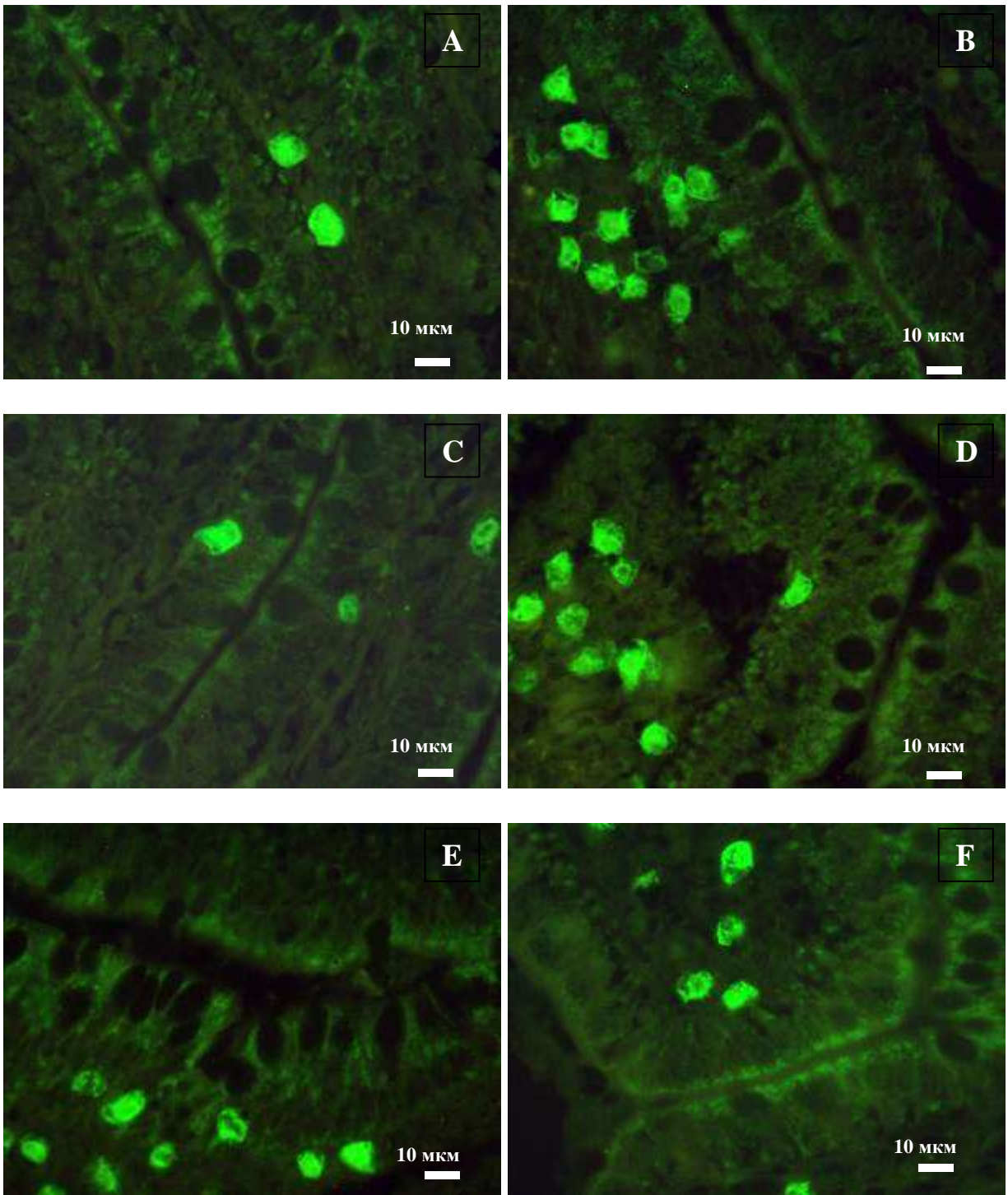


Рис. 2.3 (A-F). Експресія транскрипційних факторів ROR $\gamma$ t (A, B) T-bet (C, D) і Foxp3 (E, F) лімфоцитами клубової кишки щурів контрольної групи (A, C, E) та з експериментальним хронічним ілеїтом (B, D, F). Реакція непрямой імунофлуоресценції. Збільш.  $\times 400$ .

## 2.7 Метод молекулярно-генетичного дослідження

Для аналізу експресії генів використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Об'єктом дослідження у експериментальних тварин були фрагменти клубової кишки та дистального відділу товстої кишки (0,5 см від анального отвору) довжиною 0,5 см від кожної тварини, які були залиті у парафінові блоки після стандартної гістологічної підготовки. Молекулярно-генетичне дослідження проведено на архівному матеріалі віком 2 роки.

Спосіб здійснюють таким чином.

*2.7.1 Депарафінізація зразків, попередньо фіксованих в розчині Буена і залитих в парафін.*

1.1 Проводять гомогенізацію зразка видаленого з парафінового блоку з 1 мл 100% ксилолу за допомогою ступки і товкачика. Переносять гомогенат в пробірку типу «Eppendorf» (Axygen, США) і інкубують протягом 5 хв. Перемішують на вортексі і короткочасно (протягом 1 хв) центрифугують для осадження тканини. Видаляють ксилол не порушуючи осаду.

1.2 Додають 1 мл 100% ксилолу і інкубують протягом 5 хв. Перемішують на вортексі і нагрівають зразок протягом 3 хв при  $t = + 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , щоб розплавити парафін. Центрифугують зразок протягом 2 хв при кімнатній температурі при максимальній швидкості для осадження тканини. Видаляють ксилол, не порушуючи осаду. Якщо осад нещільний, залишають деяку кількість ксилолу в пробірці, щоб уникнути видалення шматочків тканини.

1.3 Додають 1 мл 100% етанолу на зразок протягом 5 хв і перемішують на вортексі. Центрифугують 2 хв при максимальній швидкості для осадження тканини. Етанол буде містити слідові кількості ксилолу і, відповідно, його необхідно акуратно видалити не порушуючи осаду.

1.4 Додають 1 мл 96% етанолу на зразок і інкубують протягом 5 хв, перемішують на вортексі. Центрифугують зразок впродовж 2 хв при максимальній швидкості (14000-16000 об / хв) для осадження тканини. Аккуратно видаляють супернатант не порушуючи осаду.

1.5 Додають 1мл 70% етанолу на зразок і інкубують протягом 5 хв, перемішують на вортексі. Центрифугують зразок протягом 1-2 хв при максимальній швидкості (14000-16000 об / хв) для осадження тканини. Аккуратно видаляють супернатант не порушуючи осаду. Висушують на повітрі осад протягом 15-30 хв для видалення залишку етанолу.

### 2.7.2 Виділення тотальної РНК.

Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» («ИЗОГЕН», Росія), який містить наступні реагенти: Trizol reagent та ExtraGene E. РНК виділяють відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1.1 В пробірки загальним об'ємом 1,5 мл вносять по 100 мкл подрібненої тканини, що досліджується, додають 1 мл Trizol reagent та інтенсивно перемішують вміст до утворення гомогенної емульсії. Інкубують пробірки при  $t = + 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв.

1.2 Додають в пробірки 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішують вміст пробірок. Пробірки інкубують при  $t = + 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв.

1.3 Центрифугують («СМ-50», Латвія) пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об / хв для розділення фаз. Прозору верхню фазу з РНК обережно переносять в стерильну пробірку загальним об'ємом 1,5 мл намагаючись не задіти пограничну між фазами білу плівку з ДНК та білками.

1.4 Додають в пробірки рівний об'єм ізопропанолу, приблизно 600 мкл.

1.5 Інтенсивно перемішують вміст пробірок та переносять пробірки в морозильну камеру («LG», Корея) при  $t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$  на 30 хв.

1.6 Центрифугують пробірки з сумішшю 15 хв при 14000 об / хв. Повністю видаляють супернатант перевертанням пробірки. Видалення супернатанту відсасуванням пов'язано з ризиком втратити осад РНК.

1.7 Додають в пробірку 1 мл холодного 75% етилового спирту, перемішують вміст пробірки перевертанням 4-5 разів, центрифугують пробірки з сумішшю 5 хв при 14000 об / хв та обережно видаляють супернатант перевертанням пробірки.

1.8 Просушують осад при  $t = + 65\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 3 хв.

1.9 Додають в пробірки 50-100 мкл реагенту ExtraGene E.

1.10 Суспендують вміст на вортексі 15-20 с та залишають при кімнатній температурі на 15-20 хв. Потім ще раз суспендують вміст пробірок на вортексі.

### *2.7.3 Зворотна транскрипція (виділення кДНК)*

Для зворотної транскрипції (синтез кДНК) використовували «Набор реагентов для проведения обратной транскрипции (ОТ)» («СИНТОЛ», Москва). Підготовку та проведення реакції проводили відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1.1 Готують наступну реакційну суміш в пробірці на льоду: тотальна РНК (2 мкл); Random-6 праймер (1 мкл); деіонізована вода очищена від нуклеаз (11 мкл). Загальний об'єм — 14 мкл. Обережно перемішують.

1.2 В пробірку добавляють наступні компоненти в зазначеному порядку: реакційна суміш 2,5х (10 мкл); зворотня транскриптаза MMLV-RT (1 мкл). Загальний об'єм — 25 мкл. Обережно перемішують и центрифугують.

1.3 Інкубують суміш при  $t = + 45\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 45 хв.

1.4 Зупиняють реакцію прогріванням при  $t = + 92\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 5 хв. Переносять пробірки на лід.

#### 2.7.4 Полімеразно-ланцюгова реакція в режимі реального часу.

Для визначення рівня експресії досліджуваних генів проводили ЗТ-ПЛР в реальному часі з використанням набору Maxima SYBR Green / ROX qPCR MasterMix (2x) (Thermo Scientific, США) на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad, США) за таких умов: ініціююча денатурація 95 °C — 10 хв; далі 50 циклів: денатурація — 95 °C, 15 с; віджиг праймерів — 55-64 °C, 30 с; елонгація — 72 °C, 30 с. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично наприкінці стадії елонгації кожного циклу по каналу SybrGreen.

Приготування реакційної суміші проводили відповідно до протоколу набору з виконанням наступних етапів:

1.1 Додають на одну пробірку при кімнатній температурі: 2-кратний Maxima SYBR Green / ROX qPCR Master Mix (2x) — 12,5 мкл; суміш праймерів (прямий і зворотній) по 0,3 мкМ кожного.

1.2 Ретельно перемішують суміш і розподіляють відповідні обсяги в пробірках для ПЛР.

1.3 Додають кДНК ( $\leq 500$  нг / реакція). Об'єм доводять до 25 мкл деіонізованою водою.

1.4 Ретельно перемішують реакційну суміш без утворення бульбашок (не використовувати вортекс). Центрифугують короткочасно, якщо необхідно. Бульбашки будуть заважати детекції флуоресценції.

1.5 Розміщують зразки в ампліфікаторі й запускають програму.

Специфічні пари праймерів для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer-BLAST (НИН, США) та виготовлені фірмою Metabion (Німеччина) (табл. 2.3). В якості референс-гену для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген глицеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH), оскільки для нього показано найменший розкид рівнів транскрипції в нормальних і запалених тканинах кишківника у порівнянні з іншими контрольними генами. Для вираження відносного рівня

експресії генів використовували порівняльний Ct метод ( $\Delta\Delta Ct$  метод) [154]. Розрахунки проводили за формулами:  $\Delta Ct$  (гена-мішені) = Ct (гена-мішені) – Ct (гена-калібратора / АСТ1);  $\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  (гена-мішені) –  $\Delta Ct$  (базисного гена); Відносний рівень експресії виражали в  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Підбрано оптимальні умови ЗТ-ПЛР для досягнення лінійної залежності між числом циклів і кількістю продуктів ПЛР. Всі реакції ампліфікації повторювали три рази.

**Специфічні праймери використані в ЗТ-ПЛР в режимі реального часу**

Ген	Нуклеотидна послідовність праймера	T <sub>пл</sub> , °C	Довжина продукту ПЛР, п. н.	Екзон-екзонний стик
<i>Il-1β</i>	F = CTTTGAAGAAGAGCCCGTCC R = GGTCGTCATCATCCCACGAG	60 60	48	354/ 355
<i>Il-17a</i>	F = CTGGACTCTGAGCCGCAATG R = TGCCTCCCAGATCACAGAAG	61 59	58	297/ 298
<i>C-rel</i>	F = GTCAAGGGAAGGAGCTGTCTG R = GGATTATATCCGCCGAGCCC	60 60	41	64/ 65
<i>Nlrp3</i>	F = AGCTAAGAAGGACCAGCCAG R = GTGCATGCATCATTCCACTC	59 60	40	713/ 714
<i>Hmgb1</i>	F = CGGATGCTTCTGTCAACTTCT R = CACCTCTCTGAGCACTTCTTG	62 62	52	-
<i>Ffar2</i>	F = GGTCCTCTTTTTCGTCCCA R = GCATGATCCATACAAAGCGCC	59 60	65	825/ 826
<i>Gapdh</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 59	52	825/ 826

Примітки:

*Il-1β* — interleukin-1β; *Il-17a* — interleukin-17A; *Nlrp3* — NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; *Hmgb1* — High Mobility Group Box 1 protein; *Ffar2* — free fatty acid receptor-2; *C-rel* — avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog; *Gapdh* — glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; F — прямий праймер; R — зворотний праймер; T<sub>пл</sub> — температура плавлення.



## 2.8 Методи статистичних досліджень

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), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки ( $M$ ), її дисперсії і помилки середньої ( $m$ ). При порівнянні даних використовували параметричний  $t$ -критерій Стюдента 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.

### РОЗДІЛ 3

## РОЗВИТОК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 В КИШКІВНИКУ ЩУРІВ ЛІНІЇ WISTAR У НОРМИ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Порушення регуляції прозапальних цитокінів може призвести до надмірного запалення. IL-1 ініціює безліч імунологічних відповідей, у тому числі лихоманку, синтез простагландинів, активацію Т- і В-клітин, продукцію антитіл і проліферацію фібробластів з виробленням колагену [155]. Експресія IL-1 $\beta$  жорстко регулюється професійними імунними клітинами. Як вважалося раніше, ХК в першу чергу опосередкована Th1-клітинами а НВК — Th2-клітинами, але на сьогодні відомо, що Th17 і пов'язані з ними цитокіни, є найважливішими посередниками при цих захворюваннях. Th17-клітини масивно інфільтрують кишківник пацієнтів зі ЗЗК, де вони секретують IL-17A та інші цитокіни, запускаючи та підсилюючи запальний процес [156]. Рівні про-IL-1 $\beta$  збільшуються у відповідь на активацію TLR ендогенними або екзогенними сигналами небезпеки, і процеси дозрівання активного IL-1 $\beta$  відбуваються в інфламасомі, опосередковано через каспазу-1. Інфламасоми — мультибілкові комплекси, що містять NLRs (NLRP1, NLRP3, NLRC4), адаптерну молекулу ASC і прокаспазу-1 [157]. Прозапальні стимули регулюють експресію цих компонентів. Активація NLRP3 інфламасоми була визначена як важливий механізм патогенезу ЗЗК, і може слугувати потенційною мішенню для створення нових терапевтичних засобів для пацієнтів з цими захворюваннями [158].

Багато інших протеїнів індують вроджений імунітет і запалення, навіть якщо вони не класифіковані як цитокіни. Ці білки, як правило,

розглядаються як молекулярні образи асоційовані з небезпекою (danger-associated molecular patterns, DAMPs) або аларміни. Після виходу з клітини DAMPs, такий як наприклад група білків з високою електрофоретичної рухливістю 1 (High Mobility Group Box 1 protein, HMGB1) може зв'язуватися з декількома PRRs і викликати запалення [159]. Під час інфекції або ушкодження, активуються імунні клітини і пошкоджені клітини вивільняють HMGB1 в позаклітинний простір, де він функціонує як прозапальний медіатор і робить внесок в патогенез запальних захворювань [160].

Генетичні та екологічні фактори, у тому числі коменсальна мікрофлора, також грають роль у розвитку ЗЗК. Ці захворювання подекуди асоційовані з хромосомою 2p16, яка містить *REL*, що кодує c-Rel субодиницю NF-κB. Ненормальна активація фактора транскрипції NF-κB пов'язана з гострим і хронічним запаленням кишківника у щурів і грає ключову роль в регуляції генів цитокінів у пацієнтів з ЗЗК [161, 162].

Коротколанцюгові жирні кислоти (short-chain fatty acids, SCFAs), найбільш численні мікробні метаболіти у кишківнику, активують клітини через рецептор вільних жирних кислот 2 (free fatty acid receptor-2, FFAR2). FFAR2 експресується на високому рівні в імунних клітинах, а результати ряду досліджень показали, що цей рецептор грає роль в ЗЗК [163, 164].

### **3.1 Оцінка розвитку ілеїту та коліту у щурів лінії Wistar, а також оцінка впливу симвастатину й АРІІ-1, які застосовували для фармакологічної корекції**

*3.1.1 Клінічні, макроскопічні та мікроскопічні ознаки гострого ілеїту у щурів лінії Wistar та на фоні введення симвастатину й АРІІ-1.*

Однократне введення індометацину в дозі 15 мг / кг індукує у тварин ілеїт який супроводжується високим індексом активності захворювання (DAI

склав 8,8 балів), а також призводить до загибелі 10% щурів (рис. 3.1). В цілому клінічні прояви ЕГІ досягли максимуму на 4 добу, після чого симптоми поступово знижувалися після 7 доби. Однократне введення індометацину також індукує численні ерозії в тонкій кишці. Вогнища ураження виглядають як поздовжні виразки головним чином на брижовій стороні кишківника з різним ступенем запалення і некрозу, що проявляється у всіх шарах стінки. Також спостерігається помірне потовщення кишківника зі спайками, що легко відокремити одну від одної. Мікроскопічна оцінка показала дефекти ворсинок, вогнищеву десквамацію епітелію, виразкування слизової оболонки і інфільтрацію її запальними клітинами. У районах з ураженням власна пластинка слизової оболонки ворсинок часто багата нейтрофілами, меншим числом лімфоцитами і еозинофілами, які були розкидані переважно на межах ворсинок. Спостерігалися виражений набряк у слизовій та м'язовій оболонках. Крім того, ми спостерігали гіперплазію пейєрових бляшок. Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з ЕГІ призвело до явного зниження балу індексу активності захворювання (DAI складав 4,8 та 4,3 балів відповідно). Аналогічно отриманим результатам зміни індекса активності захворювання, гістологічний аналіз клубової кишки тварин показав значуще зниження балу гістологічного пошкодження на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 (2,9 та 2,4 балів відповідно проти 4,7 балів у щурів з ЕГІ;  $p < 0,05$ ) (див. рис. 3.1).

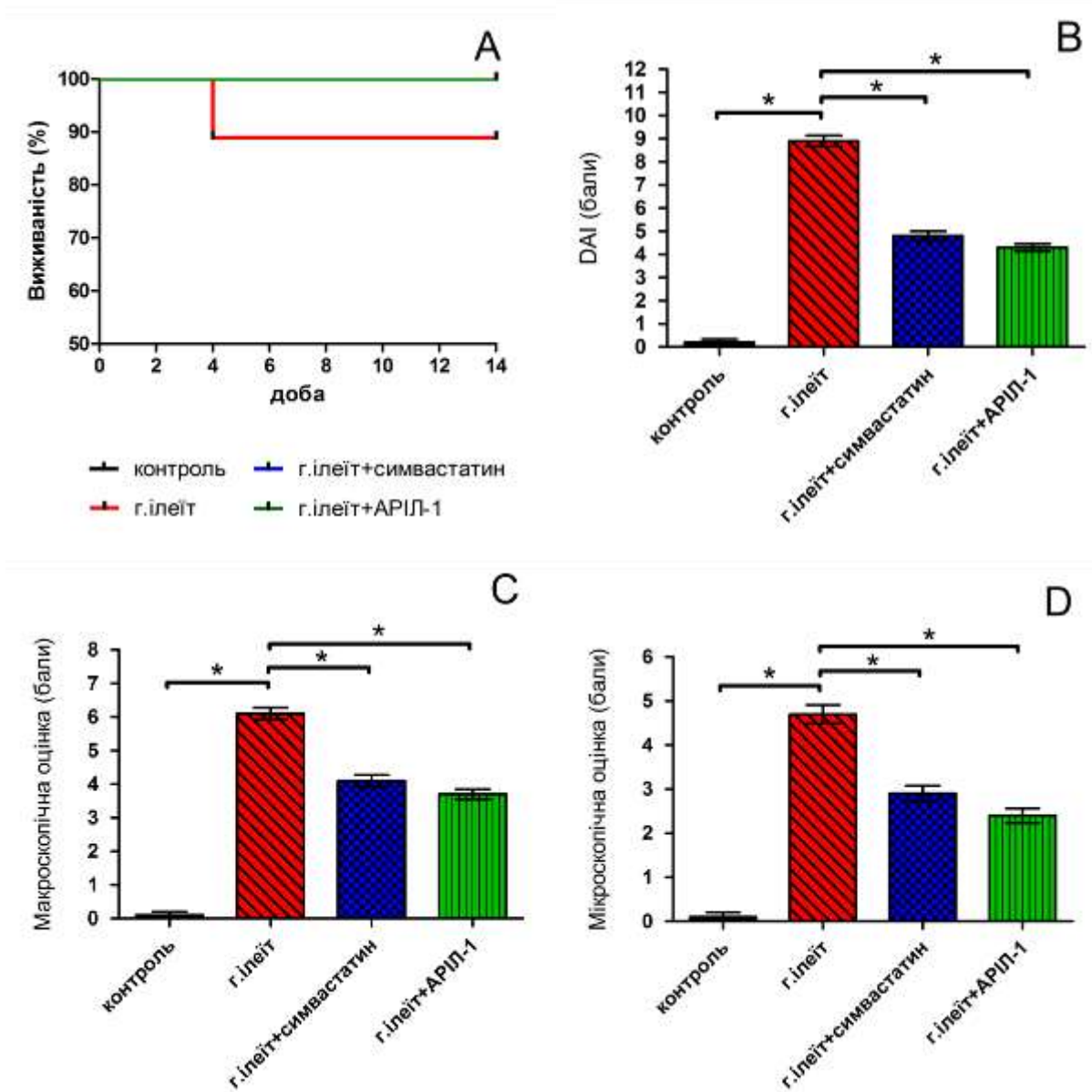


Рис. 3.1 (A-D). Вживаність тварин (A), індекс активності захворювання (B), макроскопічна (C) та мікроскопічна (D) оцінка змін у тонкій кишці при розвитку експериментального гострого ілеїту та після введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

3.1.2 *Клінічні, макроскопічні та мікроскопічні ознаки хронічного ілеїту у щурів лінії Wistar та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

У тварин, яким зробили дві підшкірні ін'єкції індометацину (10 мг / кг з 24-годинним інтервалом) спостерігалась більш тяжка запальна реакція, ніж при ЕГІ. Смертність склала 20% через невеликі перфорації кишківника і перитоніт на 5 добу після другої ін'єкції. У щурів загинувих в задані інтервали, ми спостерігали численні білі вузлики, розташовані на серозній оболонці тонкої кишки (рис. 3.2). Крім того спостерігались множинні виразки на слизовій оболонці брижової частини тонкої кишки. Мікроскопічно, індометацин-індукована основа виразки складається з некротичного матеріалу за участю слизової оболонки, підслизової основи, м'язової оболонки і грануляційної тканини. В останній, важливо що був присутній змішаний мононуклеарний і гранулоцитарний запальний інфільтрат. Слизова оболонка прилегла до виразки мала ненормальну конфігурацію ворсинок з грубим і уривчастим запаленням (рис. 3.3). Всі перераховані параметри досягали максимуму на 5 добу після ін'єкцій, з поступовим спонтанним одужанням аж до повного за 2 тижні. У контрольних щурів яким вводили 5% розчин  $\text{NaHCO}_3$  не розвивається патологія, і вони мали здоровий вигляд. Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з ЕХІ значно покращувало макроскопічні та мікроскопічні ознаки коліту, зменшилась інтенсивність ураження без ознак некрозу, регенерації або запальної реакції (рис. 3.4).



Рис. 3.2 Макроскопічні зміни в тонкій кишці тварин з експериментальним хронічним ілеїтом.



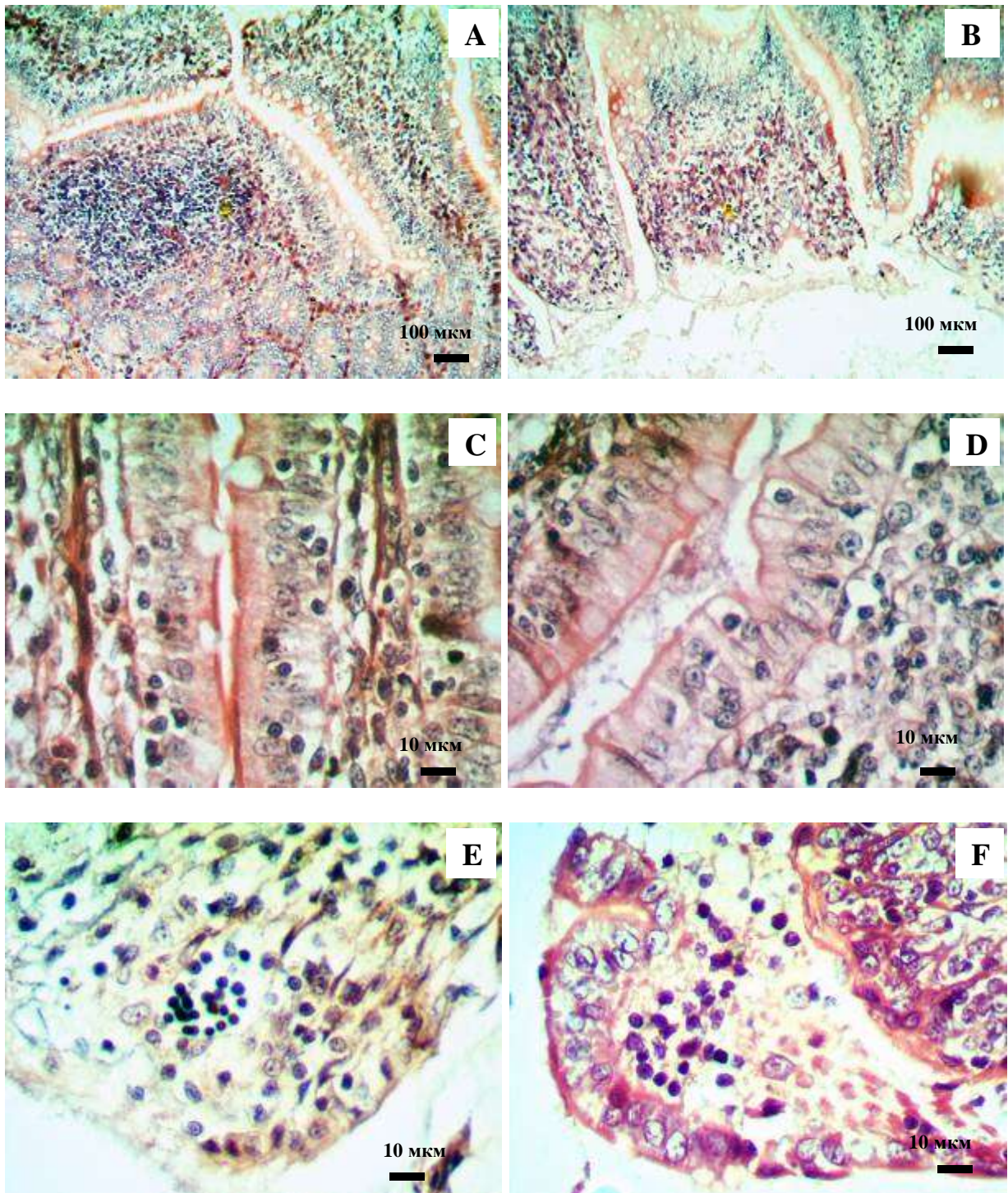


Рис. 3.3 (А-В). Мікроскопічні зміни в клубовій кишці щурів при розвитку експериментального хронічного ілеїту. Формування ізольованих лімфоїдних вузликів (А), вогнищева десквамація епітелію (В), інфільтрація власної пластинки слизової оболонки ворсинок і епітелію лімфоцитами та нейтрофілами (С-В). Фарбування гематоксиліном і еозином. Збільш.  $\times 100$  (А, В),  $\times 400$  (С-В).

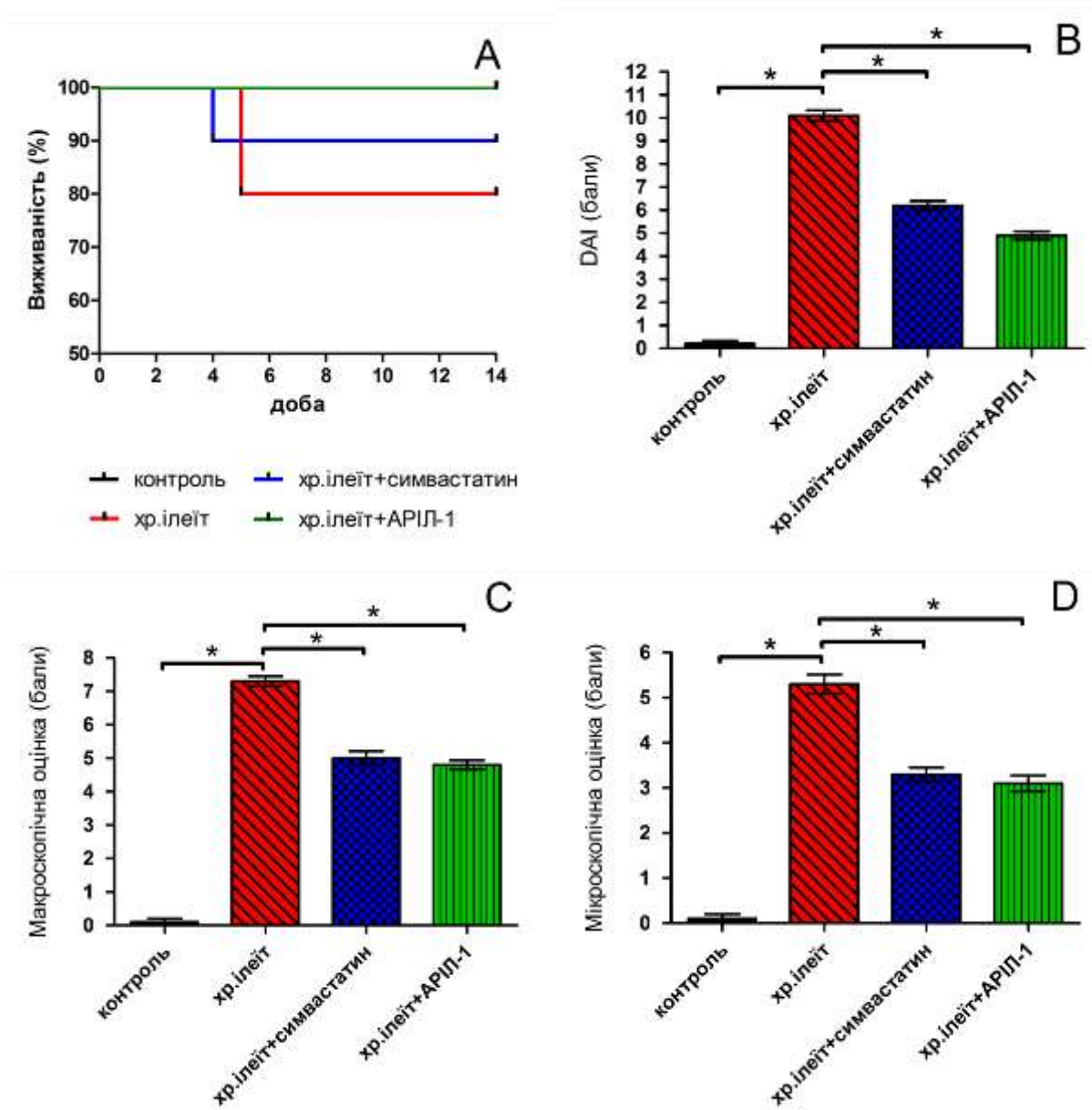


Рис. 3.4 (A-D). Вживаність тварин (A), індекс активності захворювання (B), макроскопічна (C) та мікроскопічна (D) оцінка змін у тонкій кишці при розвитку експериментального хронічного ілеїту та після введень симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$



### 3.1.3 Клінічні, макроскопічні та мікроскопічні ознаки коліту у щурів лінії Wistar та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.

У тварин, яким вводили інтраректально оксазолон швидко розвивається коліт, який супроводжується втратою маси тіла, діареєю і високим DAI, а також призводить до загибелі 40% щурів на 4 день захворювання (DAI складав 9,1 балів) (рис. 3.5). Відповідно до цих спостережень, макроскопічне дослідження показало, що розвиток ЕК охоплює тільки 50% дистального відділу товстої кишки. Крім того, при мікроскопічному дослідженні запалення характеризується наявністю клітинних інфільтратів, які подекуди були трансмуральні, часто пов'язані з укриванням виразками, з епітеліальною гіперплазією, вичерпанням муцину з келихоподібних клітин та зменшення щільності кишкових залоз. У власній пластинці слизової оболонки, спостерігається інфільтрація запальними клітинами, що складається з лімфоцитів і гранулоцитів (останні складаються в основному з нейтрофілів і меншою мірою, еозинофілів). Описані явища свідчили про розвиток коліту. У контрольних щурів яким вводили інтраректально 50% розчин етанолу не розвивається патологія, і вони мають здоровий вигляд. Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з ЕК призвело до значного зниження клінічних параметрів коліту (DAI складав 5,7 та 5,1 балів відповідно). Також введення препаратів значно покращувало макроскопічні та мікроскопічні ознаки ЕК (див. рис. 3.5).

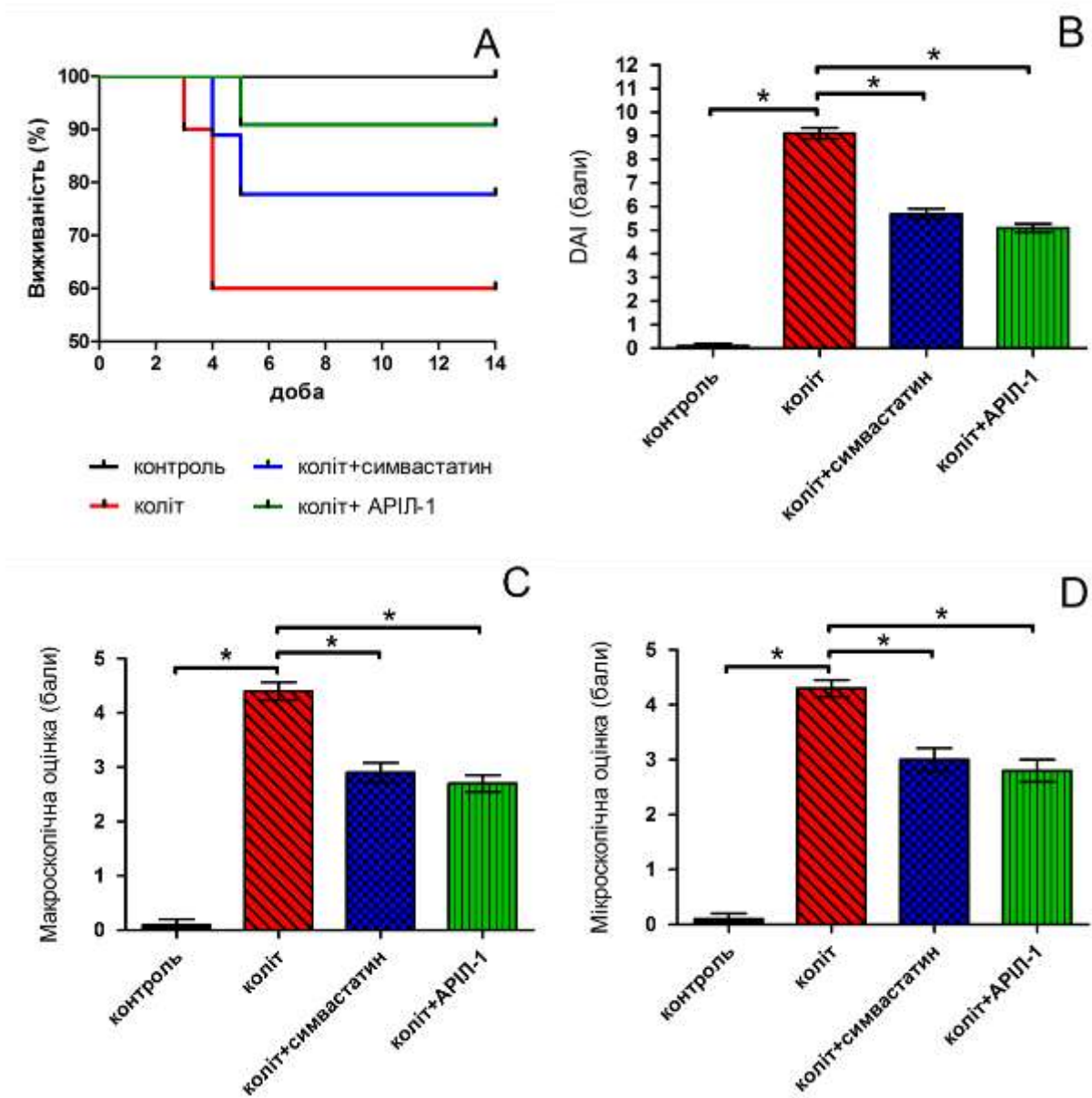


Рис. 3.5 (A-D). Вживаність тварин (A), індекс активності захворювання (B), макроскопічна (C) та мікроскопічна (D) оцінка змін у товстій кишці при розвитку експериментального коліту та після введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам, \*—  $p < 0,05$

### **3.2 Особливості експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 у кишківнику щурів лінії Wistar у нормі та в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та експериментального коліту**

*3.2.1 Рівні експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 у зразках клубової кишки контрольних щурів і тварин з експериментальним гострим та хронічним ілеїтом.*

Аналіз фрагментів клубової кишки щурів показав: по-перше, підвищенні рівні експресії прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і IL-17A в зразках клубової кишки щурів з ЕГІ та ЕХІ. Експресія IL-1 $\beta$  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 (рис. 3.6). Крім того, ми досліджували експресію NLRP3 в цих тканинах. Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 4,3-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії мРНК NLRP3 в клубовій кишці тварин з ЕГІ та 8-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії в клубовій кишці тварин з ЕХІ. Вивчення експресії HMGB1 в зразках клубової кишки щурів з ЕГІ та ЕХІ засвідчило підвищення експресії в 16 і 3 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно в порівнянні з контролем. Рівень експресії FFAR2 також підвищився в 8 і 7 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно. Нарешті, 4,1-кратне та 4,8-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії c-Rel було продемонстровано в клубовій кишці щурів з ЕГІ та ЕХІ (див. рис. 3.6).

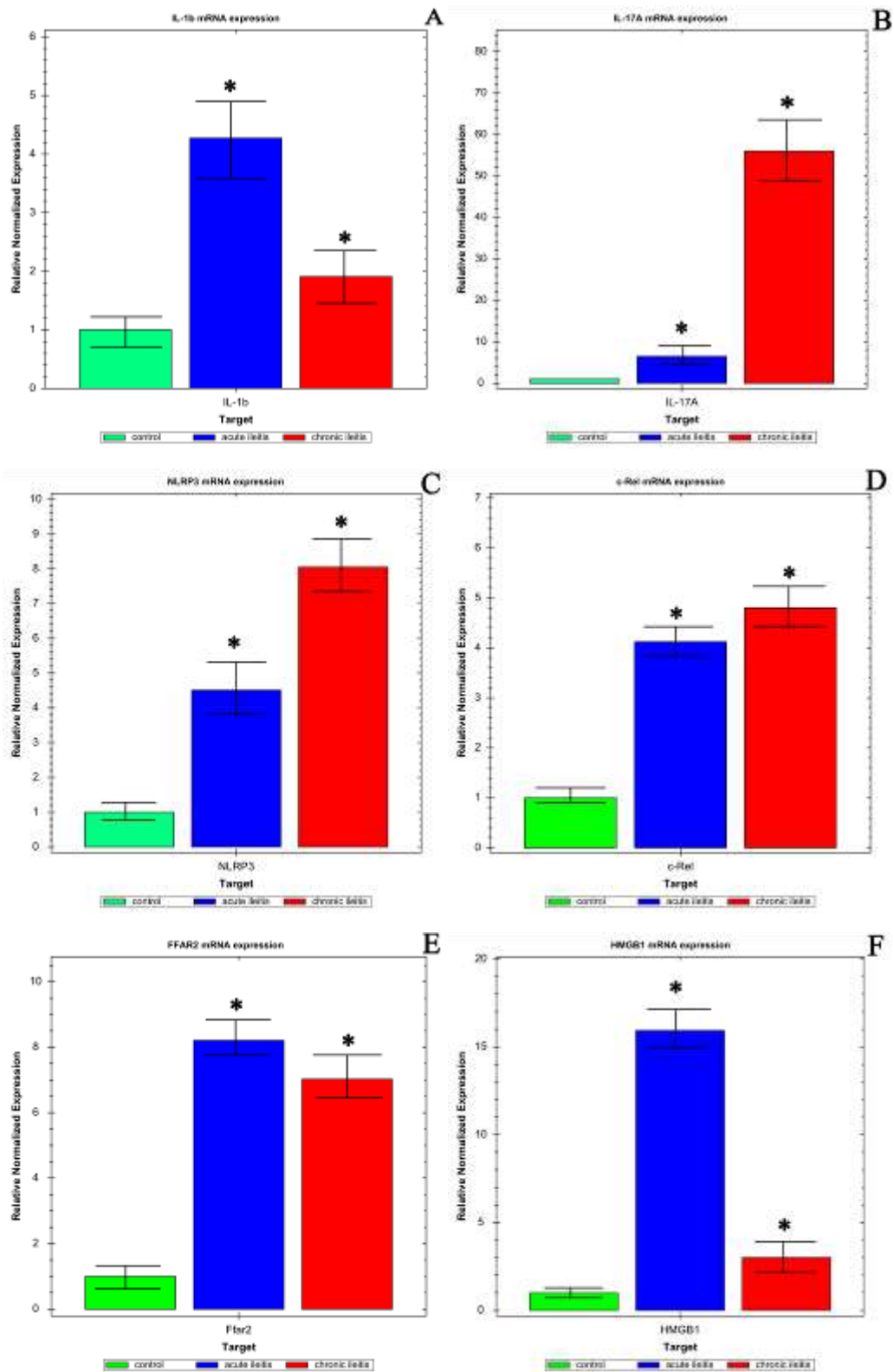


Рис. 3.6 (A-F). Відносний рівень експресії мРНК генів IL-1 $\beta$  (A), IL-17A (B), NLRP3 (C), c-Rel (D), FFAR2 (E), HMGB1 (F) у клубовій кишці щурів з гострим та хронічним ілеїтом у порівнянні з контрольними щурами. В якості референс-гену був використаний ген GAPDH. \* —  $p < 0,05$ .

*3.2.2 Рівні експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 у зразках товстої кишки контрольних щурів і тварин з експериментальним колітом.*

Аналіз фрагментів дистального відділу товстої кишки щурів з ЕК показав: по-перше, збільшені рівні експресії прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і IL-17A. Експресія IL-1 $\beta$  збільшилась в 3,5 рази ( $p < 0,05$ ), IL-17A — в 8 разів ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контролем (рис. 3.7). Крім того, ми досліджували NLRP3 в цих тканинах. Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 71-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії мРНК NLRP3 в дистальному відділу товстої кишки тварин з ЕК. Ми виявили 2,8-кратне ( $p < 0,05$ ) зниження експресії c-Rel в дистальному відділу товстої кишки щурів з ЕК в порівнянні з контрольними щурами. Рівень експресії FFAR2 дещо підвищився (в 1,4 рази ( $p < 0,05$ )). Нарешті, практично не змінився рівень експресії HMGB1 в зразках товстої кишки щурів з ЕК. (див. рис. 3.7).

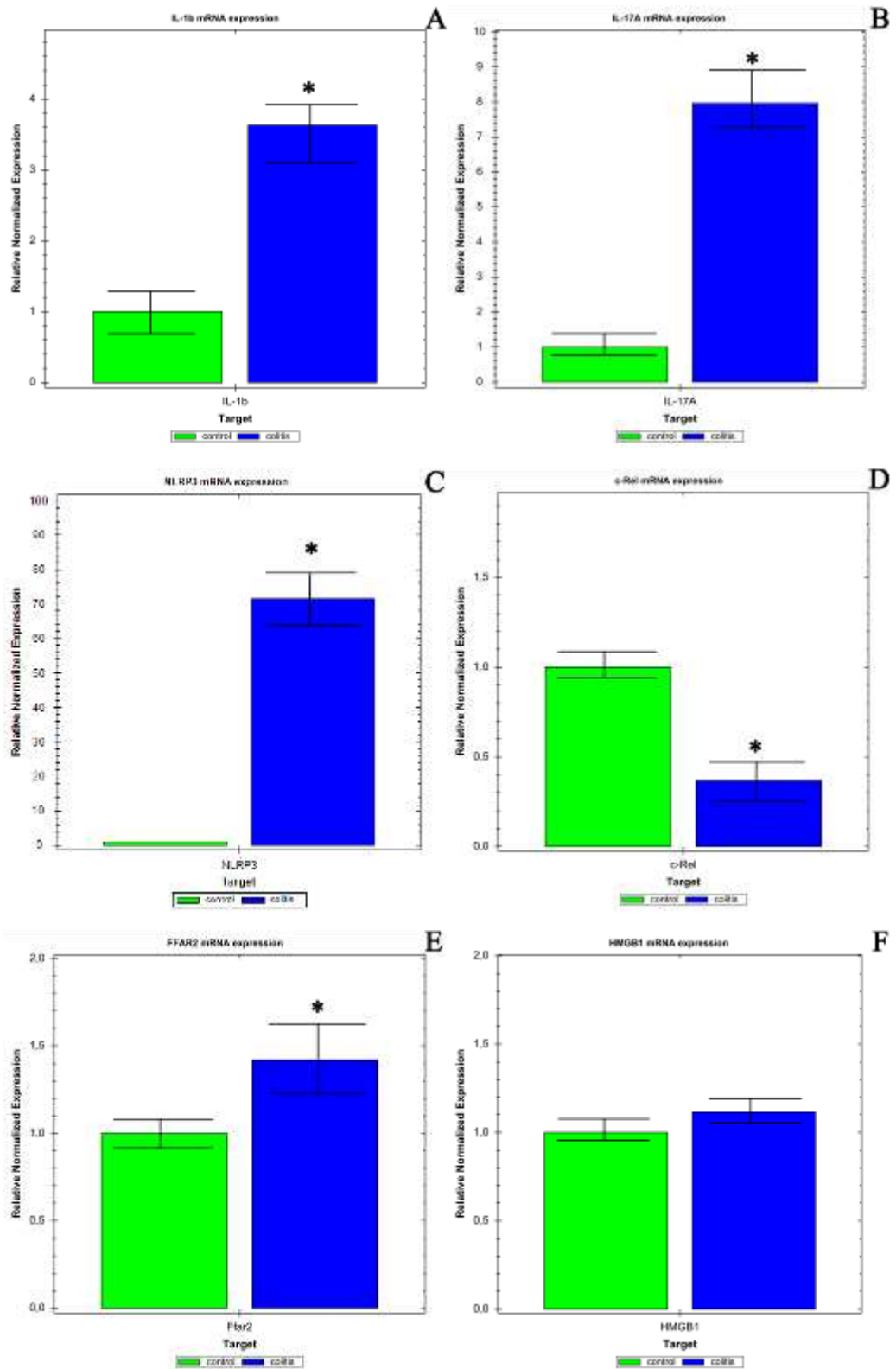


Рис. 3.7 (A-F). Відносний рівень експресії мРНК генів IL-1 $\beta$  (A), IL-17A (B), NLRP3 (C), c-Rel (D), FFAR2 (E), HMGB1 (F) у зразках товстої кишки щурів з колітом у порівнянні з контрольними щурами. В якості референс-гену був використаний ген GAPDH. \* —  $p < 0,05$ .

Таким чином, проведене дослідження розвитку експериментальної патології та характеристика експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 в кишківнику щурів лінії Wistar у нормі та в експериментальних тварин дозволяє зробити наступні проміжні висновки:

1. Розвиток експериментальної патології у щурів супроводжується значними змінами клінічних, макроскопічних та мікроскопічних ознак.

2. Введення симвастатину й APIJ-1 щурам з експериментальною патологією справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки ілеїту й коліту.

3. За силою ефекту симвастатин відрізняється від APIJ-1 який чинить більш виражену дію.

4. Рівні експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3 c-Rel, FFAR2 і HMGB1 були підвищені в зразках клубової кишки щурів з експериментальним ЕПІ та ЕХІ, а також у товстій кишці щурів з ЕК, окрім HMGB1, рівень якого практично не змінився, та c-Rel, рівень якого знизився.

Результати досліджень, наведені в цій главі, опубліковані в наступних роботах:

1. Zhrebiatiev A. S. Expression levels of proinflammatory cytokines and NLRP3 inflammasome in an experimental model of oxazolone-induced colitis / A. S. Zhrebiatiev, A. M. Kamyshnyi // Iran. J. Allergy Asthma Immunol. — 2016. — № 1 (15). P. 39–45.
2. Zhrebiatiev A. S. Free fatty acid receptor-2 activate to promote experimental acute and chronic ileitis in rats / A. S. Zhrebiatiev, 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.
3. Zhrebiatiev A. S. Transcription factor c-rel plays a role in driving experimental acute and chronic ileitis in rats / A. S. Zhrebiatiev, 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.

4. 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.



## РОЗДІЛ 4

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ TLR2, TLR4, NF-κB, NOD2, RIGI У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Накопичено багато даних про те, що рецептори спадкового імунітету специфічно контролюють імунні процеси в організмі і можуть відігравати роль в розвитку ЗЗК. 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 [165]. В цілому, збудження TLR після розпізнавання PAMP призводить до активації у клітині MyD88 та NF-κB, результатом чого є зміна експресії генів прозапальних цитокінів та активація адаптивного імунітету. Функціонально активний NF-κB в значній концентрації знайдено при ЗЗК в поліморфноядерних лейкоцитах, які секретують велику кількість запальних цитокінів [166]. Проте, даних за експресію TLR2, TLR4, та транскрипційного фактору NF-κB у лімфоцитах кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) при ЗЗК майже немає.

Відомо, що порушення експресії RIGI у мишей призводить до серйозних пошкоджень кишківника і запальної інфільтрації в слизовій оболонці кишки [44]. Збільшення експресії RLR в структурах КАЛТ може призводити до надлишкової продукції INF, що в свою чергу, є одним з факторів ризику розвитку ЗЗК. Крім того, зміна рівня експресії RLR може впливати на баланс субпопуляцій Т-хелперів, впливаючи на рівень утворення прозапальних Th17 та Th1-клітин кишківника [167].

Gutierrez et al. за допомогою ПЛР в реальному часі продемонстрував, що NOD2 експресується моноцитами, гранулоцитами, дендритними клітинами і в меншій мірі Т-лімфоцитами [168]. Після виявлення, конститутивної експресії в міелоїдних клітинах дослідники надалі показали, що

мРНК NOD2 і протеїн також експресується епітеліальними клітинами кишківника і активується за допомогою TNF- $\alpha$  та IFN- $\gamma$  [169].

#### **4.1 Особливості експресії TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI в ізольованих лімфодних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та на фоні введення симвастатину й APII-1 експериментальним тваринам**

*4.1.1 Експресія TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕГІ та на фоні введення симвастатину й APII-1.*

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2, показав, що сумарна щільність TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 31 $\pm$ 1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 29% більше, ніж в ІЛВ. Серед TLR2<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали TLR2<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції ВПСОВ були TLR2<sup>+</sup>-середні лімфоцити, в ІЛВ — TLR2<sup>+</sup>-лімфобласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 19% (p<0,05) і в ІЛВ на 92% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 11% (p<0,05), і в ІЛВ на 26% (p<0,05) у порівнянні з ЕГІ. При введенні APII-1 цей показник у ВПСОВ ще більше зменшився — на 24% (p<0,05), проте в ІЛВ він навпаки збільшився на 35% (p<0,05) (рис. 4.1).

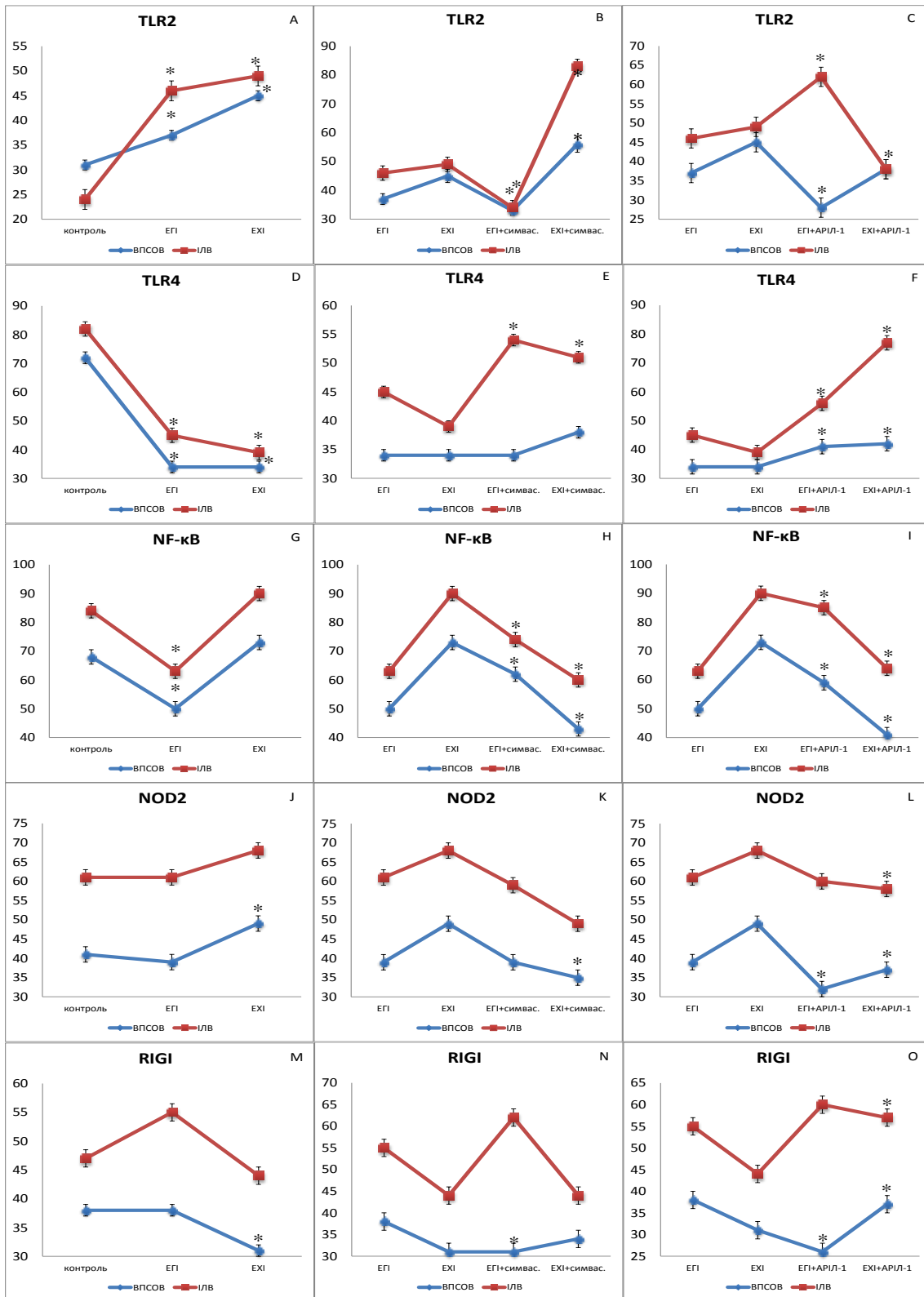


Рис. 4.1 (А-О). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого (ЕГ1) та хронічного ілеїту (ЕХ1) (А, D, G, J, М) та після введення симвастатину (В, Е, Н, К, N) й АРІЛ-1 (С, F, I, L, O) експериментальним тваринам,\*— p < 0,05

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR2<sup>+</sup>-клітин при розвитку ЕГІ засвідчило збільшення щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів в ІЛВ в 3 рази ( $p < 0,05$ ), TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСОВ на 50% ( $p < 0,05$ ) та в ІЛВ на 63% ( $p < 0,05$ ), TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 25% ( $p < 0,05$ ) та в ІЛВ на 75% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів, в ІЛВ TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: збільшенням щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,1 рази і на 42% ( $p < 0,05$ ), проте зменшилась щільність популяції TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 44% і в 2,6 рази ( $p < 0,05$ ), і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,2 рази і 43% ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх досліджуваних класів лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: збільшенням щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,1 рази і на 42% ( $p < 0,05$ ), проте зменшилась щільність популяції TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 44% та в 2,6 рази ( $p < 0,05$ ), і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,2 рази і на 43% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів, в ІЛВ TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (табл. 4.1, табл. 4.2).

Таблиця 4.1

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів  
(M ± m)**

Рецептор	Серія		Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
	Клас клітин								
<b>TLR2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{8 \pm 1}{27,5 \pm 1,7\%}$	$\frac{9 \pm 1}{23,9 \pm 1,4\%}$	$\frac{19 \pm 1^1}{41,9 \pm 3,3\%^1}$	$\frac{19 \pm 1^2}{57,3 \pm 2,5\%^2}$	$\frac{25 \pm 1^3}{43,6 \pm 2,2\%}$	$\frac{10 \pm 1}{36,1 \pm 2,8\%^2}$	$\frac{13 \pm 1^3}{33,9 \pm 3,5\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{6 \pm 1}{18,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{23,3 \pm 1,3\%^1}$	$\frac{7 \pm 1}{15,4 \pm 2,0\%}$	$\frac{5 \pm 1^2}{14,1 \pm 1,5\%^2}$	$\frac{9 \pm 1}{15,6 \pm 1,2\%}$	$\frac{7 \pm 1}{25,7 \pm 3,2\%}$	$\frac{8 \pm 1}{20,0 \pm 3,0\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{53,6 \pm 3,3\%}$	$\frac{20 \pm 1^1}{52,8 \pm 2,3\%}$	$\frac{19 \pm 2}{42,7 \pm 3,5\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^2}{28,6 \pm 2,5\%^2}$	$\frac{23 \pm 2}{40,8 \pm 3,2\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{38,2 \pm 3,6\%^2}$	$\frac{18 \pm 2}{46,1 \pm 5,8\%}$	
<b>TLR4</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 1}{34,8 \pm 1,6\%}$	$\frac{18 \pm 1^1}{52,8 \pm 3,2\%^1}$	$\frac{14 \pm 1^1}{44,1 \pm 2,2\%^1}$	$\frac{11 \pm 1^2}{32,8 \pm 3,4\%^2}$	$\frac{13 \pm 1}{33,3 \pm 3,0\%^3}$	$\frac{17 \pm 1}{42,4 \pm 2,6\%^2}$	$\frac{12 \pm 1^3}{29,8 \pm 2,3\%^3}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{14 \pm 1}{19,9 \pm 1,1\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{21,0 \pm 2,0\%}$	$\frac{5 \pm 1^1}{15,4 \pm 1,3\%^1}$	$\frac{6 \pm 1}{19,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{7 \pm 1}{18,4 \pm 2,3\%}$	$\frac{9 \pm 1}{21,8 \pm 2,0\%}$	$\frac{9 \pm 1^3}{20,7 \pm 2,2\%^3}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{33 \pm 2}{45,3 \pm 3,2\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{26,1 \pm 2,5\%^1}$	$\frac{14 \pm 2^1}{40,5 \pm 3,0\%}$	$\frac{16 \pm 2^2}{47,9 \pm 4,5\%^2}$	$\frac{18 \pm 2^3}{48,2 \pm 5,1\%}$	$\frac{15 \pm 2^2}{35,8 \pm 4,0\%^2}$	$\frac{21 \pm 2^3}{49,5 \pm 5,1\%}$	
<b>NF-κB</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{29 \pm 1}{42,4 \pm 1,7\%}$	$\frac{24 \pm 1^1}{47,3 \pm 1,7\%^1}$	$\frac{30 \pm 1}{41,3 \pm 1,3\%}$	$\frac{25 \pm 1}{40,0 \pm 1,8\%^2}$	$\frac{19 \pm 1^3}{43,7 \pm 2,5\%}$	$\frac{22 \pm 1}{37,6 \pm 2,2\%^2}$	$\frac{13 \pm 1^3}{32,0 \pm 1,7\%^3}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{13,2 \pm 0,9\%}$	$\frac{7 \pm 1}{14,5 \pm 1,3\%}$	$\frac{10 \pm 1}{13,3 \pm 1,0\%}$	$\frac{9 \pm 1}{14,0 \pm 1,2\%}$	$\frac{6 \pm 1^3}{14,9 \pm 1,6\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{16,9 \pm 1,3\%}$	$\frac{8 \pm 1}{20,0 \pm 1,6\%^3}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{30 \pm 2}{44,3 \pm 2,6\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{37,7 \pm 3,4\%}$	$\frac{33 \pm 2}{45,4 \pm 2,9\%}$	$\frac{29 \pm 2^2}{46,0 \pm 3,0\%}$	$\frac{18 \pm 2^3}{41,4 \pm 3,9\%}$	$\frac{27 \pm 2^2}{45,5 \pm 3,1\%}$	$\frac{20 \pm 2^3}{47,9 \pm 3,5\%}$	

Продовження табл. 4.1

Рецептор	Серія Клас клітин	Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
<b>NOD2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{21 \pm 2}{50,4 \pm 3,7\%}$	$\frac{22 \pm 1}{56,0 \pm 3,4\%}$	$\frac{26 \pm 2^1}{54,0 \pm 3,4\%}$	$\frac{18 \pm 2}{47,0 \pm 4,0\%}$	$\frac{11 \pm 1^3}{32,0 \pm 3,2\%^3}$	$\frac{15 \pm 1^2}{45,6 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{14 \pm 1^3}{36,9 \pm 3,5\%^3}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{6 \pm 1}{14,1 \pm 2,1\%}$	$\frac{6 \pm 1}{15,9 \pm 2,1\%}$	$\frac{5 \pm 1}{11,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{7 \pm 1}{17,1 \pm 2,1\%}$	$\frac{6 \pm 1}{18,8 \pm 2,3\%^3}$	$\frac{9 \pm 1^2}{28,8 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{9 \pm 1^3}{23,5 \pm 3,2\%^3}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{35,6 \pm 3,1\%}$	$\frac{11 \pm 1}{28,1 \pm 3,4\%}$	$\frac{17 \pm 2}{34,9 \pm 3,6\%}$	$\frac{14 \pm 2}{35,9 \pm 4,2\%}$	$\frac{17 \pm 2}{49,7 \pm 4,3\%^3}$	$\frac{8 \pm 1}{25,6 \pm 3,1\%}$	$\frac{15 \pm 2}{39,6 \pm 5,3\%}$
<b>RIGI</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{17 \pm 2}{43,4 \pm 4,6\%}$	$\frac{23 \pm 1^1}{60,1 \pm 3,3\%^1}$	$\frac{16 \pm 1}{53,3 \pm 3,6\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{35,5 \pm 4,3\%^2}$	$\frac{13 \pm 1}{38,5 \pm 3,8\%^3}$	$\frac{7 \pm 1^2}{28,0 \pm 3,0\%^2}$	$\frac{15 \pm 1}{45,0 \pm 3,8\%^3}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{6 \pm 1}{15,4 \pm 2,4\%}$	$\frac{5 \pm 1}{12,3 \pm 2,2\%}$	$\frac{5 \pm 1}{16,3 \pm 2,7\%}$	$\frac{6 \pm 1}{19,8 \pm 2,9\%^2}$	$\frac{6 \pm 1}{17,6 \pm 2,6\%}$	$\frac{7 \pm 1}{26,0 \pm 3,2\%^2}$	$\frac{5 \pm 1}{14,0 \pm 3,0\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 2}{41,2 \pm 4,2\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{27,6 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^1}{30,4 \pm 3,6\%}$	$\frac{13 \pm 2}{44,7 \pm 5,6\%^2}$	$\frac{15 \pm 1^3}{43,9 \pm 4,1\%^3}$	$\frac{12 \pm 2}{46,0 \pm 7,9\%^2}$	$\frac{17 \pm 2^3}{45,6 \pm 7,0\%}$

Примітки:

1. В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів.

2. (1) — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно контролю.

3. (2) — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно гострого ілеїту.

4. (3) — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно хронічного ілеїту.

Таблиця 4.2

Кількість імунопозитивних лімфоцитів в ізольованих лімфатичних вузликах клубової кишки щурів ( $M \pm m$ )

Рецептор	Серія		Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
	Клас клітин								
TLR2	лімфобласти	$\frac{4 \pm 0}{16,4 \pm 1,5\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{26,3 \pm 1,8\%^1}$	$\frac{20 \pm 2^1}{40,4 \pm 3,1\%^1}$	$\frac{17 \pm 1^2}{49,7 \pm 2,6\%^2}$	$\frac{35 \pm 2^3}{41,9 \pm 2,3\%}$	$\frac{23 \pm 2^2}{36,4 \pm 2,9\%^2}$	$\frac{11 \pm 1^3}{27,7 \pm 2,2\%^3}$	
	середні лімфоцити	$\frac{8 \pm 0}{35,0 \pm 1,8\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{28,5 \pm 1,6\%^1}$	$\frac{10 \pm 1}{21,3 \pm 2,6\%^1}$	$\frac{5 \pm 1^2}{15,2 \pm 1,6\%^2}$	$\frac{14 \pm 1^3}{16,9 \pm 1,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{17,8 \pm 1,9\%^2}$	$\frac{8 \pm 1}{20,8 \pm 1,5\%}$	
	малі лімфоцити	$\frac{12 \pm 1}{48,5 \pm 2,7\%}$	$\frac{21 \pm 1^1}{45,2 \pm 3,0\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{38,2 \pm 3,4\%^1}$	$\frac{12 \pm 1^2}{35,1 \pm 2,9\%^2}$	$\frac{34 \pm 2^3}{41,2 \pm 2,9\%}$	$\frac{28 \pm 3^2}{45,7 \pm 5,6\%}$	$\frac{20 \pm 2}{51,4 \pm 2,9\%^3}$	
TLR4	лімфобласти	$\frac{28 \pm 1}{33,7 \pm 1,4\%}$	$\frac{19 \pm 1^1}{41,3 \pm 2,2\%^1}$	$\frac{13 \pm 1^1}{33,6 \pm 3,2\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{25,9 \pm 2,4\%^2}$	$\frac{16 \pm 2}{30,6 \pm 3,6\%}$	$\frac{17 \pm 1}{30,7 \pm 2,5\%^2}$	$\frac{18 \pm 1^3}{23,0 \pm 2,3\%^3}$	
	середні лімфоцити	$\frac{16 \pm 1}{19,6 \pm 1,1\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{20,0 \pm 1,5\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{18,6 \pm 1,6\%}$	$\frac{10 \pm 1}{18,6 \pm 2,0\%}$	$\frac{8 \pm 1}{16,3 \pm 2,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{20,1 \pm 2,1\%}$	$\frac{14 \pm 1^3}{18,2 \pm 2,0\%}$	
	малі лімфоцити	$\frac{38 \pm 3}{46,7 \pm 3,2\%}$	$\frac{17 \pm 1^1}{38,6 \pm 3,1\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{48,0 \pm 3,9\%}$	$\frac{30 \pm 2^2}{55,5 \pm 4,0\%^2}$	$\frac{27 \pm 3^3}{53,1 \pm 6,2\%}$	$\frac{28 \pm 3^2}{49,2 \pm 6,0\%}$	$\frac{45 \pm 4^3}{58,8 \pm 6,4\%}$	
NF-κB	лімфобласти	$\frac{38 \pm 2}{45,3 \pm 2,3\%}$	$\frac{29 \pm 1^1}{46,5 \pm 2,4\%}$	$\frac{40 \pm 2}{45,2 \pm 1,7\%}$	$\frac{29 \pm 2}{39,0 \pm 2,0\%^2}$	$\frac{27 \pm 2^3}{44,2 \pm 2,7\%}$	$\frac{30 \pm 2}{35,0 \pm 2,1\%^2}$	$\frac{19 \pm 2^3}{30,0 \pm 2,0\%^3}$	
	середні лімфоцити	$\frac{12 \pm 1}{14,8 \pm 1,2\%}$	$\frac{8 \pm 1^1}{14,1 \pm 1,4\%}$	$\frac{13 \pm 1}{14,7 \pm 1,2\%}$	$\frac{11 \pm 1}{14,6 \pm 1,6\%}$	$\frac{9 \pm 1^3}{14,4 \pm 1,4\%}$	$\frac{18 \pm 1^2}{21,8 \pm 1,6\%^2}$	$\frac{13 \pm 1}{19,5 \pm 1,7\%^3}$	
	малі лімфоцити	$\frac{33 \pm 3}{40,0 \pm 3,2\%}$	$\frac{25 \pm 2^1}{39,4 \pm 3,4\%}$	$\frac{36 \pm 3}{40,0 \pm 3,3\%}$	$\frac{35 \pm 2^2}{46,4 \pm 3,1\%}$	$\frac{25 \pm 2^3}{41,3 \pm 4,0\%}$	$\frac{37 \pm 3^2}{43,3 \pm 3,1\%}$	$\frac{33 \pm 3}{50,5 \pm 3,0\%^3}$	

Продовження табл. 4.2

Рецептор	Серія Клас клітин	Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
<b>NOD2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{30 \pm 3}{48,6 \pm 4,2\%}$	$\frac{34 \pm 2}{54,6 \pm 3,6\%}$	$\frac{38 \pm 2^1}{55,2 \pm 3,0\%}$	$\frac{23 \pm 2^2}{38,6 \pm 3,9\%^2}$	$\frac{19 \pm 2^3}{38,1 \pm 4,4\%^3}$	$\frac{23 \pm 2^2}{39,2 \pm 2,9\%^2}$	$\frac{19 \pm 2^3}{32,9 \pm 3,1\%^3}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{15,0 \pm 1,6\%}$	$\frac{9 \pm 1}{14,7 \pm 1,7\%}$	$\frac{7 \pm 1}{11,0 \pm 1,5\%}$	$\frac{9 \pm 1}{15,5 \pm 1,9\%}$	$\frac{9 \pm 1}{18,0 \pm 2,1\%^3}$	$\frac{15 \pm 1^2}{25,4 \pm 2,5\%^2}$	$\frac{14 \pm 1^3}{24,2 \pm 2,1\%^3}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{22 \pm 2}{36,4 \pm 3,2\%}$	$\frac{19 \pm 2}{30,7 \pm 2,9\%}$	$\frac{23 \pm 2}{33,8 \pm 3,6\%}$	$\frac{27 \pm 2^2}{45,9 \pm 4,2\%^2}$	$\frac{21 \pm 2^3}{44,0 \pm 3,5\%}$	$\frac{21 \pm 2}{35,4 \pm 3,5\%}$	$\frac{25 \pm 2}{43,0 \pm 3,8\%}$
<b>RIGI</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{18 \pm 2}{38,8 \pm 5,0\%}$	$\frac{27 \pm 2^1}{49,2 \pm 3,2\%}$	$\frac{24 \pm 1^1}{55,0 \pm 3,4\%^1}$	$\frac{23 \pm 2}{36,4 \pm 3,6\%^2}$	$\frac{14 \pm 2^3}{32,1 \pm 3,7\%^3}$	$\frac{25 \pm 2}{41,7 \pm 3,7\%}$	$\frac{20 \pm 1}{34,8 \pm 2,4\%^3}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{18,7 \pm 2,0\%}$	$\frac{12 \pm 1}{21,2 \pm 2,6\%}$	$\frac{7 \pm 1}{16,1 \pm 2,3\%}$	$\frac{11 \pm 1}{18,3 \pm 2,0\%}$	$\frac{9 \pm 1}{21,1 \pm 3,7\%}$	$\frac{13 \pm 1}{21,2 \pm 2,0\%}$	$\frac{10 \pm 1^3}{18,2 \pm 1,6\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{20 \pm 2}{42,5 \pm 3,6\%}$	$\frac{16 \pm 1}{29,6 \pm 2,7\%^1}$	$\frac{13 \pm 2^1}{29,0 \pm 3,6\%^1}$	$\frac{28 \pm 2^2}{45,3 \pm 3,7\%^2}$	$\frac{21 \pm 2^3}{46,8 \pm 3,5\%^3}$	$\frac{22 \pm 2^2}{37,2 \pm 3,4\%}$	$\frac{27 \pm 2^3}{47,0 \pm 3,6\%^3}$

Примітки:

1. В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів.

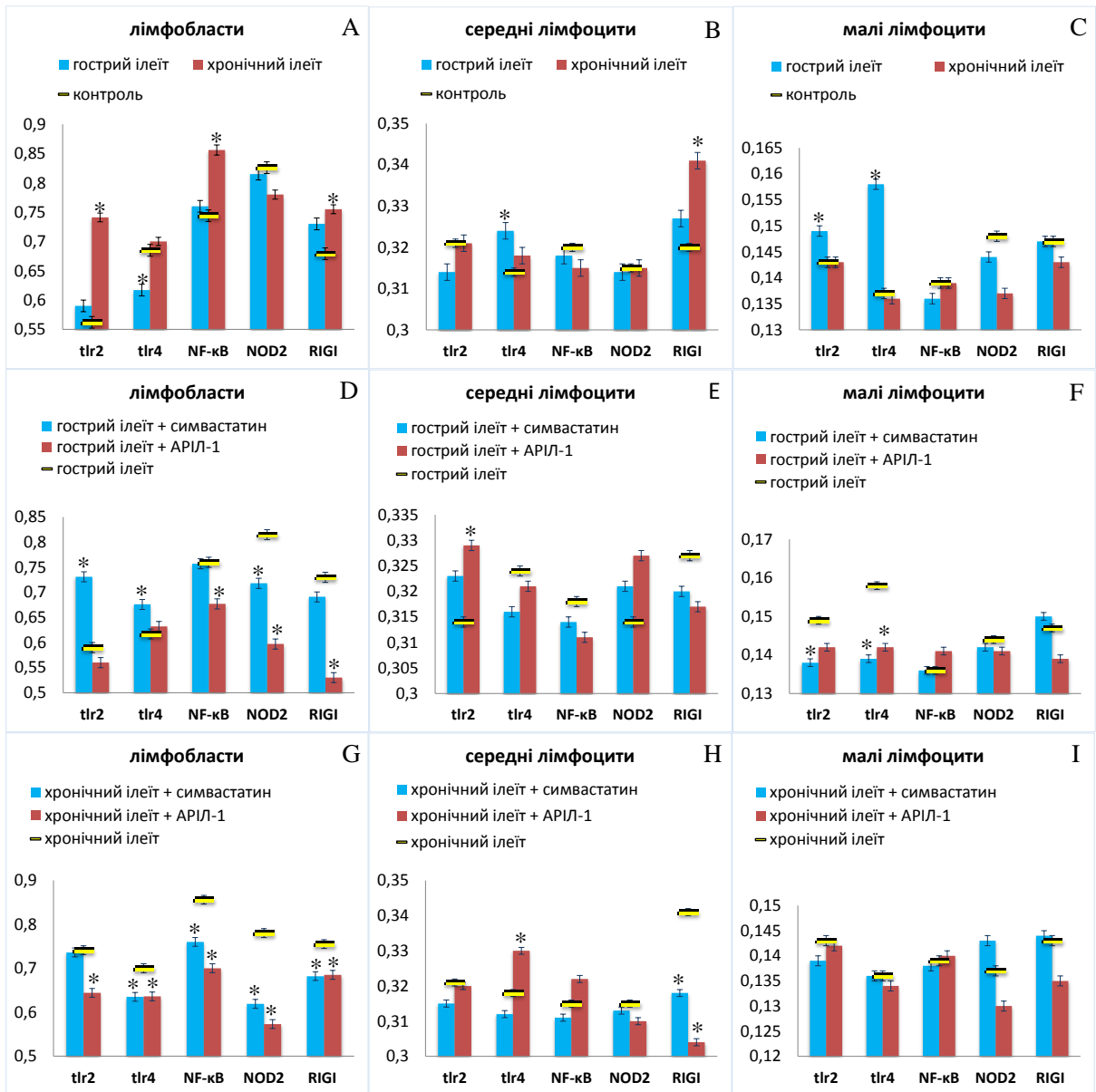
2. (1) — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно контролю.

3. (2) — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно гострого ілеїту.

4. (3) — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно хронічного ілеїту.



Вивчення щільності TLR2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитах ВПСОВ у порівнянні з контролем, тоді як в ІЛВ спостерігалася різноспрямована тенденція по збільшенню щільності TLR2 в лімфобластах і зменшенню в малих лімфоцитах. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності TLR2 в лімфобластах і зменшенням в малих лімфоцитах в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІІ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності TLR2 у середніх лімфоцитах ВПСОВ та малих лімфоцитах ІЛВ у порівнянні з ЕГІ (рис. 4.2, рис. 4.3).



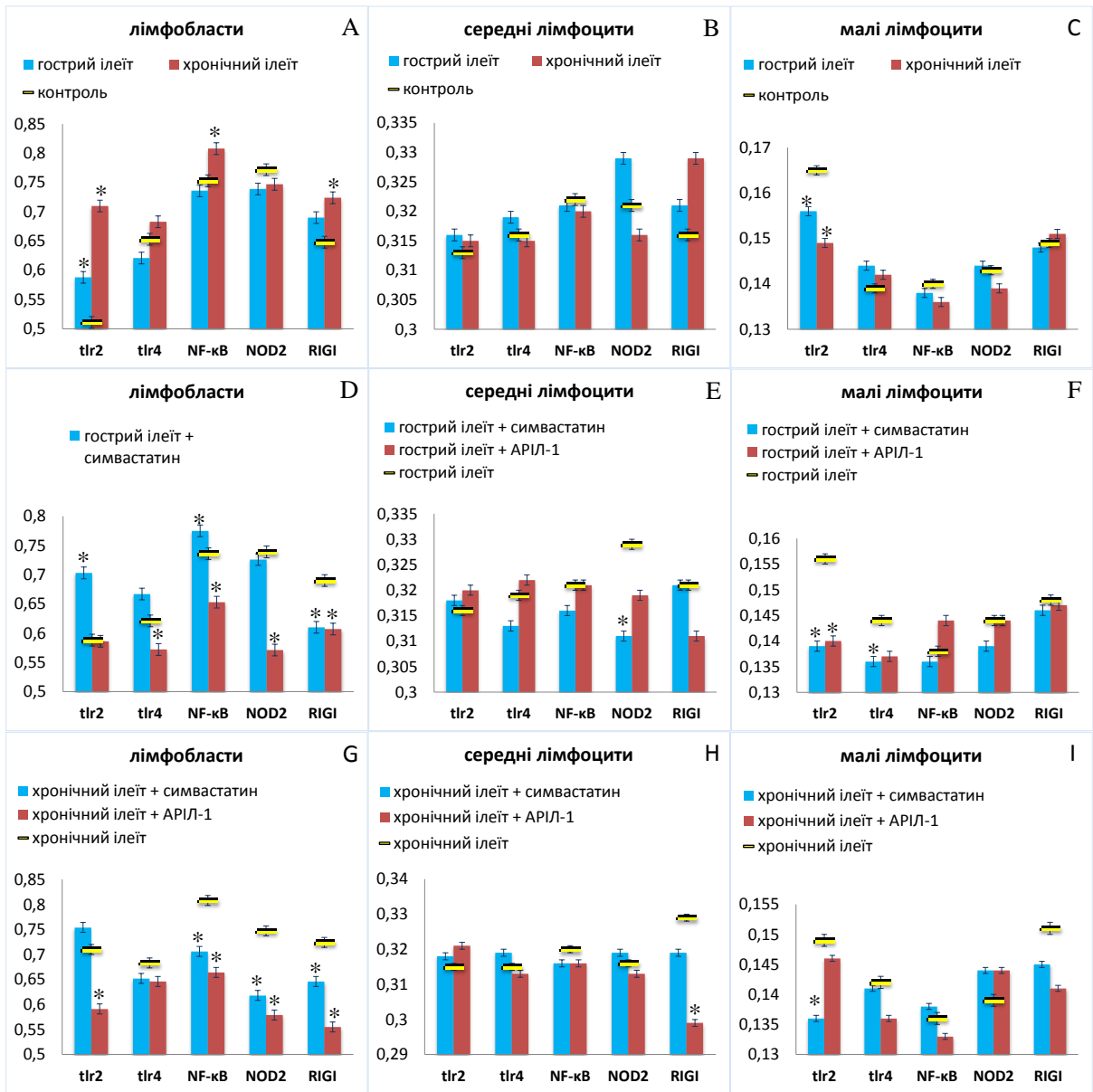


Рис. 4.3 (А-І). Щільність рецепторів ( $Y_{01Ф}$ ) у лімфоцитах ІЛВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого та хронічного ілеїту (А, В, С) та після введення симвастатину й АРІЛ-1 (D, E, F, G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4, показав, що сумарна щільність TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила  $72 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 14% менше, ніж в ІЛВ. Серед TLR4<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали TLR4<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції ВПСОВ та ІЛВ були TLR4<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ в 2 рази ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 45% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 11% ( $p < 0,05$ ) і збільшенням в ІЛВ на 20% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ збільшився на 21% ( $p < 0,05$ ), в ІЛВ на 24% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR4<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 28% ( $p < 0,05$ ) та в ІЛВ на 32% ( $p < 0,05$ ), TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСОВ в 2 рази ( $p < 0,05$ ) та в ІЛВ на 44% ( $p < 0,05$ ), TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ в 3,6 разів ( $p < 0,05$ ) та в ІЛВ в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів та TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів, в ІЛВ тільки TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: зменшенням щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів на 39% і 26% ( $p < 0,05$ ) відповідно, проте збільшилась щільність популяції TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 78% на 76% ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігалось зменшення відсоткової долі лімфобластів і збільшення малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ

супроводжувалось збільшенням щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: на 67% і 65% ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів, в ІЛВ тільки TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності TLR4 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в середніх та малих лімфоцитах і зменшенням у лімфобластах ВПСОВ. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 у малих лімфоцитах обох морфофункціональних зон. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 у малих лімфоцитах ВПСОВ та лімфобластах ІЛВ у порівнянні з ЕГІ (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NF-κB, показав, що сумарна щільність NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила  $68 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 24% менше, ніж в ІЛВ. Серед NF-κB<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали NF-κB<sup>+</sup>-лімфобласти та NF-κB<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько 80% від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені були NF-κB<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 26% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 25% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 24% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 17% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ збільшився на 18% ( $p < 0,05$ ), в ІЛВ на 35% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NF-κB<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 17% (p<0,05) і в ІЛВ на 24% (p<0,05), NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ на 33% (p<0,05), NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 37% (p<0,05) і в ІЛВ на 24% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: збільшенням щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 53% і 40% (p<0,05) відповідно. У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігалось зменшення відсоткової долі лімфобластів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: на 43% і в 2,3 рази (p<0,05), та NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 42% і 48% (p<0,05) відповідно. У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Т NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів, в ІЛВ NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів і NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції NF-κB<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію NF-κB в клітині засвідчило, що розвиток ЕГІ не супроводжувався зміною даного показника в лімфоцитах. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації NF-κB в лімфобластах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації NF-κB в лімфобластах в обох морфофункціональних зонах (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NOD2, показав, що сумарна щільність NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 41±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 48% більше, ніж в ІЛВ. Серед NOD2<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали NOD2<sup>+</sup>-лімфобласти, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як

найменше представлені у структурі популяції були NOD2<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ не супроводжувався вірогідними змінами сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ також не супроводжувалось вірогідними змінами сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 18% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NOD2<sup>+</sup>-клітин засвідчило що введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зміною щільності популяції в ІЛВ клубової кишки: зменшенням щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів на 32% ( $p < 0,05$ ), проте збільшилась щільність популяції NOD2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 42% ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів та малих лімфоцитів в ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: зменшенням щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів на 17% і 32% ( $p < 0,05$ ), проте збільшилась щільність популяції NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 29% і 67% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів і NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності NOD2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності NOD2 в лімфобластах ВПСОВ і середніх лімфоцитах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності NOD2 в лімфобластах обох морфофункціональних зон (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до RIGI, показав, що сумарна щільність

RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила  $38 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 24% менше, ніж в ІЛВ. Серед RIGI<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали RIGI<sup>+</sup>-лімфобласти і RIGI<sup>+</sup>-малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були RIGI<sup>+</sup>-малі лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ не супроводжувався змінами сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 21% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ ще більше зменшився — на 32% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції RIGI<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ і ІЛВ на 35% і 50% ( $p < 0,05$ ) відповідно, та зменшення RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 31% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів і RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів, в ІЛВ — RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), проте збільшилась щільність популяції RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 75% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх досліджуваних класів лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів ВПСОВ в 3,3 рази ( $p < 0,05$ ), проте збільшилась щільність популяції RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 38% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ. У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів, середніх і малих лімфоцитів (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності RIGI рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності RIGI у лімфобластах ІЛВ. Введення АРІЛ-



1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності RIGI у лімфоцитах обох морфофункціональних зон (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

4.1.2 *Експресія TLR2, TLR4, NF-κB, NOD2, RIGI в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕХІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 45% (p<0,05) і в ІЛВ в 2 рази (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 24% (p<0,05), і в ІЛВ на 69% (p<0,05) у порівнянні з ЕХІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився лише в ІЛВ на 22% (p<0,05) (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR2<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ в 2,4 рази (p<0,05) та в ІЛВ в 5 разів (p<0,05), TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ на 58% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів, в ІЛВ TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів, TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 32% (p<0,05), в ІЛВ на 75% (p<0,05), TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ на 40% (p<0,05) і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ на 79% (p<0,05) у порівнянні з ЕХІ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції тільки TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: на 32% та 45% (p<0,05) відповідно. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у

ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності TLR2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в TLR2<sup>+</sup>-лімфобластах лімфоцитах ВПСОВ у порівнянні з контролем, тоді як в ІЛВ спостерігалася різноспрямована тенденція по збільшенню щільності TLR2 в лімфобластах і зменшенню в малих лімфоцитах. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR2 в малих лімфоцитах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR2 в лімфобластах обох морфофункціональних зон у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів в 2 рази в обох досліджених морфофункціональних зонах клубової кишки у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів тільки в ІЛВ на 31% ( $p < 0,05$ ). При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ збільшився на 24% ( $p < 0,05$ ), в ІЛВ на 98% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR4<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції всіх імунопозитивних клітин у ВПСОВ та в ІЛВ: TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів на 44% і в 2,2 рази ( $p < 0,05$ ), TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,8 і 2,3 рази ( $p < 0,05$ ), TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,3 і 2 рази ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів та TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: збільшилась щільність популяції TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 29% на

42% ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігалось зменшення тільки відсоткової долі лімфобластів у ВПСОВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції майже всіх імунопозитивних клітин у ВПСОВ та в ІЛВ: TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 80% і в 2 рази ( $p < 0,05$ ) відповідно, TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 50% і в 2,4 рази ( $p < 0,05$ ) відповідно. Проте у ВПСОВ зменшилась щільність популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів на 14% і збільшилась в ІЛВ на 38% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів, в ІЛВ — TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності TLR4 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕХІ не супроводжувався вірогідними змінами даного показника. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 у лімфобластах ВПСОВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 в лімфобластах та збільшенням в середніх лімфоцитах ВПСОВ у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NF-κB, показав, що розвиток ЕХІ не супроводжувався вірогідними змінами сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 41% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 44% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 29% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NF-κB<sup>+</sup>-клітин засвідчило що введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції всіх клітин у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів на 37% і 33% ( $p < 0,05$ ) відповідно, NF-κB<sup>+</sup>-

середніх лімфоцитів на 48% і 31% ( $p < 0,05$ ) відповідно, NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 45% і 31% ( $p < 0,05$ ) відповідно. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: на 57% і в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), та NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 39% ( $p < 0,05$ ) в ВПСОВ. У структурі популяції NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфобластів і NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів, в ІЛВ NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфобластів, NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-середніх та малих лімфоцитів (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію NF- $\kappa$ B в клітині засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався підвищенням даного показника в лімфобластах обох морфофункціональних зон. Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації NF- $\kappa$ B у лімфобластах обох морфофункціональних зон (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NOD2, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 20% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. При введенні симвастатину щурам з ЕХІ цей показник у ВПСОВ зменшився на 29% ( $p < 0,05$ ). При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 24% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 15% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NOD2<sup>+</sup>-клітин засвідчило що розвиток ЕХІ супроводжувався збільшенням NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ та ІЛВ на 24% і 27% ( $p < 0,05$ ) відповідно. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ в 2,4 рази, NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів і NOD2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ в 2 рази і на 7% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів середніх та малих лімфоцитів в обох морфофункціональних

зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: зменшенням щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів на 46% і 2 рази ( $p < 0,05$ ), проте збільшилась щільність популяції NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 1,8 і 2 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів і NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності NOD2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що введення симвастатину та АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності NOD2 в лімфобластах обох морфофункціональних зон (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до RIGI, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 18% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕХІ не супроводжувалось змінами сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів. При введенні АРІЛ-1 цей показник збільшився у ВПСОВ і ІЛВ клубової кишки на 19% і 30% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 4.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції RIGI<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 43% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 35% ( $p < 0,05$ ), та збільшення RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів в ІЛВ на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів і RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 67% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 62% ( $p < 0,05$ ), та зменшенням RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів в ІЛВ на 42% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ. У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів і RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в обох

морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось збільшенням RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 89% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ в 2 рази ( $p < 0,05$ ), та збільшенням RIGI<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ на 43% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів і RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах і RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ (див. табл. 4.1, табл. 4.2).

Вивчення щільності RIGI рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням цього показника в RIGI<sup>+</sup>-лімфобластах ВПСОВ і ІЛВ. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності RIGI в лімфобластах і середніх лімфоцитах ВПСОВ, та лімфобластах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності RIGI в лімфобластах і середніх лімфоцитах обох морфофункціональних зон у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 4.2, рис. 4.3).

## **4.2 Особливості експресії TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального коліту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам**

*4.2.1 Експресія TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2, показав, що

сумарна щільність TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $38 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 32% менше, ніж в ПО. Серед TLR2<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали TLR2<sup>+</sup>-середні та малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були TLR2<sup>+</sup>-лімфобласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 40% ( $p < 0,05$ ) і в ПО на 88% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 26% ( $p < 0,05$ ), і в ПО на 36% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІІ-1 цей показник ще більше зменшився — у ВПСО на 28% ( $p < 0,05$ ), у ПО на 48% ( $p < 0,05$ ) (рис. 4.4).

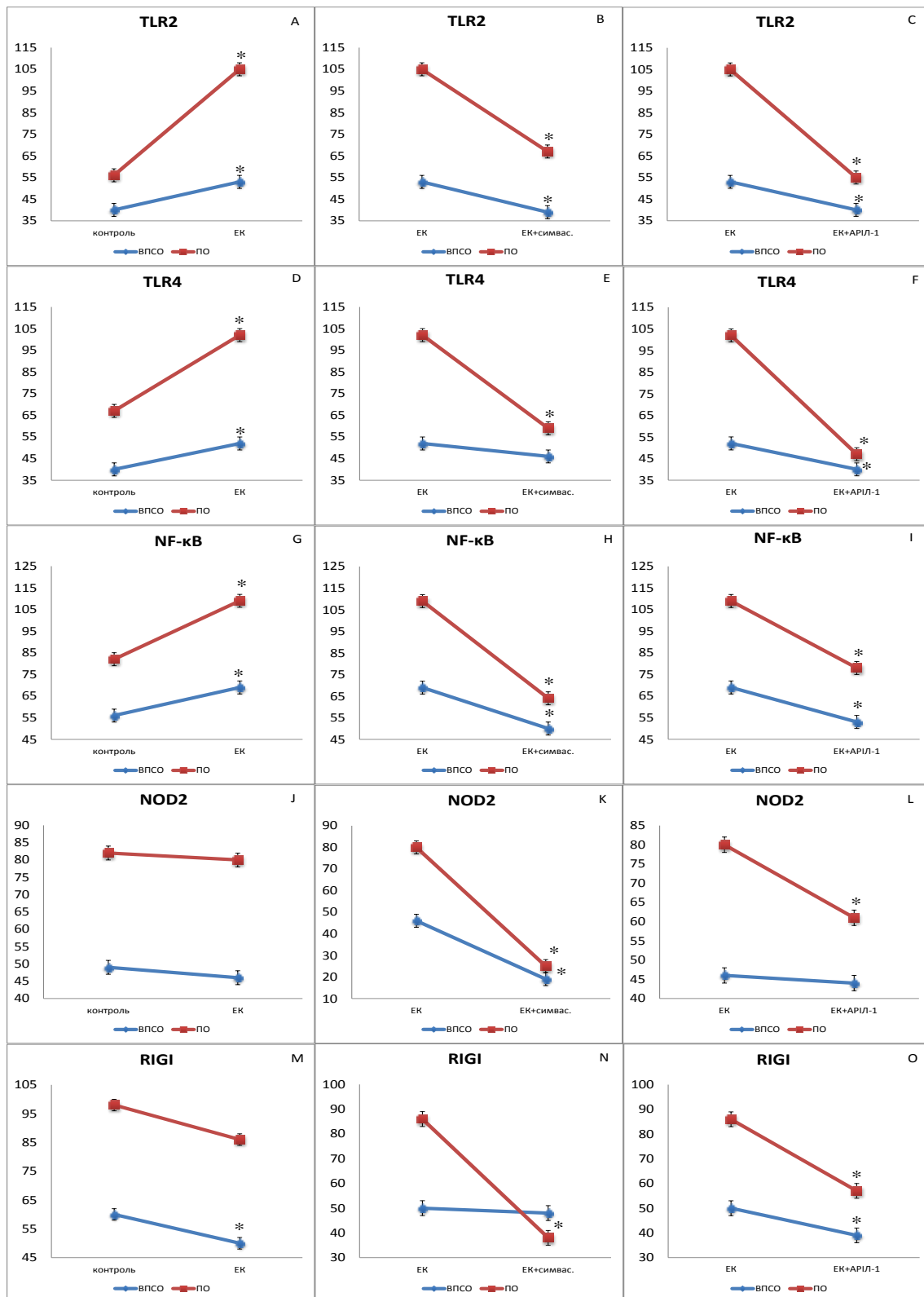


Рис. 4.4 (А-О). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (А, D, G, J, M) та після введення симвастатину (В, Е, Н, К, N) й АПІЛ-1 (С, F, I, L, O) експериментальним тваринам, \*—  $p < 0,05$



Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR2<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО і ПО в 4 і 4,6 разів ( $p < 0,05$ ), TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ПО на 53% ( $p < 0,05$ ), та зменшення щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО на 20% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів, TLR2<sup>+</sup>-середніх та малих лімфоцитів, у ПО — TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів та TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів на 46% і в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2 і 2,1 рази ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх досліджуваних класів лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів на 46% ( $p < 0,05$ ), зменшенням у ПО щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,6 разів ( $p < 0,05$ ), TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 43% ( $p < 0,05$ ), і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО і ПО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів (табл. 4.3, табл. 4.4).

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки дистального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІІ-1
	Клас клітин					
<b>TLR2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{6 \pm 1}{15,8 \pm 1,7\%}$	$\frac{24 \pm 1^1}{45,9 \pm 2,0\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{34,1 \pm 2,7\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{34,0 \pm 2,0\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{39,2 \pm 2,7\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{22,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{16,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{10 \pm 1}{26,9 \pm 1,9\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{17 \pm 1}{45,0 \pm 2,5\%}$	$\frac{17 \pm 1}{31,3 \pm 1,8\%}$	$\frac{19 \pm 2}{49,8 \pm 4,1\%}$	$\frac{15 \pm 1}{39,1 \pm 2,6\%}$	
<b>TLR4</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{15 \pm 1}{36,5 \pm 2,1\%}$	$\frac{21 \pm 1^1}{39,3 \pm 1,9\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{27,6 \pm 2,0\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{36,7 \pm 1,9\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{10 \pm 1}{24,1 \pm 1,9\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{26,0 \pm 1,7\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{23,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{24,5 \pm 1,5\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{39,4 \pm 2,3\%}$	$\frac{18 \pm 1}{34,7 \pm 1,8\%}$	$\frac{23 \pm 2^2}{49,3 \pm 4,3\%}$	$\frac{15 \pm 1^2}{38,8 \pm 2,3\%}$	
<b>NF-κB</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{20 \pm 1}{35,0 \pm 2,4\%}$	$\frac{37 \pm 1^1}{52,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{17 \pm 1^2}{34,2 \pm 2,3\%}$	$\frac{20 \pm 1^2}{37,0 \pm 1,5\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{13 \pm 1}{23,3 \pm 2,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{16,3 \pm 1,2\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{16,8 \pm 1,5\%}$	$\frac{11 \pm 1}{21,4 \pm 1,4\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{24 \pm 2}{41,8 \pm 2,7\%}$	$\frac{21 \pm 1}{30,8 \pm 2,0\%}$	$\frac{25 \pm 2}{48,9 \pm 3,6\%}$	$\frac{22 \pm 1}{41,6 \pm 2,6\%}$	
<b>NOD2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{22 \pm 2}{43,8 \pm 3,6\%}$	$\frac{26 \pm 2}{55,6 \pm 4,0\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{44,5 \pm 4,4\%}$	$\frac{20 \pm 1^2}{44,8 \pm 3,1\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{12 \pm 1}{25,1 \pm 2,4\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{19,3 \pm 1,9\%}$	$\frac{4 \pm 1^2}{19,3 \pm 3,5\%}$	$\frac{10 \pm 1}{23,1 \pm 2,8\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{31,1 \pm 3,0\%}$	$\frac{12 \pm 2}{25,2 \pm 3,4\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{36,3 \pm 5,2\%}$	$\frac{14 \pm 2}{32,1 \pm 3,5\%}$	
<b>RIGI</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{28 \pm 2}{47,4 \pm 3,9\%}$	$\frac{22 \pm 1^1}{44,0 \pm 3,5\%}$	$\frac{15 \pm 2^2}{31,6 \pm 3,8\%}$	$\frac{21 \pm 1}{54,7 \pm 2,9\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{13 \pm 1}{21,7 \pm 2,0\%}$	$\frac{15 \pm 1}{29,6 \pm 2,4\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{15,1 \pm 2,0\%}$	$\frac{5 \pm 1^2}{14,0 \pm 2,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{18 \pm 1}{30,9 \pm 2,5\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{26,4 \pm 2,2\%}$	$\frac{26 \pm 2^2}{53,2 \pm 3,3\%}$	$\frac{12 \pm 1}{31,3 \pm 3,7\%}$	

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) —  $p < 0,05$  стосовно контролю. (2) —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у підслизовій основі дистального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІІ-1
	Клас клітин					
<b>TLR2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{9 \pm 1}{15,8 \pm 1,8\%}$	$\frac{42 \pm 2^1}{40,0 \pm 1,6\%}$ <sup>1</sup>	$\frac{20 \pm 1^2}{30,6 \pm 2,2\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{16 \pm 1^2}{28,4 \pm 1,9\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{22 \pm 2}{38,4 \pm 3,4\%}$	$\frac{23 \pm 1}{22,2 \pm 1,3\%}$ <sup>1</sup>	$\frac{11 \pm 1^2}{16,4 \pm 1,5\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{13 \pm 1^2}{23,1 \pm 1,8\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{26 \pm 2}{45,7 \pm 3,9\%}$	$\frac{40 \pm 2^1}{37,7 \pm 1,8\%}$	$\frac{35 \pm 3}{52,9 \pm 4,3\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{27 \pm 2^2}{48,5 \pm 3,5\%}$ <sup>2</sup>	
<b>TLR4</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 3}{36,7 \pm 5,0\%}$	$\frac{31 \pm 1}{30,4 \pm 1,4\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{21,6 \pm 2,1\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{13 \pm 1^2}{27,5 \pm 2,2\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{18 \pm 2}{26,9 \pm 2,9\%}$	$\frac{27 \pm 1^1}{26,1 \pm 1,3\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{24,5 \pm 2,1\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{23,2 \pm 2,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{25 \pm 2}{36,4 \pm 3,4\%}$	$\frac{44 \pm 2^1}{43,4 \pm 2,0\%}$	$\frac{32 \pm 3^2}{53,9 \pm 4,4\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{23 \pm 2^2}{49,3 \pm 3,8\%}$ <sup>2</sup>	
<b>NF-κB</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{20 \pm 2}{24,6 \pm 2,1\%}$	$\frac{37 \pm 1^1}{34,0 \pm 1,3\%}$ <sup>1</sup>	$\frac{24 \pm 2^2}{37,0 \pm 2,6\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{27 \pm 1^2}{34,3 \pm 1,6\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{26 \pm 2}{31,5 \pm 2,3\%}$	$\frac{30 \pm 2}{27,3 \pm 1,6\%}$	$\frac{12 \pm 1^2}{19,4 \pm 1,7\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{17 \pm 1^2}{21,1 \pm 1,3\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{36 \pm 3}{44,0 \pm 3,2\%}$	$\frac{42 \pm 3}{38,7 \pm 2,4\%}$	$\frac{28 \pm 2^2}{43,6 \pm 3,1\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{35 \pm 3}{44,6 \pm 3,2\%}$ <sup>2</sup>	
<b>NOD2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{29 \pm 4}{35,7 \pm 4,6\%}$	$\frac{36 \pm 2}{45,3 \pm 2,6\%}$	$\frac{13 \pm 2^2}{52,7 \pm 6,6\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{25 \pm 2^2}{40,5 \pm 2,9\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{26 \pm 3}{31,4 \pm 3,6\%}$	$\frac{17 \pm 1^1}{21,3 \pm 1,7\%}$ <sup>1</sup>	$\frac{4 \pm 1^2}{15,6 \pm 2,9\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{14 \pm 1}{23,6 \pm 2,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{27 \pm 2}{33,0 \pm 3,0\%}$	$\frac{27 \pm 2}{33,4 \pm 2,9\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{31,6 \pm 5,6\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{22 \pm 2}{35,9 \pm 3,2\%}$ <sup>2</sup>	
<b>RIGI</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{33 \pm 4}{33,4 \pm 3,7\%}$	$\frac{32 \pm 2}{37,9 \pm 2,4\%}$	$\frac{15 \pm 1^2}{38,2 \pm 3,5\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{28 \pm 2}{49,8 \pm 3,7\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{33 \pm 3}{33,2 \pm 3,1\%}$	$\frac{26 \pm 2}{30,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{5 \pm 1^2}{12,3 \pm 1,6\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{9 \pm 1^2}{16,7 \pm 2,0\%}$ <sup>2</sup>	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{33 \pm 3}{33,3 \pm 2,3\%}$	$\frac{27 \pm 2}{31,9 \pm 2,6\%}$	$\frac{19 \pm 2^2}{49,5 \pm 5,2\%}$ <sup>2</sup>	$\frac{19 \pm 1^2}{33,0 \pm 2,6\%}$ <sup>2</sup>	

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) —  $p < 0,05$  стосовно контролю. (2) —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

Вивчення щільності TLR2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в TLR2<sup>+</sup>-лімфобластах і TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитах ПО у порівнянні з контролем, тоді як у ВПСО спостерігалась різноспрямована тенденція по збільшенню щільності TLR2 в лімфобластах і зменшенню в малих лімфоцитах. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR2 у лімфобластах ПО і зменшенням у малих лімфоцитах в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІІ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR2 у лімфобластах ВПСО і ПО та в малих лімфоцитах ПО в порівнянні з ЕК (рис. 4.5, рис. 4.6).

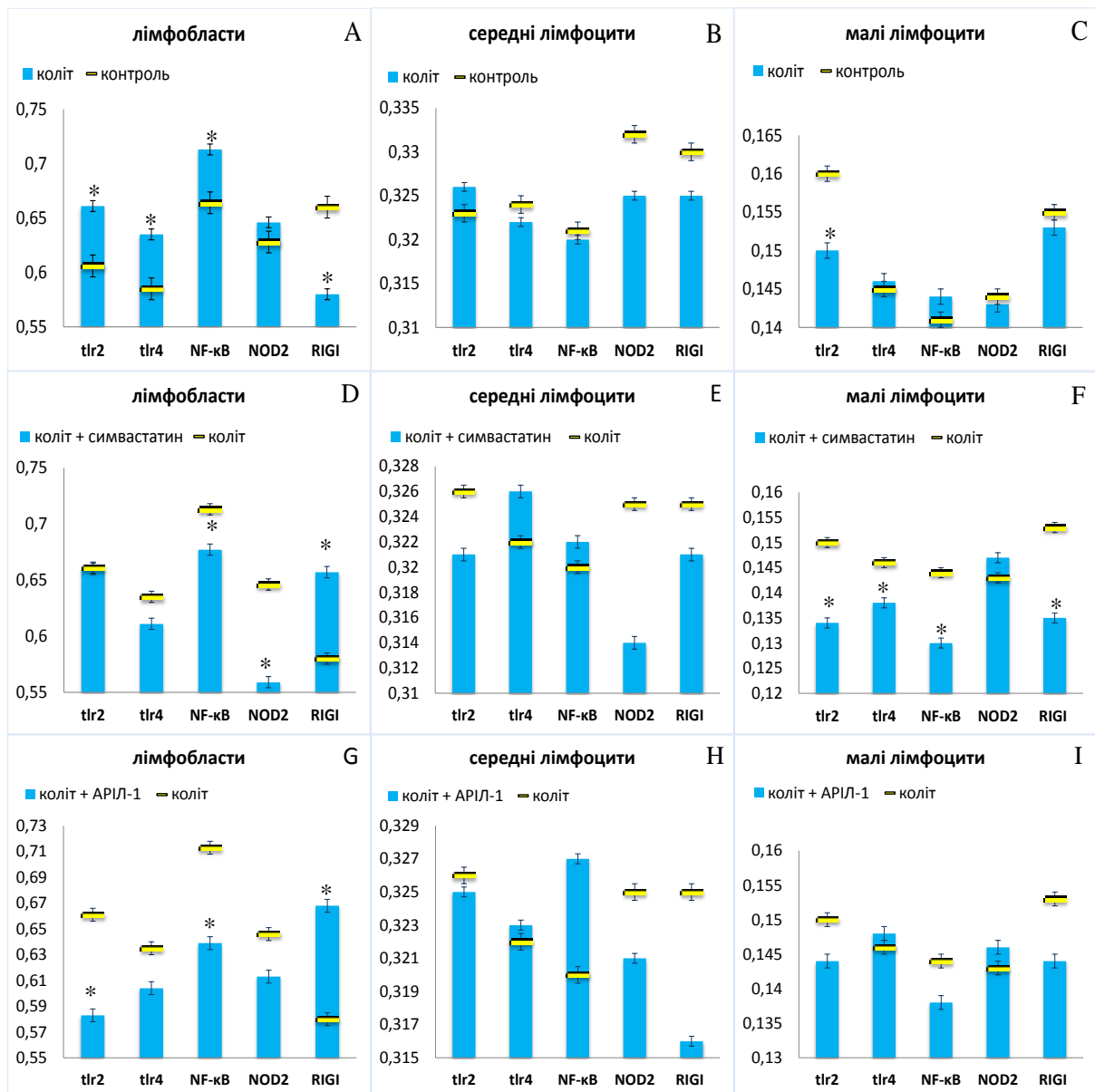


Рис. 4.5 (А-І). Щільність рецепторів ( $Y_{O_{IF}}$ ) у лімфоцитах ВПСО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й АРІЛ-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

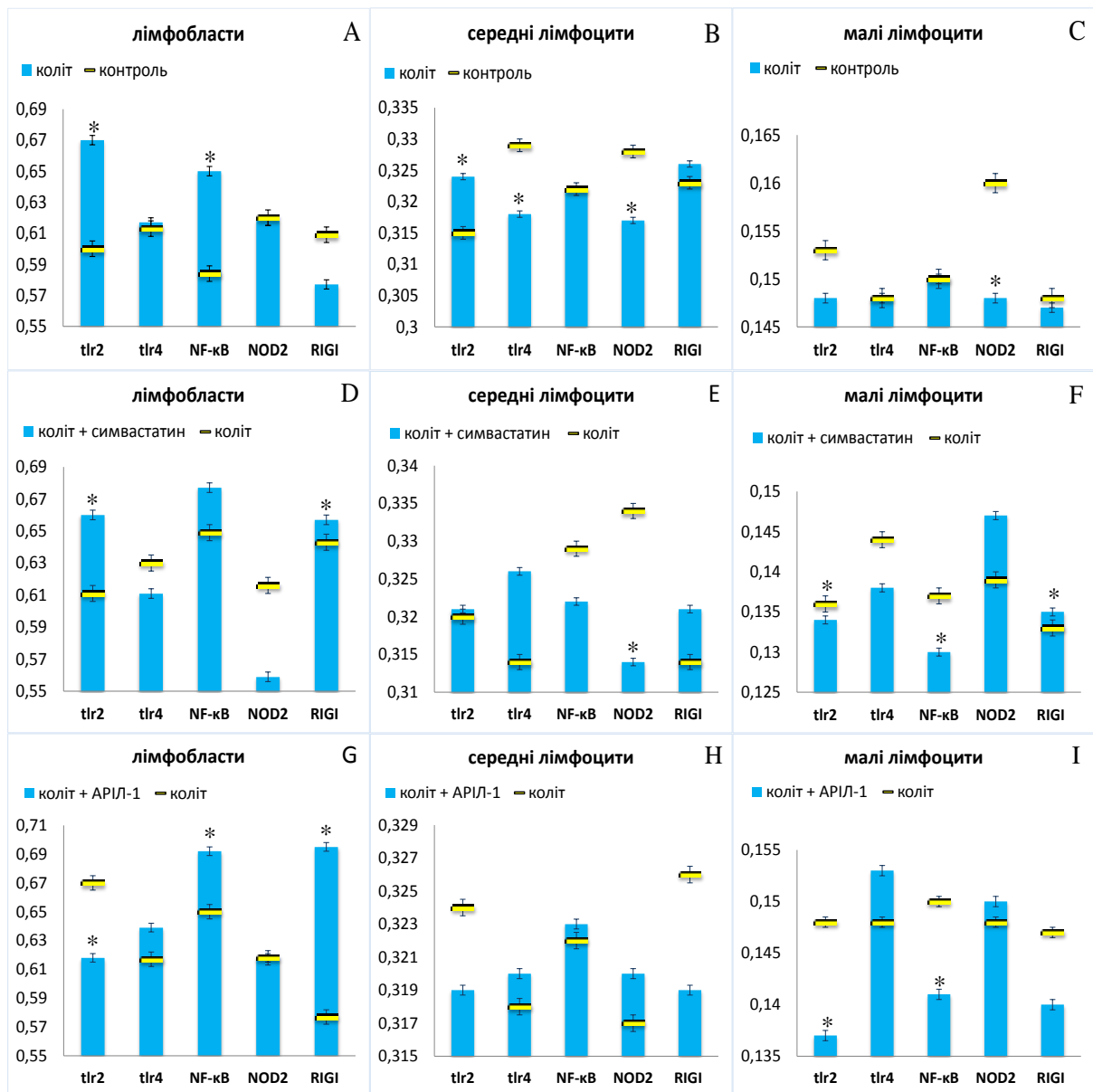


Рис. 4.6 (А-І). Щільність рецепторів (YO<sub>10</sub>) у лімфоцитах ПО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й APII-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4, показав, що сумарна щільність TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 40±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 40% менше, ніж у ПО. Серед TLR4<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали TLR4<sup>+</sup>-лімфобласти та малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були TLR4<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 30% (p<0,05) і в ПО на 52% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів в ПО на 42% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник ще більше зменшився — у ВПСО на 27% (p<0,05), у ПО в 2,1 рази (p<0,05) (див. рис. 4.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR4<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО на 40% (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО та ПО на 40% і 50% (p<0,05) TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ПО на 76% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів на 38% і в 2,4 рази (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 21% і в 2 рази (p<0,05), збільшенням TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСО на 28% (p<0,05), та зменшенням TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ПО на 27% (p<0,05). У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів на 33% і в 2,4 рази (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 36% і в 2,5 разів (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 17% і 47% (p<0,05) у порівнянні з ЕК (див. табл. 4.3, табл. 4.4).

Вивчення щільності TLR4 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в TLR4<sup>+</sup>-лімфобластах ВПСО і зменшенням в TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитах ПО у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 у малих лімфоцитах ВПСО у порівнянні з ЕК (див. рис. 4.5, рис. 4.6).

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NF-κB, показав, що сумарна щільність NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 56±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 32% менше, ніж в ПО. Серед NF-κB<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 23% (p<0,05) і в ПО на 33% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 28% (p<0,05), і в ПО на 41% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився у ВПСО на 23% (p<0,05), проте він збільшився в ПО на 22% (p<0,05) (див. рис. 4.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NF-κB<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО і ПО на 85% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової доли NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів, NF-κB<sup>+</sup>-середніх та малих лімфоцитів, у ПО — NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки: NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,2 рази і на 35% (p<0,05), NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 27% і в 2,5 рази (p<0,05). Проте щільність популяції NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцитів зменшилась лише у ПО на 33% (p<0,05). У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової доли у ВПСО лімфобластів та малих лімфоцитів, у ПО лише середніх лімфоцитів.



Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО і ПО щільності популяції NF-кВ<sup>+</sup>-лімфобластів на 46% і 27% ( $p < 0,05$ ), зменшенням у ПО щільності популяції NF-кВ<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 43% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції NF-кВ<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх класів лімфоцитів, у ПО тільки NF-кВ<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (див. табл. 4.3, табл. 4.4).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції NF-кВ<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію NF-кВ в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався підвищенням даного показника в лімфобластах обох морфофункціональних зон. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації NF-кВ в малих лімфоцитах обох морфофункціональних зон. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації NF-кВ у лімфобластах ВПСО і малих лімфоцитах ПО, і збільшенням у лімфобластах ВПСО (див. рис. 4.5, рис. 4.6).

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NOD2, показав, що сумарна щільність NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $49 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 67% менше, ніж у ПО. Серед NOD2<sup>+</sup>-клітин у ВПСО переважали NOD2<sup>+</sup>-лімфобласти, тоді як у ПО всі класи клітин були представлені в практично в однаковій кількості. Нами було встановлено, що розвиток ЕК не супроводжувався зміною сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів. Проте введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО та ПО в 2,4 і 3,2 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився тільки в ПО на 24% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NOD2<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО та ПО на 25% і 53% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів ВПСО спостерігались вірогідні зміни

відсоткової долі NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів, у ПО NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів в 3,3 і 2,8 разів ( $p < 0,05$ ), NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,3 і 4,3 разів ( $p < 0,05$ ), NOD2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 28% і в 3,4 разів ( $p < 0,05$ ). Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів на 23% і 31% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО (див. табл. 4.3, табл. 4.4).

Вивчення щільності NOD2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням даного показника в середніх та малих лімфоцитах ПО у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності NOD2 в лімфобластах ВПСО і збільшенням в середніх лімфоцитах ПО у порівнянні з ЕК (див. рис. 4.5, рис. 4.6).

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до RIGI, показав, що сумарна щільність RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $60 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 39% менше, ніж у ПО. Серед RIGI<sup>+</sup>-клітин у ВПСО переважали RIGI<sup>+</sup>-лімфобласти, тоді як у ПО всі класи клітин були представлені в практично в однаковій кількості. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався зменшенням сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 17% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів тільки в ПО в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився у ВПСО і ПО на 22% і 34% ( $p < 0,05$ ) відповідно (див. рис. 4.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції RIGI<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів і

RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСО на 21% і 28% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі RIGI<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів на 32% і в 2,1 разів ( $p < 0,05$ ), RIGI<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,1 і 5,2 разів ( $p < 0,05$ ). Проте щільність популяції RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСО збільшилась в 2 рази і зменшилась у ПО на 30% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх та малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 3 і 2,9 разів ( $p < 0,05$ ), RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів тільки у ПО на 30% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів та середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах (див. табл. 4.3, табл. 4.4).

Вивчення щільності RIGI рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням даного показника в лімфобластах ВПСО у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності RIGI в лімфобластах і зменшенням у малих лімфоцитах обох морфофункціональних зон кишківника у порівнянні з ЕК. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності RIGI в лімфобластах обох морфофункціональних зон у порівнянні з ЕК (див. рис. 4.5, рис. 4.6).

4.2.2 *Експресія TLR2, TLR4, NF-κB, NOD2, RIGI у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR2, показав, що сумарна щільність TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 64±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 6% менше, ніж в ПО. Серед TLR2<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали TLR2<sup>+</sup>-лімфобласти та малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були TLR2<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 27% (p<0,05) і в ПО на 31% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 34% (p<0,05), і в ПО на 30% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився у ВПСО на 30% (p<0,05) (рис. 4.7).

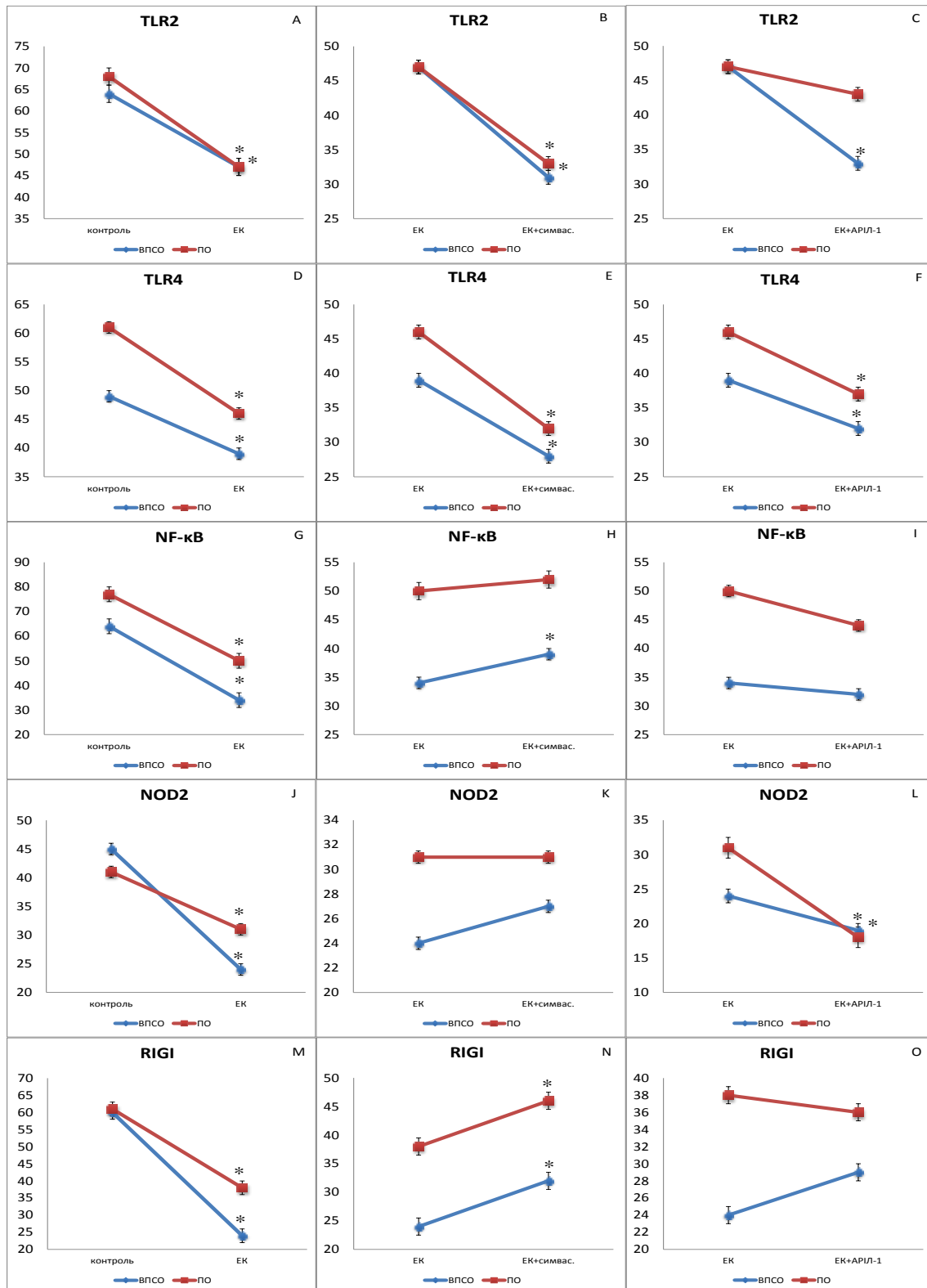


Рис. 4.7 (А-О). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (А, D, G, J, М) та після введень симвастатину (В, Е, Н, К, N) й APII-1 (С, F, I, L, O) експериментальним тваринам, \*— p < 0,05

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR2<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО і ПО на 36% і 44% ( $p < 0,05$ ), TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 31% і 29% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки: TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 36% і 43% ( $p < 0,05$ ). TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 30% і 40% ( $p < 0,05$ ), щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів тільки у ВПСО на 38% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лише лімфобластів у ПО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-середніх і малих лімфоцитів на 45% і 40% ( $p < 0,05$ ), зменшенням у ПО щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 29% ( $p < 0,05$ ), збільшенням у ПО щільності популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів на 14% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів, у ПО — TLR2<sup>+</sup>-лімфобластів і TLR2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (табл. 4.5, табл. 4.6).

Вивчення щільності TLR2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в TLR2<sup>+</sup>-лімфобластах і малих лімфоцитах, а також зменшенням в лімфобластах ПО у порівнянні з контролем, тоді як в ВПСО спостерігалась різноспрямована тенденція по зменшенню щільності TLR2 в лімфобластах і збільшенню в середніх лімфоцитах. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності TLR2 в малих лімфоцитах ВПСО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності TLR2 в лімфобластах ВПСО в порівнянні з ЕК (рис. 4.8, рис 4.9).

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки проксимального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІІ-1
	Клас клітин					
<b>TLR2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 1}{39,8 \pm 1,8\%}$	$\frac{16 \pm 1^1}{33,5 \pm 1,8\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{33,2 \pm 1,9\%}$	$\frac{15 \pm 1}{46,3 \pm 2,6\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{14,4 \pm 1,0\%}$	$\frac{11 \pm 1}{23,4 \pm 1,5\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{22,5 \pm 1,9\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{19,1 \pm 1,5\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{29 \pm 2}{45,9 \pm 3,0\%}$	$\frac{20 \pm 1^1}{43,0 \pm 3,2\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{44,2 \pm 3,2\%}$	$\frac{12 \pm 1^2}{34,6 \pm 2,8\%}$	
<b>TLR4</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{17 \pm 1}{33,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{35,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{25,8 \pm 2,1\%}$	$\frac{12 \pm 1}{39,5 \pm 2,2\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{12 \pm 1}{23,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{10 \pm 1}{26,8 \pm 1,7\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{28,5 \pm 2,0\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{26,0 \pm 1,8\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{21 \pm 2}{42,2 \pm 3,3\%}$	$\frac{15 \pm 1^1}{38,2 \pm 2,6\%}$	$\frac{13 \pm 1}{45,8 \pm 3,3\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{34,4 \pm 2,8\%}$	
<b>NF-κB</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 1}{38,4 \pm 1,7\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{40,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{16 \pm 1^2}{39,6 \pm 1,5\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{30,1 \pm 2,6\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{12 \pm 1}{19,0 \pm 1,3\%}$	$\frac{6 \pm 1^1}{18,2 \pm 1,6\%}$	$\frac{6 \pm 1}{14,1 \pm 1,2\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{25,8 \pm 2,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{27 \pm 1}{42,2 \pm 2,1\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{41,9 \pm 3,1\%}$	$\frac{18 \pm 1^2}{46,3 \pm 2,6\%}$	$\frac{14 \pm 1}{44,0 \pm 3,6\%}$	
<b>NOD2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{21 \pm 2}{47,3 \pm 3,5\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{57,3 \pm 3,2\%}$	$\frac{13 \pm 1}{48,2 \pm 3,4\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{36,6 \pm 3,9\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{8 \pm 1}{16,8 \pm 2,4\%}$	$\frac{4 \pm 1^1}{15,4 \pm 2,6\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{20,6 \pm 2,9\%}$	$\frac{5 \pm 1}{28,4 \pm 4,6\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 2}{35,8 \pm 5,2\%}$	$\frac{6 \pm 1^1}{27,4 \pm 3,7\%}$	$\frac{9 \pm 1}{31,1 \pm 4,5\%}$	$\frac{7 \pm 1}{35,0 \pm 4,8\%}$	
<b>RIGI</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{27 \pm 2}{45,9 \pm 3,5\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{50,2 \pm 4,1\%}$	$\frac{14 \pm 1}{45,0 \pm 3,4\%}$	$\frac{12 \pm 1}{40,5 \pm 3,3\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{13 \pm 1}{22,4 \pm 2,0\%}$	$\frac{4 \pm 1^1}{18,2 \pm 2,8\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{24,2 \pm 2,9\%}$	$\frac{5 \pm 1}{16,2 \pm 2,6\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{19 \pm 2}{31,7 \pm 2,8\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{31,6 \pm 4,3\%}$	$\frac{10 \pm 1}{30,8 \pm 4,0\%}$	$\frac{13 \pm 2^2}{43,2 \pm 6,6\%}$	

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) —  $p < 0,05$  стосовно контролю. (2) —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у підслизовій основі  
проксимального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Коліт	Коліт + симваста- тин	Коліт + АРИЛ-1
	Клас клітин					
<b>TLR2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 1}{37,0 \pm 2,0\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{28,9 \pm 2,0\%}$	$\frac{12 \pm 1}{36,4 \pm 2,2\%}$	$\frac{16 \pm 1^2}{38,0 \pm 2,1\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{21,7 \pm 1,5\%}$	$\frac{14 \pm 1}{29,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{25,6 \pm 2,0\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{22,8 \pm 1,8\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{28 \pm 2}{41,2 \pm 2,4\%}$	$\frac{20 \pm 1^1}{42,0 \pm 3,1\%}$	$\frac{12 \pm 1^2}{38,0 \pm 2,6\%}$	$\frac{17 \pm 1}{39,1 \pm 2,8\%}$	
<b>TLR4</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{19 \pm 1}{31,1 \pm 1,8\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{25,8 \pm 2,2\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{25,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{24,2 \pm 1,8\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{14 \pm 1}{23,4 \pm 1,6\%}$	$\frac{14 \pm 1}{30,6 \pm 1,9\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{35,7 \pm 2,5\%}$	$\frac{11 \pm 1^2}{29,8 \pm 2,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{28 \pm 2}{45,5 \pm 2,7\%}$	$\frac{20 \pm 2^1}{43,6 \pm 3,3\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{39,3 \pm 2,8\%}$	$\frac{17 \pm 1}{46,0 \pm 3,6\%}$	
<b>NF-κB</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{31 \pm 1}{39,7 \pm 2,2\%}$	$\frac{17 \pm 1^1}{34,7 \pm 1,8\%}$	$\frac{18 \pm 1}{35,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{31,6 \pm 2,5\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{17 \pm 1}{21,7 \pm 1,4\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{19,0 \pm 1,6\%}$	$\frac{10 \pm 1}{19,0 \pm 1,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{25,1 \pm 2,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{30 \pm 1}{38,6 \pm 1,9\%}$	$\frac{23 \pm 2^1}{46,3 \pm 3,4\%}$	$\frac{24 \pm 2}{46,0 \pm 3,4\%}$	$\frac{19 \pm 2}{43,2 \pm 3,4\%}$	
<b>NOD2</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{18 \pm 2}{45,4 \pm 4,6\%}$	$\frac{16 \pm 1}{53,3 \pm 4,8\%}$	$\frac{14 \pm 1}{46,9 \pm 3,6\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{42,7 \pm 3,8\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{21,3 \pm 2,5\%}$	$\frac{6 \pm 1^1}{19,0 \pm 3,0\%}$	$\frac{7 \pm 1}{21,3 \pm 2,7\%}$	$\frac{5 \pm 1}{26,4 \pm 3,2\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{14 \pm 2}{33,3 \pm 4,4\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{27,7 \pm 3,6\%}$	$\frac{10 \pm 1}{31,8 \pm 3,6\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{30,9 \pm 3,7\%}$	
<b>RIGI</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{19 \pm 2}{31,5 \pm 3,0\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{36,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{19 \pm 1^2}{42,3 \pm 3,0\%}$	$\frac{14 \pm 2}{38,4 \pm 5,2\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{18 \pm 1}{28,8 \pm 2,4\%}$	$\frac{9 \pm 1^1}{24,2 \pm 2,7\%}$	$\frac{7 \pm 1}{19,0 \pm 2,2\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{17,8 \pm 2,0\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{24 \pm 2}{39,8 \pm 2,8\%}$	$\frac{15 \pm 2^1}{39,2 \pm 4,6\%}$	$\frac{18 \pm 1}{38,8 \pm 3,2\%}$	$\frac{16 \pm 2}{43,8 \pm 4,3\%}$	

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) —  $p < 0,05$  стосовно контролю. (2) —  $p < 0,05$  стосовно коліту.



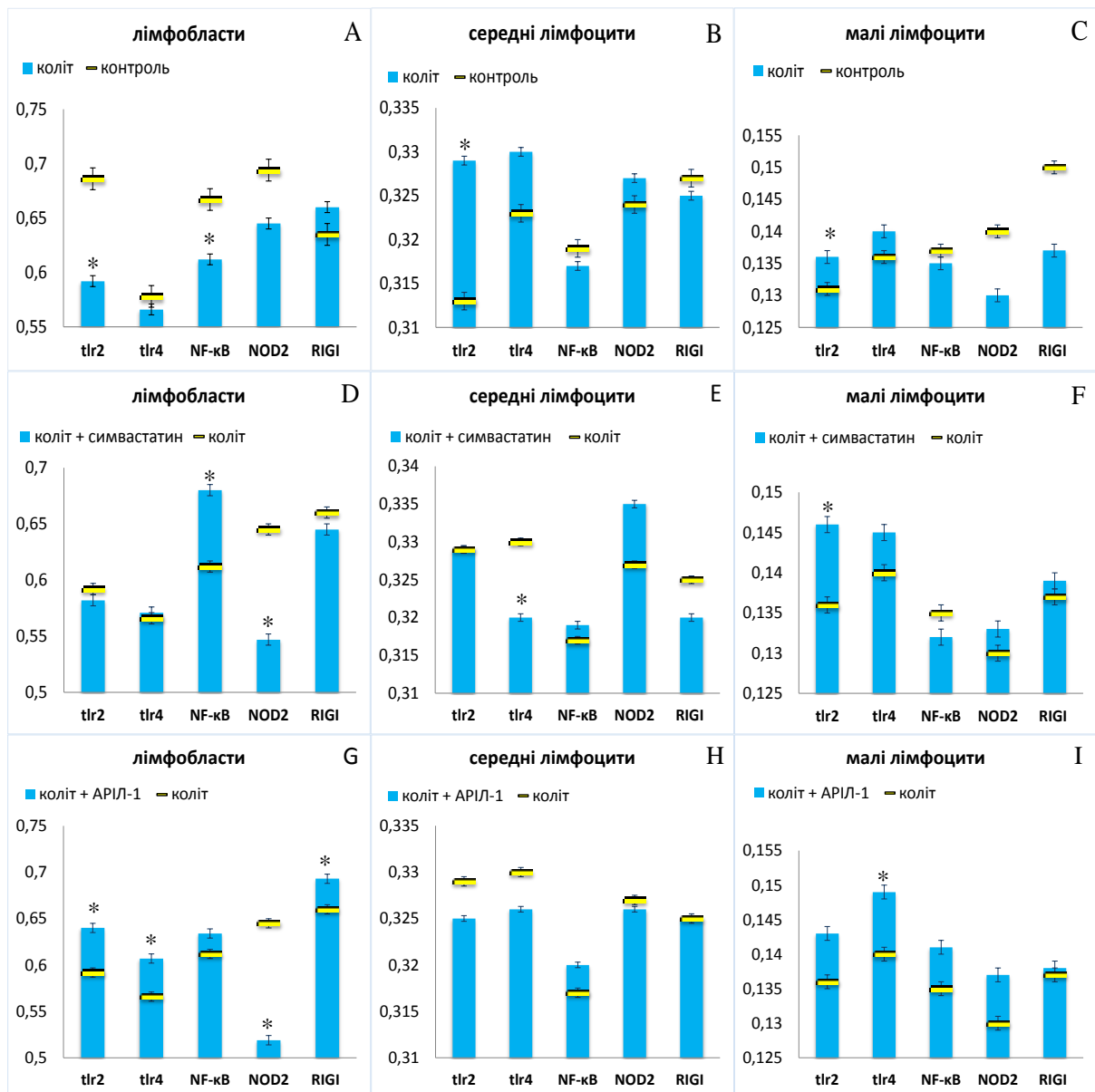


Рис. 4.8 (А-І). Щільність рецепторів ( $Y_{OIF}$ ) у лімфоцитах ВПСО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й АРІІ-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

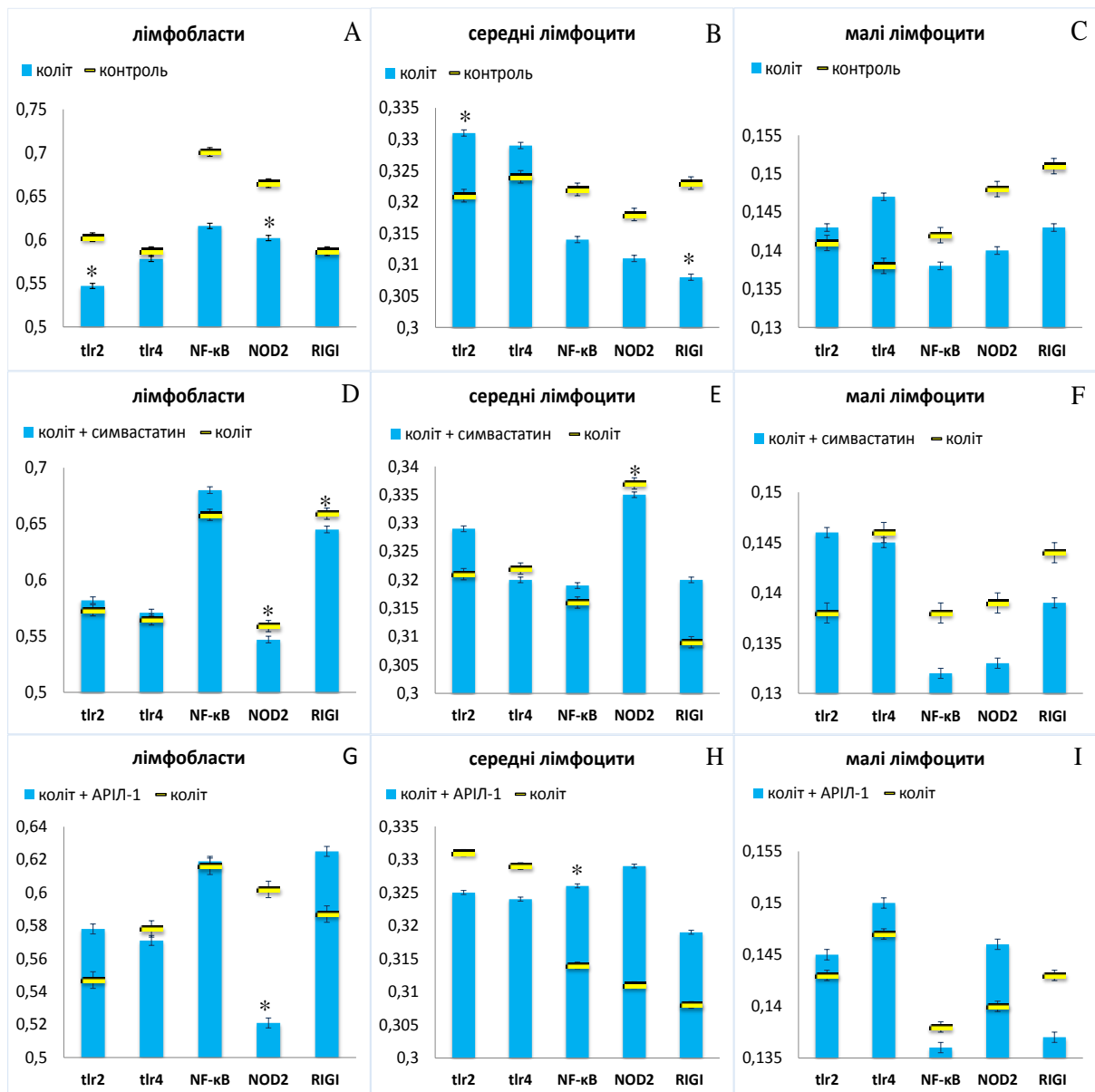


Рис. 4.9 (А-І). Щільність рецепторів ( $YO_{1\phi}$ ) у лімфоцитах ПО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й APII-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до TLR4, показав, що сумарна щільність TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 49±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 20% менше, ніж в ПО. Серед TLR4<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали TLR4<sup>+</sup>-лімфобласти та малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були TLR4<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 20% (p<0,05) і в ПО на 25% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 28% (p<0,05) і в ПО на 30% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник також зменшився — у ВПСО на 18% (p<0,05), в ПО на 20% (p<0,05) (див. рис. 4.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції TLR4<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції у ВПСО та ПО TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів на 18% і 37% (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 29% і 28% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів в 2 рази та 33% (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 20% і 21% (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ПО на 35% (p<0,05). У структурі популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО щільності популяції TLR4<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 20% (p<0,05), TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 27% (p<0,05), у ПО зменшилась щільність популяції TLR4<sup>+</sup>-лімфобластів і середніх лімфоцитів на 25% і 21% (p<0,05) у порівнянні з ЕК (див. табл. 4.5, табл. 4.6.).

Вивчення щільності TLR4 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в TLR4<sup>+</sup>-малих лімфоцитів ПО в порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності TLR4 в середніх лімфоцитах ВПСО у порівнянні з ЕК. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності TLR4 в лімфобластах і малих лімфоцитах в обох морфофункціональних зонах (див. рис. 4.8, рис. 4.9).

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NF-κB, показав, що сумарна щільність NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 64±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 17% менше, ніж в ПО. Серед NF-κB<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали NF-κB<sup>+</sup>-лімфобласти і NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 47% (p<0,05) і в ПО на 65% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів тільки у ВПСО на 15% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник не змінився (див. рис. 4.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NF-κB<sup>+</sup>-клітин у ВПСО і ПО засвідчило зменшення щільності популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів на 44% і 45% (p<0,05), NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2 рази і на 85% (p<0,05), NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 48% і 23% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням щільності популяції у ВПСО проксимального відділу товстої кишки: NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів на 14% (p<0,05), NF-κB<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 29% (p<0,05). У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі у ВПСО лише середніх лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО і ПО щільності

популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфобластів на 29% і 18% ( $p < 0,05$ ), проте збільшилась у ВПСО щільність популяції NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів і середніх лімфоцитів, в ПО — NF-κB<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (див. табл. 4.5, табл. 4.6).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції NF-κB<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію NF-κB в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався зниженням даного показника в лімфобластах ВПСО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації NF-κB в лімфобластах ВПСО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації NF-κB в середніх лімфоцитах ПО (див. рис. 4.8, рис. 4.9).

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до NOD2, показав, що сумарна щільність NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $45 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 9% більше, ніж у ПО. Серед NOD2<sup>+</sup>-клітин у ВПСО і ПО переважали NOD2<sup>+</sup>-лімфобласти і малі лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався зменшенням сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО і ПО на 47% і 24% ( $p < 0,05$ ) відповідно. Проте введення симвастатину щурам з ЕК не супроводжувалось зміною сумарної щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився у ВПСО на 21% ( $p < 0,05$ ), в ПО на 42% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 4.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції NOD2<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО на 38% ( $p < 0,05$ ), NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО та ПО в 2 рази і 33% ( $p < 0,05$ ), NOD2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСО та ПО в 2,6 разів і на 36% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням щільності популяції у ВПСО NOD2<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 50% ( $p < 0,05$ ).

Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів на 46% і в 2 рази ( $p < 0,05$ ), у ПО зменшенням NOD2<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі NOD2<sup>+</sup>-лімфобластів і середніх лімфоцитів в ВПСО (див. табл. 4.5, табл. 4.6).

Вивчення щільності NOD2 рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням даного показника в лімфобластах ПО у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності NOD2 в лімфобластах ВПСО і ПО, а також збільшенням в середніх лімфоцитах ПО у порівнянні з ЕК. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності NOD2 у лімфобластах ВПСО і ПО в порівнянні з ЕК (див. рис. 4.8, рис. 4.9).

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до RIGI, показав, що сумарна щільність RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $60 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що майже однакова як у ПО. Серед RIGI<sup>+</sup>-клітин в ВПСО переважали RIGI<sup>+</sup>-лімфобласти і малі лімфоцити, тоді як у ПО всі класи клітин були представлені практично в однаковій кількості. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався зменшенням сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО і ПО в 2,5 разів і на 38% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО і ПО на 33% і 21% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник не змінився (див. рис. 4.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції RIGI<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції у ВПСО і ПО RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,3 рази і 26% ( $p < 0,05$ ), RIGI<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 3,3 і 2 рази ( $p < 0,05$ ), RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,7 разів і на 38% ( $p < 0,05$ ) у

порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням щільності популяції у ВПСО проксимального відділу товстої кишки RIGI<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2 рази ( $p < 0,05$ ), в ПО — RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів на 36% ( $p < 0,05$ ). Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням у ВПСО щільності популяції RIGI<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 86% ( $p < 0,05$ ), і зменшенням RIGI<sup>+</sup>-лімфобластів тільки у ПО на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК (див. табл. 4.5, табл. 4.6).

Вивчення щільності RIGI рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням даного показника в середніх лімфоцитах ПО у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності RIGI у лімфобластах ПО в порівнянні з ЕК. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності RIGI у лімфобластах ВПСО в порівнянні з ЕК (див. рис. 4.8, рис. 4.9).

Таким чином, проведене дослідження особливостей експресії TLR2, TLR4, NF- $\kappa$ B, NOD2, RIGI у нормі та в експериментальних тварин дозволяє зробити наступні проміжні висновки:

1. Розвиток ЕГІ супроводжується зміною кількості імунопозитивних клітин: збільшенням TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів, зменшенням TLR4<sup>+</sup>- і NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості TLR2<sup>+</sup>- і NOD2<sup>+</sup>- лімфоцитів на фоні зменшення TLR4<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-клітин.

2. Ефекти від введення симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшилась кількість TLR2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшилась TLR4<sup>+</sup>- і NF- $\kappa$ B<sup>+</sup> лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав зменшення NF- $\kappa$ B<sup>+</sup> і NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшення TLR2<sup>+</sup>- і TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів. Ефекти від введення АРІЛ-1 теж залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшувалась кількість TLR2<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшувалась кількість TLR4<sup>+</sup>- і NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів, введення АРІЛ-1 тваринам з ЕХІ викликало зменшення TLR2<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів, та збільшення TLR4<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів.

3. Розвиток ЕК супроводжується зменшенням всіх досліджуваних імунопозитивних клітин у проксимальному відділі товстої кишки на відміну від дистального відділу де спостерігалось збільшення TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>- і NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів.

4. Введення симвастатину і АРІІ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості всіх досліджуваних імунопозитивних клітин у дистальному відділі товстої кишки. Однак в проксимальному відділі збільшилась кількість NF-κB<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів.

Результати досліджень, наведені в цій главі, опубліковані в наступних роботах:

1. 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. — Т. 36, № 3. — С. 139-144
2. 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.
3. Жеребятъев О. С. Вплив експериментального ілеїту на експресію TLR-2 лімфоцитами тонкої кишки / О. С. Жеребятъев, О. М. Камишний // Запорожский медицинский журнал. — 2013. — №4. — С. 81-84.
4. Жеребятъев О. С. Фармакологічна корекція ланок вродженого імунітету при гострому та хронічному ілеїті у щурів / О. С. Жеребятъев, О. М. Камишний // Вісник проблем біології та медицини. — 2014. — №4. — С. 99-104.



5. Zherebiatiev A. Simvastatin and Recombinant Antagonist of Receptors of Interleukin-1 Modulate Toll-like Receptors in Experimental Acute Ileitis in Rat / A. Zherebiatiev, A. Kamyshnyi // Res. Mol. Med. — 2014. — №2 (3). — P. 11-16.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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: мат. III конф. молодих вчених. — Київ, 2013. — С. 12-13.
10. 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.

11. Жеребятъев А. С. Особенности экспрессии транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и TLR-4 при экспериментальной патологии / А. С. Жеребятъев, О. А. Коновалова, А. М. Камышный // Имунологія та алергологія: наука і практика. — 2014. — №4 (додаток). — С.142-143.
12. 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/dop073-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>.
13. Жеребятъев 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 Жеребятъев, 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.
14. 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.

## РОЗДІЛ 5

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

У початковому запальному процесі, який відбувається при ЗЗК, задіяні різні вроджені імунні клітини розташовані в кишківнику, в тому числі природні клітини-кілери, опасисті клітини, нейтрофіли, макрофаги й дендритні клітини. Згодом, підтримання запальної реакції з часом забезпечується за допомогою стимуляції адаптивного імунітету, в основному за посередництва аномально-активованих ефекторних CD4<sup>+</sup> Т-клітин [170]. Результатом цієї активності є посилення синтезу і виділення різних прозапальних медіаторів, включаючи активні форми кисню і метаболіти азоту, ейкозаноїди, хемокіни й цитокіни, які беруть активну участь у патологічному каскаді, ініціації та посиленні запалення в кишківнику [171].

Початкові дослідження показали, що ЗЗК опосередковані Th1 і Th2 клітинами. Це ґрунтувалося на цитокіновому профілі характерному для ХК (IL-12, IFN- $\gamma$ ) і НВК (IL-5, IL-13) [172]. Однак сучасні дослідження показали, що Th17 і Treg клітини також беруть участь у запаленні кишківника при цих захворюваннях [173]. У ROR $\gamma$ t дефіцитних мишей, що не мають Th17, послаблюються експериментально-індуковані аутоімунні захворювання [174], а адоптивне перенесення *in vitro* або *in vivo* диференційованих Th17 в організм щурів з лімфопенією призводить до розвитку коліту [175]. Для ЗЗК у людини характерне залучення різних ефекторних Т-клітин, тому важко оцінити відносний внесок конкретної субпопуляції Т-хелперів у таких пацієнтів. Однак існують мишачі моделі ЗЗК, де переважає одна конкретна субпопуляція клітин. Наприклад селективний дефіцит Treg клітин, що викликає кишкову патологію, характеризується гастритом і плазмоцитарним

ентеритом з підвищеною кількістю плазмоцитів у власній пластинці кишківника [176]. Інша мишача модель коліту, яка індукується перенесенням наївних Т-клітин в організм тварини з лімфопенією, характеризується домінуванням Th1 клітин. Цей коліт характеризується IFN $\gamma$ -залежним виразкуванням слизової оболонки товстої кишки [177]. Слід зазначити, що гістоморфологічно мишачі моделі співвідносяться тільки з деякими характеристиками людських ЗЗК. Але все-таки ці моделі допомагають оцінити функцію специфічних субпопуляцій Т-хелперів.

На завершення, Foxp3<sup>+</sup> Treg клітини можуть мати різні фенотипи. Це дозволяє їм більш ефективно пригнічувати певні ефektorні Т-клітини. Тим не менш, регуляторні Т-клітини не тільки пригнічують їх, але можуть також стимулювати їх при деяких обставинах, що свідчить про мету імунної системи — підтримання належного балансу між регуляторними та ефektorними Т-клітинами [178].

## **5.1 Особливості експресії T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 в ізольованих лімфоїдних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам**

### *5.1.1 Експресія T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕГІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до T-bet, показав, що сумарна щільність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила  $49 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 26% менше, ніж в ІЛВ. Серед T-bet<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали T-bet<sup>+</sup>-лімфобласти, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції були T-bet<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 16% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 26% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕГІ не супроводжувалось зміною сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився тільки у ВПСОВ на 41% ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.1).

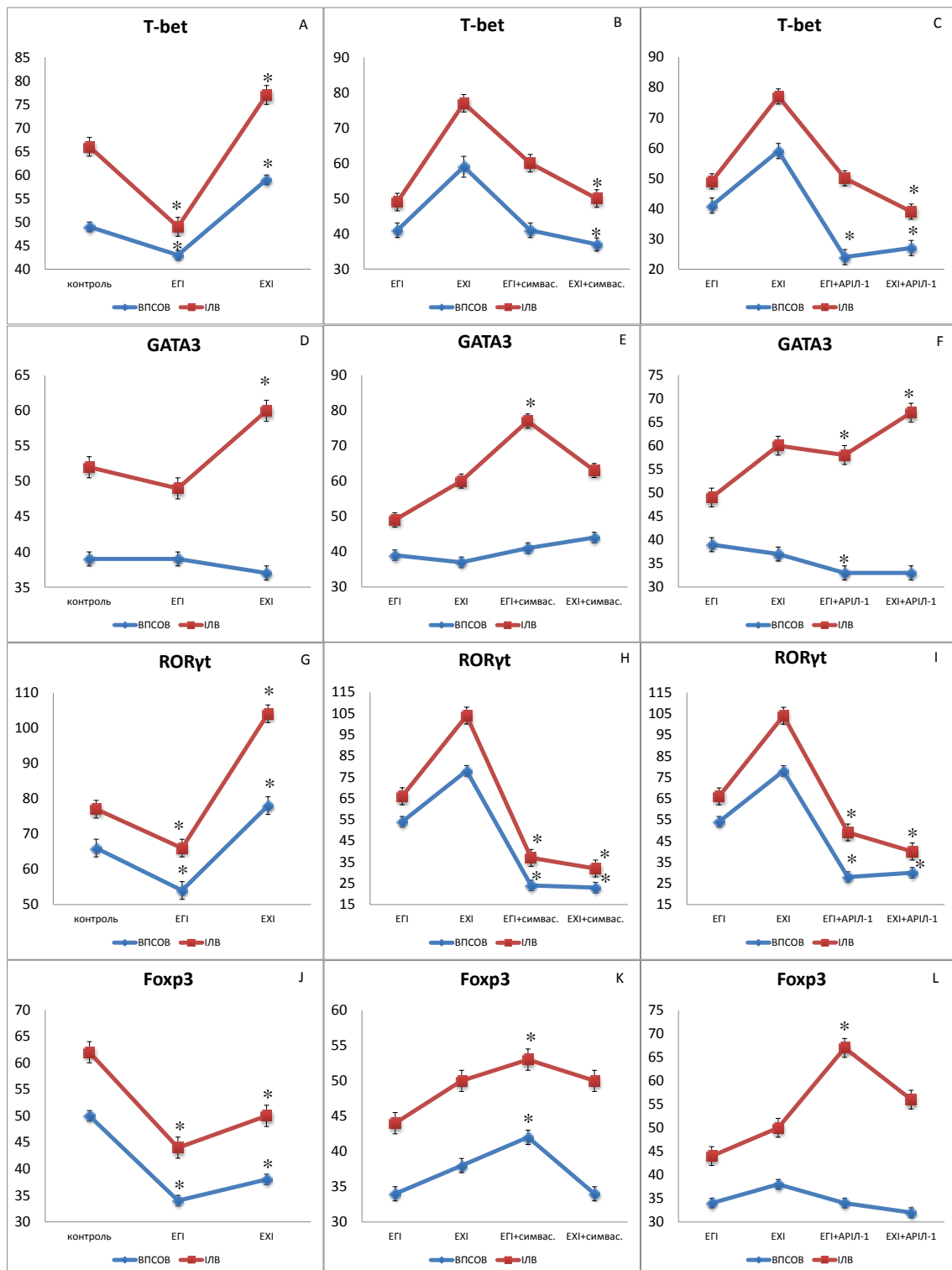


Рис. 5.1 (А-Л). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого (ЕГІ) та хронічного ілеїту (ЕХІ) (А, D, G, J) та після введення симвастатину (В, Е, Н, К) й АРИЛ-1 (С, F, I, L) експериментальним тваринам,\*— p < 0,05

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції T-bet<sup>+</sup>-клітин при розвитку ЕГІ засвідчило зменшення щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 19% (p<0,05) та в ІЛВ на 26% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ клубової кишки на 52% (p<0,05). У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі малих лімфоцитів в ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСОВ клубової кишки: T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,1 рази (p<0,05) і T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 38% (p<0,05) у порівнянні з ЕГІ (табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції T-bet<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію T-bet в клітині засвідчило, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зниженням концентрації T-bet в лімфобластах і малих лімфоцитах ВПСОВ і лімфобластах ІЛВ у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації T-bet в лімфобластах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації T-bet в лімфобластах ВПСОВ у порівнянні з ЕГІ (рис. 5.2, рис. 5.3).

Таблиця 5.1

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів  
(M ± m)**

Транс-крип. фактор	Серія		Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
	Клас клітин								
<b>T-bet</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{26 \pm 1}{52,5 \pm 2,3\%}$	$\frac{21 \pm 1^1}{50,4 \pm 2,7\%}$	$\frac{34 \pm 2^1}{56,6 \pm 2,8\%}$	$\frac{18 \pm 2}{43,1 \pm 3,7\%}$	$\frac{18 \pm 1^3}{47,5 \pm 3,4\%^3}$	$\frac{10 \pm 1^2}{44,0 \pm 3,2\%}$	$\frac{9 \pm 1^3}{33,1 \pm 3,8\%^3}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{7 \pm 1}{14,1 \pm 1,3\%}$	$\frac{7 \pm 1}{16,9 \pm 1,7\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{24,3 \pm 1,2\%^1}$	$\frac{6 \pm 1}{15,6 \pm 2,3\%}$	$\frac{6 \pm 1^3}{15,0 \pm 2,7\%^3}$	$\frac{5 \pm 1}{22,0 \pm 2,6\%}$	$\frac{7 \pm 1^3}{27,2 \pm 3,5\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{33,5 \pm 3,0\%}$	$\frac{13 \pm 1}{32,7 \pm 3,2\%}$	$\frac{11 \pm 2^1}{19,1 \pm 2,7\%^1}$	$\frac{17 \pm 2}{41,3 \pm 5,2\%}$	$\frac{14 \pm 2}{37,5 \pm 4,6\%^3}$	$\frac{8 \pm 1^2}{34,1 \pm 4,0\%}$	$\frac{11 \pm 1}{39,8 \pm 6,0\%^3}$	
<b>GATA3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{19 \pm 1}{48,5 \pm 2,5\%}$	$\frac{18 \pm 1}{46,6 \pm 2,2\%}$	$\frac{20 \pm 1}{55,5 \pm 3,6\%}$	$\frac{21 \pm 1^2}{52,5 \pm 3,3\%}$	$\frac{19 \pm 2}{43,1 \pm 3,5\%^3}$	$\frac{16 \pm 1}{51,4 \pm 3,3\%}$	$\frac{15 \pm 1^3}{49,2 \pm 3,2\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{5 \pm 1}{13,2 \pm 2,0\%}$	$\frac{8 \pm 1^1}{19,3 \pm 1,5\%^1}$	$\frac{6 \pm 1}{17,1 \pm 2,2\%}$	$\frac{6 \pm 1}{15,0 \pm 2,2\%}$	$\frac{7 \pm 1}{15,7 \pm 1,9\%}$	$\frac{7 \pm 1}{24,0 \pm 3,1\%}$	$\frac{4 \pm 1}{14,2 \pm 2,2\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 2}{38,3 \pm 4,8\%}$	$\frac{13 \pm 1}{34,1 \pm 2,6\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{27,3 \pm 3,8\%}$	$\frac{13 \pm 1}{32,5 \pm 3,3\%}$	$\frac{18 \pm 2^3}{41,1 \pm 3,8\%^3}$	$\frac{7 \pm 1^2}{24,7 \pm 4,1\%}$	$\frac{11 \pm 1}{36,6 \pm 3,7\%}$	
<b>RORγt</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{28 \pm 1}{42,0 \pm 1,7\%}$	$\frac{24 \pm 1^1}{43,7 \pm 1,9\%}$	$\frac{33 \pm 1^1}{42,2 \pm 1,4\%}$	$\frac{12 \pm 1^2}{51,3 \pm 5,2\%}$	$\frac{13 \pm 1^3}{55,4 \pm 4,2\%^3}$	$\frac{9 \pm 1^2}{31,8 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{11 \pm 1^3}{38,8 \pm 3,2\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{13,6 \pm 1,1\%}$	$\frac{8 \pm 1}{14,4 \pm 1,0\%}$	$\frac{22 \pm 1^1}{28,2 \pm 0,8\%^1}$	$\frac{4 \pm 1^2}{17,9 \pm 2,7\%}$	$\frac{3 \pm 1^3}{13,5 \pm 2,5\%^3}$	$\frac{6 \pm 1^2}{19,5 \pm 2,5\%}$	$\frac{7 \pm 1^3}{23,5 \pm 2,6\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{29 \pm 3}{44,4 \pm 4,0\%}$	$\frac{23 \pm 2}{41,8 \pm 4,3\%}$	$\frac{23 \pm 1^1}{29,6 \pm 1,1\%^1}$	$\frac{7 \pm 1^2}{30,1 \pm 4,3\%}$	$\frac{7 \pm 1^3}{31,1 \pm 5,2\%}$	$\frac{14 \pm 2^2}{48,7 \pm 5,9\%}$	$\frac{11 \pm 1^3}{37,7 \pm 4,6\%}$	



Продовження табл. 5.1

Транс-крип. фактор	Серія Клас клітин	Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
		<b>Foxp3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{17 \pm 1}{34,5 \pm 2,4\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{35,0 \pm 2,5\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{32,3 \pm 3,4\%}$	$\frac{17 \pm 1^2}{40,4 \pm 3,4\%}$	$\frac{13 \pm 1}{39,3 \pm 2,9\%}$
<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{18,8 \pm 1,5\%}$		$\frac{8 \pm 1}{23,7 \pm 2,3\%}$	$\frac{7 \pm 1}{18,4 \pm 2,5\%}$	$\frac{7 \pm 1}{16,6 \pm 2,2\%^2}$	$\frac{6 \pm 1}{16,7 \pm 2,1\%}$	$\frac{7 \pm 1}{20,2 \pm 3,0\%}$	$\frac{6 \pm 1}{19,2 \pm 2,4\%}$
<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{23 \pm 2}{46,8 \pm 3,4\%}$		$\frac{14 \pm 1^1}{41,3 \pm 3,9\%}$	$\frac{19 \pm 2}{49,0 \pm 5,6\%}$	$\frac{18 \pm 2}{42,9 \pm 5,5\%}$	$\frac{15 \pm 2}{43,9 \pm 5,1\%}$	$\frac{16 \pm 1}{47,5 \pm 4,9\%}$	$\frac{18 \pm 2}{54,6 \pm 4,9\%^3}$

Примітки:

1. В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів.
2. <sup>(1)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно контролю.
3. <sup>(2)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно гострого ілеїту.
4. <sup>(3)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно хронічного ілеїту.

Таблиця 5.2

Кількість імунопозитивних лімфоцитів в ізольованих лімфоїдних вузликах клубової кишки щурів ( $M \pm m$ )

Транс-крип. фактор	Серія		Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
	Клас клітин								
<b>T-bet</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{34 \pm 1}{51,7 \pm 2,1\%}$	$\frac{25 \pm 1^1}{48,1 \pm 2,3\%}$	$\frac{37 \pm 2}{47,0 \pm 3,1\%}$	$\frac{25 \pm 2}{41,3 \pm 3,2\%}$	$\frac{24 \pm 2^3}{47,8 \pm 3,4\%}$	$\frac{22 \pm 2}{44,4 \pm 4,9\%}$	$\frac{10 \pm 1^3}{50,4 \pm 2,7\%^3}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{10 \pm 1}{15,8 \pm 1,2\%}$	$\frac{10 \pm 1}{18,8 \pm 1,5\%}$	$\frac{17 \pm 1^1}{22,3 \pm 1,0\%^1}$	$\frac{9 \pm 1}{15,5 \pm 2,1\%}$	$\frac{9 \pm 1^3}{19,0 \pm 2,4\%}$	$\frac{9 \pm 1}{19,0 \pm 2,2\%}$	$\frac{11 \pm 1^3}{16,9 \pm 1,7\%^3}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{21 \pm 2}{32,5 \pm 2,4\%}$	$\frac{17 \pm 1}{33,1 \pm 2,6\%}$	$\frac{24 \pm 2}{30,7 \pm 2,2\%}$	$\frac{26 \pm 2^2}{43,2 \pm 4,0\%^2}$	$\frac{16 \pm 2^3}{33,2 \pm 3,5\%}$	$\frac{18 \pm 2}{36,7 \pm 4,8\%}$	$\frac{17 \pm 2^3}{32,7 \pm 3,2\%^3}$	
<b>GATA3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{26 \pm 2}{51,4 \pm 3,2\%}$	$\frac{25 \pm 1}{50,3 \pm 2,1\%}$	$\frac{32 \pm 2}{52,7 \pm 3,9\%}$	$\frac{32 \pm 2^2}{41,4 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{23 \pm 2^3}{37,0 \pm 3,3\%^3}$	$\frac{23 \pm 1}{40,1 \pm 2,4\%^2}$	$\frac{29 \pm 2}{43,3 \pm 3,0\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{7 \pm 1}{13,5 \pm 1,6\%}$	$\frac{9 \pm 1}{18,0 \pm 1,8\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{17,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{14 \pm 2^2}{18,6 \pm 2,2\%}$	$\frac{13 \pm 1}{21,1 \pm 1,9\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{24,7 \pm 1,7\%^2}$	$\frac{13 \pm 1}{19,0 \pm 2,2\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{18 \pm 2}{35,1 \pm 3,5\%}$	$\frac{16 \pm 1}{31,7 \pm 2,9\%}$	$\frac{18 \pm 2}{30,4 \pm 3,3\%}$	$\frac{31 \pm 3^2}{40,0 \pm 3,3\%}$	$\frac{26 \pm 2^3}{41,9 \pm 3,7\%^3}$	$\frac{20 \pm 2^2}{35,2 \pm 3,1\%}$	$\frac{25 \pm 2^3}{37,7 \pm 3,4\%}$	
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{35 \pm 1}{45,2 \pm 1,6\%}$	$\frac{30 \pm 1^1}{44,8 \pm 2,1\%}$	$\frac{41 \pm 2^1}{39,1 \pm 1,8\%^1}$	$\frac{15 \pm 1^2}{41,4 \pm 3,8\%}$	$\frac{17 \pm 1^3}{51,3 \pm 4,4\%^3}$	$\frac{22 \pm 2^2}{44,5 \pm 4,3\%}$	$\frac{20 \pm 1^3}{50,1 \pm 3,0\%^3}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{11 \pm 1}{13,7 \pm 1,0\%}$	$\frac{10 \pm 1}{14,8 \pm 1,2\%}$	$\frac{25 \pm 1^1}{23,6 \pm 0,7\%^1}$	$\frac{8 \pm 1}{20,6 \pm 2,7\%}$	$\frac{5 \pm 1^3}{14,6 \pm 2,1\%^3}$	$\frac{11 \pm 1}{21,7 \pm 2,6\%^2}$	$\frac{10 \pm 1^3}{24,3 \pm 2,0\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{32 \pm 2}{41,1 \pm 2,8\%}$	$\frac{27 \pm 3}{40,4 \pm 3,8\%}$	$\frac{39 \pm 1^1}{37,3 \pm 1,3\%}$	$\frac{14 \pm 2^2}{38,0 \pm 4,6\%}$	$\frac{11 \pm 2^3}{34,2 \pm 4,7\%}$	$\frac{17 \pm 2^2}{33,9 \pm 3,1\%}$	$\frac{10 \pm 1^3}{25,6 \pm 2,8\%^3}$	

Продовження табл. 5.2

Транс-крип. фактор	Серія Клас клітин	Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
<b>Foxp3</b>	<i>лімфобласти</i>	23±2 37,2±2,8%	14±1 <sup>1</sup> 31,5±2,4%	<u>23±2</u> 45,7±3,1% <sup>1</sup>	<u>22±2</u> <sup>2</sup> 42,0±2,8% <sup>2</sup>	<u>20±2</u> 40,8±3,7%	<u>26±2</u> <sup>2</sup> 38,6±2,7%	<u>17±2</u> <sup>3</sup> 29,9±3,1% <sup>3</sup>
	<i>середні лімфоцити</i>	10±1 16,7±1,6%	9±1 22,2±1,9% <sup>1</sup>	<u>12±1</u> 23,9±2,2% <sup>1</sup>	<u>9±1</u> 17,2±1,8%	<u>9±1</u> <sup>3</sup> 17,2±2,3% <sup>3</sup>	<u>14±1</u> <sup>2</sup> 21,6±2,0%	<u>12±1</u> 20,3±2,1%
	<i>малі лімфоцити</i>	29±3 46,1±4,2%	20±2 <sup>1</sup> 46,3±3,5%	<u>15±2</u> <sup>1</sup> 30,3±4,8% <sup>1</sup>	<u>22±3</u> 40,8±4,8%	<u>21±2</u> 42,0±4,2%	<u>27±3</u> <sup>2</sup> 39,7±3,8%	<u>28±3</u> <sup>3</sup> 49,6±5,1% <sup>3</sup>

Примітки:

1. В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів.
2. <sup>(1)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно контролю.
3. <sup>(2)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно гострого ілеїту.
4. <sup>(3)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно хронічного ілеїту.

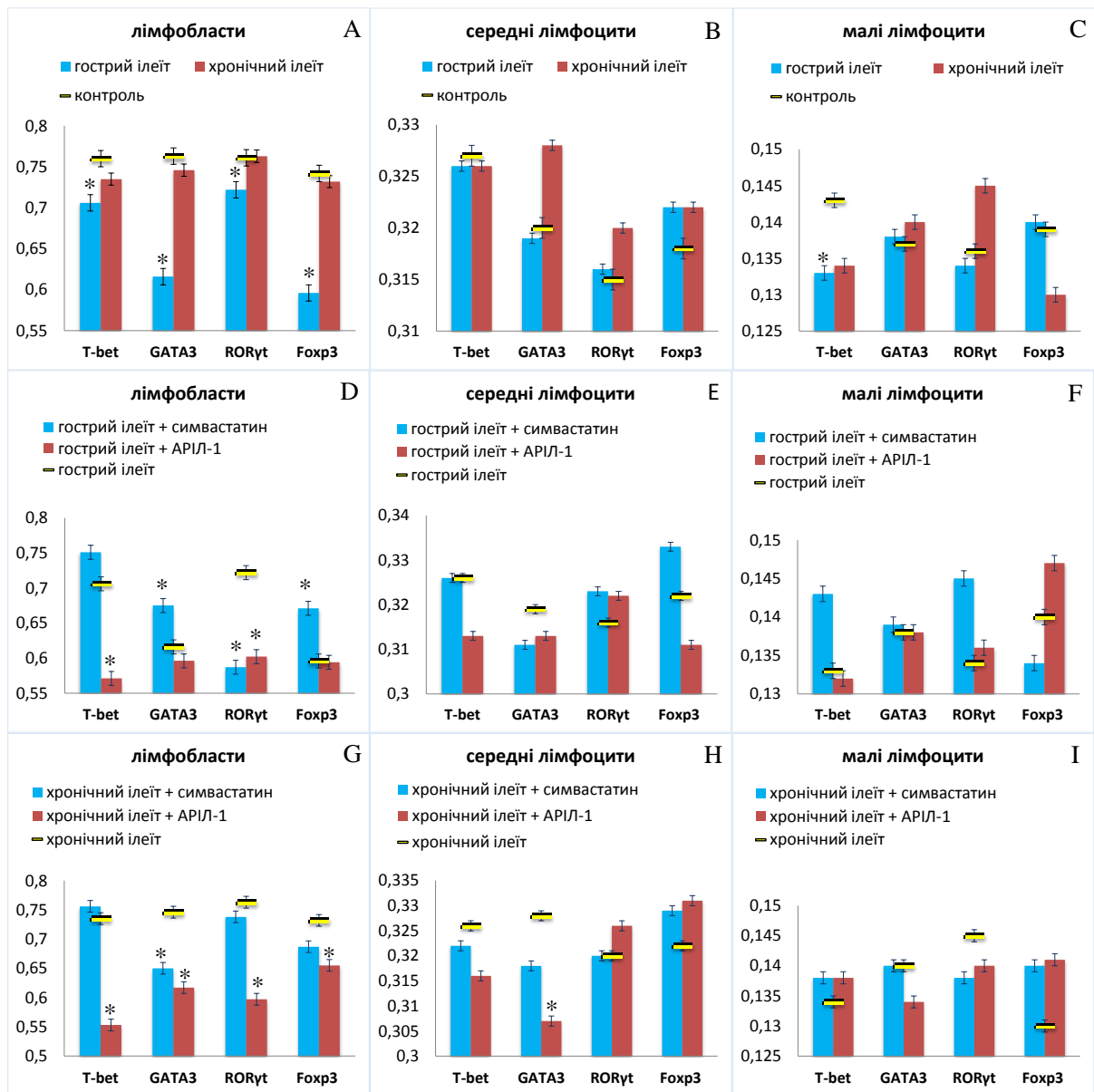


Рис. 5.2 (А-І). Концентрація транскрипційних факторів ( $YO_{1Ф}$ ) у лімфоцитах ВПСОВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого та хронічного ілеїту (А, В, С) та після введення симвастатину й АРІЛ-1 (D, E, F, G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

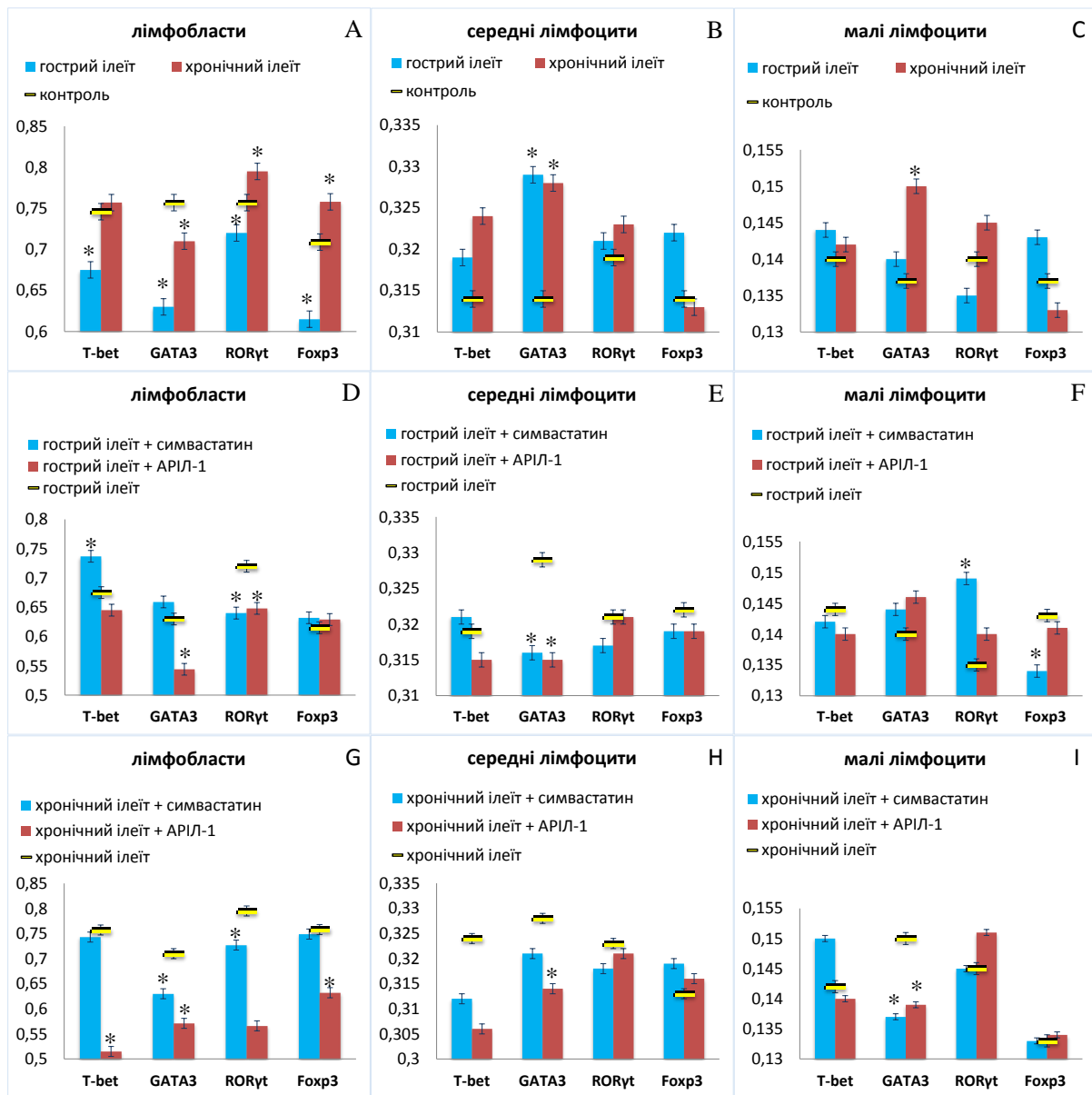


Рис. 5.3 (А-І). Концентрація транскрипційних факторів ( $YO_{1\Phi}$ ) у лімфоцитах ІЛВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого та хронічного ілеїту (А, В, С) та після введення симвастатину й АРІЛ-1 (Д, Е, Ф, Г, Н, І) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до GATA3, показав, що сумарна щільність GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 39±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 25% менше, ніж в ІЛВ. Серед GATA3<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали GATA3<sup>+</sup>-лімфобласти, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції ВПСОВ та ІЛВ були GATA3<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ не супроводжувався вірогідними змінами сумарної щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів в ІЛВ на 57% (p<0,05) у порівнянні з ЕГІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 20% (p<0,05), в ІЛВ збільшився на 18% (p<0,05) (див. рис. 5.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції GATA3<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСОВ на 60% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції у ВПСОВ GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 17% (p<0,05), в ІЛВ збільшилась щільність популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 28% (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 56% (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2 рази (p<0,05). У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігалось зменшення відсоткової долі лімфобластів в ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 86% (p<0,05), в ІЛВ збільшенням щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 56% (p<0,05) і GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 25% (p<0,05). У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів в

ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів і GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції GATA3<sup>+</sup>-клітин засвідчило, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах ВПСОВ і ІЛВ, проте в середніх лімфоцитах ІЛВ підвищилась концентрація GATA3. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах ВПСОВ і зниженням у середніх лімфоцитах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах і середніх лімфоцитах ІЛВ у порівнянні з ЕГІ (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до RORγt, показав, що сумарна щільність RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 66±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 14% менше, ніж в ІЛВ. Серед RORγt<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали RORγt<sup>+</sup>-лімфобласти та RORγt<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько 85% від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені були RORγt<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 18% (p<0,05) і в ІЛВ на 14% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки в 2,3 разів (p<0,05) і в ІЛВ на 44% (p<0,05) у порівнянні з ЕГІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 48% (p<0,05), в ІЛВ на 26% (p<0,05) (див. рис. 5.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції RORγt<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції RORγt<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 14% (p<0,05) і в ІЛВ на 14% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСОВ RORγt<sup>+</sup>-лімфобластів в 2 рази (p<0,05),

ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2 рази ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 3,3 рази ( $p < 0,05$ ). В ІЛВ зменшилась щільність популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів у 2 рази ( $p < 0,05$ ) і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 48% ( $p < 0,05$ ). Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: в 2,6 разів і на 27% ( $p < 0,05$ ), та ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2 рази і на 37% ( $p < 0,05$ ), і зменшення ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів ВПСОВ на 25% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів, в ІЛВ — ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин засвідчило, що розвиток ЕГІ супроводжувався зменшенням даного показника в лімфобластах обох морфофункціональних зон. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації ROR $\gamma$ t у лімфобластах обох морфофункціональних зон. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації ROR $\gamma$ t у лімфобластах обох морфофункціональних зон (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Foxp3, показав, що сумарна щільність Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила  $50 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 18% менше, ніж в ІЛВ. Серед Foxp3<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали Foxp3<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції були Foxp3<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ на 32% і 29% ( $p < 0,05$ ) відповідно. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням сумарної щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ на 24% і 20% ( $p < 0,05$ ). При введенні АРІЛ-1 цей показник в ІЛВ збільшився на 52% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем (див. рис. 5.1).



Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Foxp3<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів і Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 29% і 39% (p<0,05), в ІЛВ на 39% і 31% (p<0,05), у порівнянні з контролем. У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів в ІЛВ. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ і ІЛВ клубової кишки на 42% і 57% (p<0,05), відповідно. У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів у ВПСОВ та лімфобластів в ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції в ІЛВ клубової кишки: Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів на 85% (p<0,05), Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 56% (p<0,05), Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 35% (p<0,05) у порівнянні з ЕГІ (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції Foxp3<sup>+</sup>-клітин засвідчило, що розвиток ЕГІ супроводжувався зменшенням даного показника в лімфобластах обох морфофункціональних зон. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним збільшенням концентрації Foxp3 у лімфобластах ВПСОВ і зменшенням у малих лімфоцитах ІЛВ (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

*5.1.2 Експресія T-bet, GATA3, RORγt і Foxp3 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕХІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до T-bet, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ на 20% (p<0,05) і в ІЛВ на 17% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на

37% ( $p < 0,05$ ), і в ІЛВ на 35% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився на 54% і 49% ( $p < 0,05$ ) відповідно (див. рис. 5.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції T-bet<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції у ВПСОВ T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів на 31% ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2 рази ( $p < 0,05$ ) та зменшення T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 31% ( $p < 0,05$ ), в ІЛВ збільшилась щільність T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 70% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх і малих лімфоцитів, в ІЛВ тільки середніх лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ клубової кишки на 47% ( $p < 0,05$ ), в ІЛВ на 35% ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ на 47% ( $p < 0,05$ ) і T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ на 33% ( $p < 0,05$ ). Проте у ВПСОВ збільшилась щільність популяції T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,3 разів ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ. У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх класів лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ клубової кишки в 3,7 разів і зменшенням T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2 рази ( $p < 0,05$ ). В ІЛВ зменшилась щільність популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,3 разів ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 35% ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 29% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх класів лімфоцитів (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції T-bet<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію T-bet в клітині засвідчило, що введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації T-bet в лімфобластах ВПСОВ і ІЛВ, а також в середніх лімфоцитах ІЛВ у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до GATA3, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів в ІЛВ на 15% ( $p < 0,05$ ). При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 16% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 5.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції GATA3<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 33% ( $p < 0,05$ ), і збільшення GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ на 43% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: збільшилась щільність популяції GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 80% і 44% ( $p < 0,05$ ) відповідно, проте в ІЛВ зменшилась щільність популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 28% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігалось зміни відсоткової долі лімфобластів і малих лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 25% ( $p < 0,05$ ) і збільшенням GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ на 39% ( $p < 0,05$ ). (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції GATA3<sup>+</sup>-клітин засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах і збільшенням у малих лімфоцитах ІЛВ. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах ВПСОВ і зниженням у лімфобластах і малих лімфоцитах ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах ВПСОВ і зниженням у лімфобластах і малих лімфоцитах ІЛВ у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до ROR $\gamma$ t, показав, що розвиток ЕХІ

супроводжувався збільшенням сумарної щільності популяції  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки на 18% ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ на 35% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів у ВПСОВ клубової кишки в 3,4 разів ( $p < 0,05$ ) і в ІЛВ в 3,25 разів ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ і ІЛВ зменшився в 2,6 разів ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції  $ROR\gamma t^+$ -клітин засвідчило що розвиток ЕХІ супроводжувався збільшенням у ВПСОВ та ІЛВ щільності популяції  $ROR\gamma t^+$ -лімфобластів на 18% і 17% ( $p < 0,05$ ) відповідно,  $ROR\gamma t^+$ -середніх лімфоцитів в 2,4 і 2,3 разів ( $p < 0,05$ ),  $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитів в ІЛВ на 22% ( $p < 0,05$ ), а у ВПСОВ кількість  $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитів зменшилась на 21% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх і малих лімфоцитів, в ІЛВ — лімфобластів і середніх лімфоцитів. Ведення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції всіх клітин у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки:  $ROR\gamma t^+$ -лімфобластів в 2,5 і 2,4 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно,  $ROR\gamma t^+$ -середніх лімфоцитів в 7 і 5 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно,  $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитів в 3,2 і 3,5 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі  $ROR\gamma t^+$ -лімфобластів і  $ROR\gamma t^+$ -середніх лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції всіх клітин у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки:  $ROR\gamma t^+$ -лімфобластів в 3 і 2,1 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно,  $ROR\gamma t^+$ -середніх лімфоцитів в 3,1 і 2,5 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно,  $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитів в 2 і 3,9 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів в ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі  $ROR\gamma t^+$ -лімфобластів і  $ROR\gamma t^+$ -малих лімфоцитів (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції  $ROR\gamma t^+$ -клітин засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався збільшенням даного показника в

лімфобластах ІЛВ. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації ROR $\gamma$ t у лімфобластах ІЛВ. Введення АРІІ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації ROR $\gamma$ t у лімфобластах ВПСОВ (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Foxp3, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ на 24% і 19% (p<0,05) у порівнянні з контролем. При введенні симвастатину і АРІІ-1 цей показник не змінювався (див. рис. 5.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Foxp3<sup>+</sup>-клітин засвідчило що розвиток ЕХІ супроводжувався зменшенням Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 29% (p<0,05) і Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ на 48% (p<0,05). У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів, середніх та малих лімфоцитів в ІЛВ. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ на 25% (p<0,05). У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів в ІЛВ. Введення АРІІ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів на 33% і 26% (p<0,05), проте збільшилась щільність популяції Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 86% (p<0,05) у порівнянні з ЕХІ. У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах (див. табл. 5.1, табл. 5.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції Foxp3<sup>+</sup>-клітин засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався збільшенням даного показника в лімфобластах ІЛВ. Введення АРІІ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось

вірогідним зменшенням концентрації Foxp3 в лімфообластах обох морфофункціональних зон (див. рис. 5.2, рис. 5.3).

## **5.2 Особливості експресії T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального коліту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам**

*5.2.1 Експресія T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до T-bet, показав, що сумарна щільність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $65 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 41% менше, ніж в ПО. Серед T-bet<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали T-bet<sup>+</sup>-лімфообласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 23% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО в 2,3 разів ( $p < 0,05$ ), у ПО в 3 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник також зменшився — у ПО на 32% ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.4).

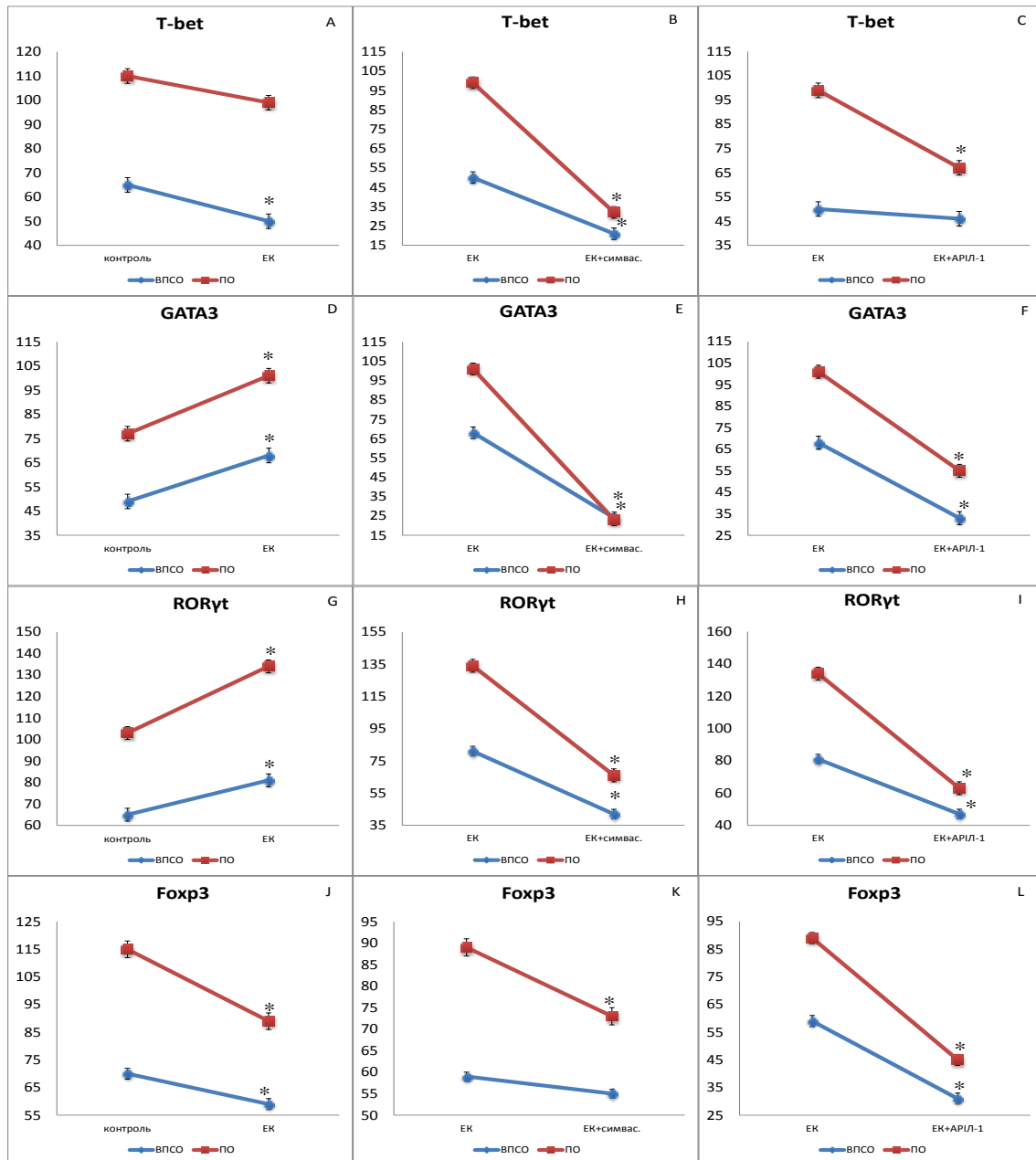


Рис. 5.4 (А-Л). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (А, D, G, J) та після введення симвастатину (В, Е, Н, К) й АРІІ-1 (С, F, I, L) експериментальним тваринам, \*— p < 0,05

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції T-bet<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення у ВПСО щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів і T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 23% і 39% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки: T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,4 рази і на 49% ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 5,5 і 7,2 разів ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 36% і в 3,5 разів ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі у ВПСО середніх лімфоцитів, у ПО лімфобластів і середніх лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ПО щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів і T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,1 разів і 34% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ПО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів і середніх лімфоцитів (табл. 5.3, табл. 5.4).

Вивчення інтенсивності флюоресценції T-bet<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію T-bet в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зниженням концентрації T-bet у лімфобластах, а також підвищенням у малих лімфоцитах ВПСО в порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації T-bet у лімфобластах ВПСО і ПО, а також зниженням концентрації в малих лімфоцитах ВПСО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації T-bet в лімфобластах ПО (рис. 5.5, рис. 5.6).



**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової  
оболонки дистального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Транс-крип. фактор	Серія Клас клітин	Контроль	Коліт	Коліт + симваста- тин	Коліт + АРІЛ-1
<b>T-bet</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{31 \pm 2}{47,3 \pm 2,7\%}$	$\frac{24 \pm 2^1}{48,2 \pm 3,1\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{47,8 \pm 4,5\%}$	$\frac{22 \pm 1}{48,0 \pm 3,0\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{11 \pm 1}{17,7 \pm 1,9\%}$	$\frac{11 \pm 1^1}{23,1 \pm 2,4\%}$	$\frac{2 \pm 1^2}{8,9 \pm 2,2\%^2}$	$\frac{9 \pm 1}{21,3 \pm 2,1\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{23 \pm 2}{35,0 \pm 2,7\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{28,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{43,3 \pm 7,5\%}$	$\frac{14 \pm 1}{31,0 \pm 3,2\%}$
<b>GATA 3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{21 \pm 1}{42,6 \pm 2,7\%}$	$\frac{26 \pm 2^1}{37,5 \pm 2,5\%}$	$\frac{13 \pm 3^2}{55,0 \pm 10,4\%}$	$\frac{15 \pm 1^2}{44,1 \pm 3,5\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{10 \pm 1}{20,3 \pm 2,5\%}$	$\frac{19 \pm 1^1}{28,4 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{3 \pm 1^2}{13,0 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{9 \pm 1^2}{25,9 \pm 2,7\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{18 \pm 2}{37,1 \pm 3,8\%}$	$\frac{23 \pm 1^1}{34,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{8 \pm 2^2}{32,0 \pm 8,9\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{29,9 \pm 3,4\%}$
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{39 \pm 2}{60,4 \pm 3,1\%}$	$\frac{25 \pm 2^1}{31,3 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{19 \pm 1^2}{45,2 \pm 3,3\%^2}$	$\frac{25 \pm 2}{53,2 \pm 3,4\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{10 \pm 1}{15,4 \pm 1,6\%}$	$\frac{15 \pm 1^1}{18,5 \pm 0,9\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{24,4 \pm 2,8\%^2}$	$\frac{6 \pm 1^2}{12,6 \pm 1,6\%^2}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{24,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{41 \pm 1^1}{50,2 \pm 1,6\%^1}$	$\frac{13 \pm 1^2}{30,4 \pm 3,0\%^2}$	$\frac{16 \pm 2^2}{34,2 \pm 3,4\%^2}$
<b>Foxp3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 2}{36,2 \pm 2,9\%}$	$\frac{25 \pm 2}{42,7 \pm 2,9\%}$	$\frac{26 \pm 2}{46,3 \pm 3,2\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{29,5 \pm 4,8\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{20 \pm 2}{29,3 \pm 2,2\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{20,4 \pm 2,4\%^1}$	$\frac{10 \pm 1}{17,7 \pm 2,0\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{26,5 \pm 2,6\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{24 \pm 2}{34,3 \pm 3,0\%}$	$\frac{22 \pm 2}{36,9 \pm 3,8\%}$	$\frac{20 \pm 2}{35,9 \pm 3,5\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{43,9 \pm 4,3\%}$

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. <sup>(1)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно контролю. <sup>(2)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у підслизовій основі дистального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Транс-крип. фактор	Серія Клас клітин	Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІЛ-1
<b>T-bet</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{46 \pm 4}{41,3 \pm 3,9\%}$	$\frac{37 \pm 3}{38,0 \pm 2,6\%}$	$\frac{19 \pm 3^2}{59,0 \pm 8,3\%^2}$	$\frac{32 \pm 2}{48,0 \pm 3,0\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{30 \pm 3}{26,7 \pm 2,3\%}$	$\frac{29 \pm 2}{29,1 \pm 2,0\%}$	$\frac{4 \pm 1^2}{12,0 \pm 2,8\%^2}$	$\frac{14 \pm 1^2}{21,3 \pm 2,1\%^2}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{35 \pm 3}{32,0 \pm 2,4\%}$	$\frac{32 \pm 3}{32,9 \pm 3,2\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{29,8 \pm 4,1\%}$	$\frac{21 \pm 2^2}{31,0 \pm 3,2\%}$
<b>GATA 3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{36 \pm 3}{47,0 \pm 4,4\%}$	$\frac{34 \pm 2}{33,8 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^2}{40,3 \pm 4,1\%}$	$\frac{16 \pm 1^2}{30,0 \pm 1,9\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{19 \pm 2}{24,2 \pm 2,5\%}$	$\frac{30 \pm 2^1}{30,2 \pm 2,1\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{25,0 \pm 4,2\%}$	$\frac{17 \pm 2^2}{32,0 \pm 2,8\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{22 \pm 2}{28,8 \pm 2,5\%}$	$\frac{37 \pm 2^1}{36,0 \pm 2,1\%^1}$	$\frac{8 \pm 2^2}{34,7 \pm 8,7\%}$	$\frac{21 \pm 2^2}{37,9 \pm 3,2\%}$
<b>ROR<math>\gamma</math>t</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{49 \pm 4}{47,7 \pm 3,5\%}$	$\frac{60 \pm 3^1}{44,9 \pm 2,3\%}$	$\frac{30 \pm 3^2}{44,8 \pm 4,7\%}$	$\frac{28 \pm 2^2}{45,4 \pm 3,0\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{24 \pm 3}{23,8 \pm 2,5\%}$	$\frac{34 \pm 2^1}{25,6 \pm 1,4\%}$	$\frac{16 \pm 1^2}{24,5 \pm 1,8\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{16,5 \pm 1,8\%^2}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{29 \pm 2}{28,5 \pm 2,2\%}$	$\frac{39 \pm 3^1}{29,5 \pm 2,0\%}$	$\frac{20 \pm 2^2}{30,7 \pm 3,3\%}$	$\frac{24 \pm 2^2}{38,1 \pm 4,0\%}$
<b>Foxp3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{37 \pm 2}{32,2 \pm 1,7\%}$	$\frac{33 \pm 2}{36,7 \pm 2,8\%}$	$\frac{32 \pm 2}{44,1 \pm 3,3\%}$	$\frac{16 \pm 2^2}{35,3 \pm 3,7\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{38 \pm 2}{32,8 \pm 2,0\%}$	$\frac{22 \pm 2^1}{24,3 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{12 \pm 1^2}{16,3 \pm 1,6\%^2}$	$\frac{12 \pm 1^2}{26,7 \pm 2,5\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{40 \pm 3}{34,9 \pm 2,2\%}$	$\frac{35 \pm 2}{39,0 \pm 2,6\%}$	$\frac{29 \pm 3}{39,5 \pm 3,6\%}$	$\frac{17 \pm 2^2}{37,9 \pm 2,6\%}$

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) — p<0,05 стосовно контролю. (2) — p<0,05 стосовно коліту.

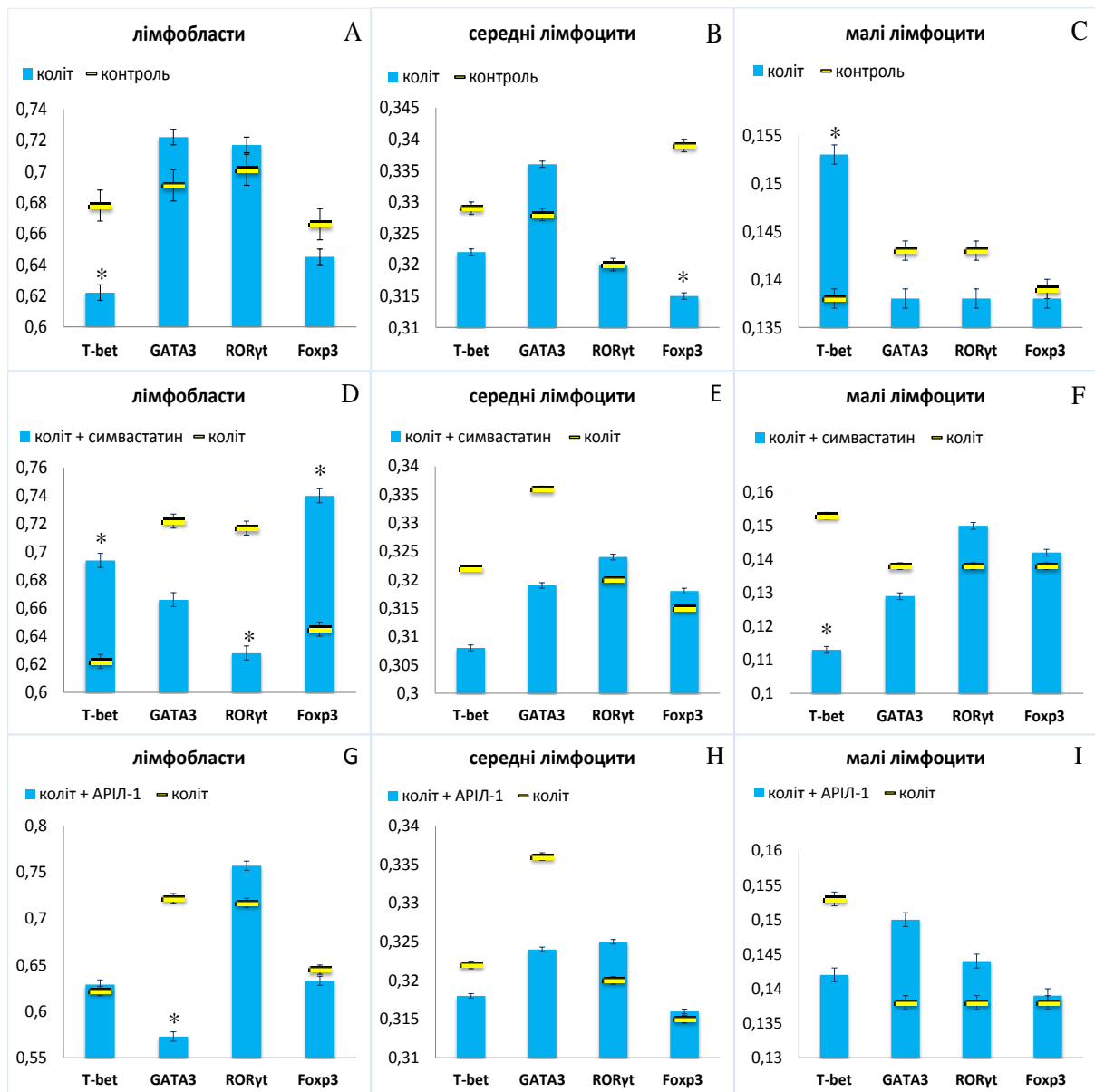


Рис. 5.5 (А-І). Концентрація транскрипційних факторів ( $YO_{1\Phi}$ ) у лімфоцитах ВПСО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й АРІЛ-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

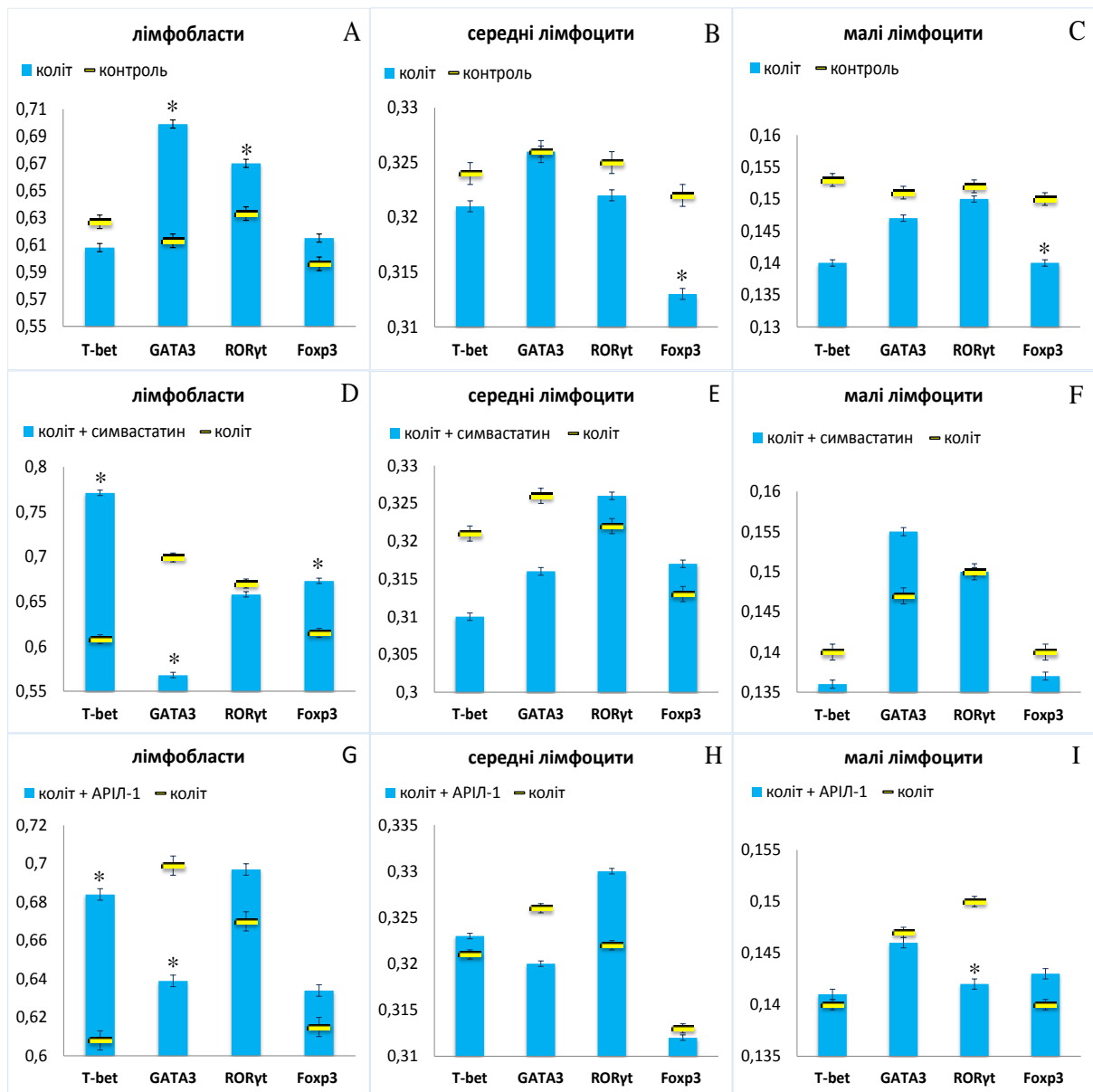


Рис. 5.6 (А-І). Концентрація транскрипційних факторів ( $YO_{1Ф}$ ) у лімфоцитах ПО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й АРІЛ-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до GATA3, показав, що сумарна щільність GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 49±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 36% менше, ніж у ПО. Серед GATA3<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали GATA3<sup>+</sup>-лімфобласти, тоді як найменше представлені у структурі популяції були GATA3<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 39% (p<0,05) і в ПО на 31% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО і ПО в 2,8 і 4 рази (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник також зменшився — у ВПСО в 2 рази (p<0,05), у ПО на 46% (p<0,05) (див. рис. 5.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції GATA3<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення у ВПСО щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 24% (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 90% (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 28% (p<0,05). У ПО збільшилась щільність популяції GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів і GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 58% і 68% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО, і GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів та GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки: GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів в 2 і 3,7 разів (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 6 і 5 разів (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,9 і 4,6 разів (p<0,05). У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів у ВПСО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 42% і 2,1 разів (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,1

разів і 43% ( $p < 0,05$ ), GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,3 разів і 43% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК (див. табл. 5.3, табл. 5.4).

Вивчення інтенсивності флюоресценції, що відображає концентрацію GATA3 в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним підвищенням концентрації GATA3 у лімфобластах ПО в порівнянні з контролем. Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації GATA3 у лімфобластах ПО (див. рис. 5.5, рис. 5.6).

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до ROR $\gamma$ t, показав, що сумарна щільність ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $65 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 37% менше, ніж в ПО. Серед ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 25% ( $p < 0,05$ ) і в ПО на 30% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 48% ( $p < 0,05$ ), і в ПО в 2 рази ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився у ВПСО на 42% ( $p < 0,05$ ), у ПО в 2,1 разів ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів у ПО на 22% ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО і ПО на 50% і 42% ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСО і ПО в 2,6 разів і 34% ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з контролем. Проте у ВПСО зменшилась кількість ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів на 36% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів і малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки: ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів на 24% і 2,2 рази ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх

лімфоцитів на 33% і в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 3,2 рази і 49% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі у ВПСО всіх класів лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,5 разів ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,6 разів ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У ПО зменшилась щільність популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,1 разів ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 3,4 раз ( $p < 0,05$ ), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 38% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі всіх класів лімфоцитів, у ПО тільки ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів (див. табл. 5.3, табл. 5.4).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію ROR $\gamma$ t в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався підвищенням даного показника в лімфобластах ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації ROR $\gamma$ t у лімфобластах ВПСО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації ROR $\gamma$ t у малих лімфоцитах ПО (див. рис. 5.5, рис. 5.6).

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Foxp3, показав, що сумарна щільність Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $70 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 39% менше, ніж у ПО. Серед Foxp3<sup>+</sup>-клітин в обох морфофункціональних зонах всі класи клітин були представлені в практично в однаковій кількості. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО та ПО на 16% і 23% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів в ПО на 18% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився у ВПСО і ПО на 47% і 49% ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 5.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Foxp3<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО та ПО на 40% і 42% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції в ПО дистального відділу товстої кишки Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 45% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ПО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,7 і 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 33% і 45% ( $p < 0,05$ ), Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 41% і 51% ( $p < 0,05$ ), у порівнянні з ЕК. У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО (див. табл. 5.3, табл. 5.4).

Вивчення інтенсивності флюоресценції Foxp3<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію Foxp3 в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зниженням концентрації Foxp3 у середніх лімфоцитах ВПСО, а також у середніх і малих лімфоцитах ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації Foxp3 у лімфобластах обох морфофункціональних зон (див. рис. 5.5, рис. 5.6).

*5.2.2 Експресія T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до T-bet, показав, що сумарна щільність T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $55 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на 17% менше, ніж у ПО. Серед T-bet<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали T-bet<sup>+</sup>-лімфобласти,



тоді як найменше представлені у структурі популяції були T-bet<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 45% ( $p < 0,05$ ) і в ПО на 45% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів в ПО на 33% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник збільшився в ПО на 33% ( $p < 0,05$ ) (рис. 5.7).

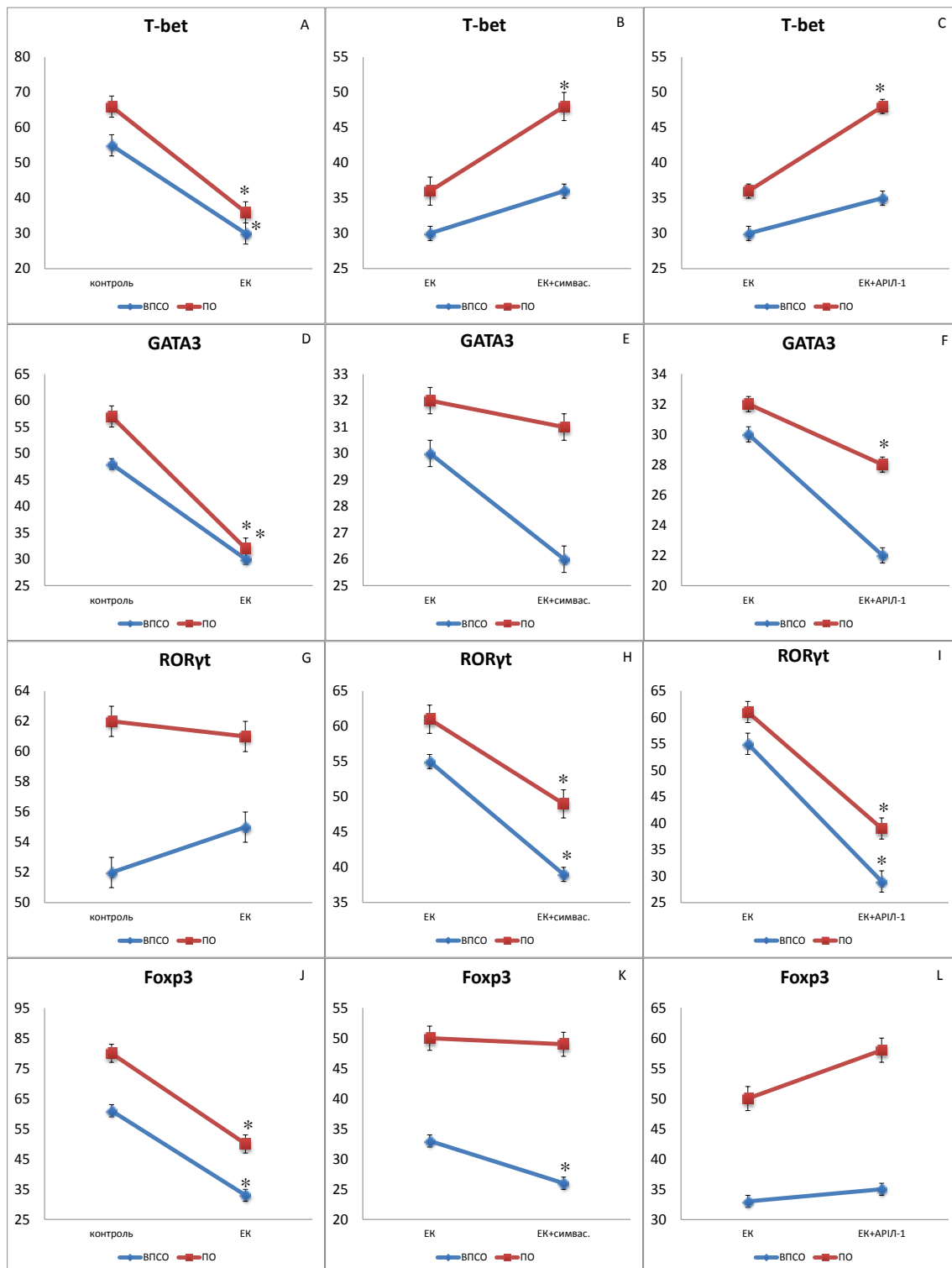


Рис. 5.7 (A-L). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (A, D, G, J) та після введення симвастатину (B, E, H, K) й APRIL-1 (C, F, I, L) експериментальним тваринам, \*—  $p < 0,05$

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції T-bet<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції у ВПСО і ПО: T-bet<sup>+</sup>-лімфобластів на 36% і 35% ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,8 і 2,6 разів ( $p < 0,05$ ), T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2 і 2 разів ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням щільності популяції у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки: T-bet<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 63% і 80% ( $p < 0,05$ ), щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів тільки у ПО на 33% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової доли лише лімфобластів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням у ПО щільності популяції T-bet<sup>+</sup>-середніх і малих лімфоцитів на 67% і 40% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК (табл. 5.5, табл. 5.6).

Вивчення інтенсивності флюоресценції T-bet<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію T-bet в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним підвищенням концентрації T-bet у лімфобластах ВПСО і ПО, а також зниженням у малих лімфоцитах ВПСО в порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації T-bet в лімфобластах ПО (рис. 5.8, рис 5.9).

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової  
оболонки проксимального відділу товстої кишки щурів (M ± m)**

Транс-крип. фактор	Серія Клас клітин	Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІЛ-1
<b>T-bet</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{28 \pm 2}{51,7 \pm 3,5\%}$	$\frac{18 \pm 1^1}{61,5 \pm 4,0\%}$	$\frac{17 \pm 1}{47,4 \pm 4,2\%^1}$	$\frac{19 \pm 1}{53,2 \pm 3,5\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{11 \pm 1}{19,4 \pm 3,5\%}$	$\frac{4 \pm 1^1}{11,9 \pm 1,8\%^1}$	$\frac{5 \pm 1}{15,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{4 \pm 1}{12,1 \pm 2,0\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 2}{28,9 \pm 3,2\%}$	$\frac{8 \pm 1^1}{26,6 \pm 4,0\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{37,4 \pm 4,0\%}$	$\frac{12 \pm 2}{34,8 \pm 5,3\%}$
<b>GATA 3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{21 \pm 1}{43,6 \pm 3,1\%}$	$\frac{16 \pm 2^1}{54,2 \pm 5,2\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{36,7 \pm 3,2\%^2}$	$\frac{8 \pm 1^2}{37,7 \pm 3,2\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{8 \pm 1}{17,7 \pm 3,1\%}$	$\frac{6 \pm 1}{21,0 \pm 2,8\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{34,3 \pm 3,4\%^2}$	$\frac{5 \pm 1}{21,8 \pm 2,7\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{19 \pm 2}{38,7 \pm 4,0\%}$	$\frac{8 \pm 2^1}{25,0 \pm 5,6\%^1}$	$\frac{8 \pm 1}{28,9 \pm 3,5\%}$	$\frac{9 \pm 2}{40,4 \pm 6,9\%}$
<b>RORγt</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{27 \pm 2}{51,4 \pm 3,2\%}$	$\frac{27 \pm 2}{48,7 \pm 2,8\%}$	$\frac{18 \pm 1^2}{45,7 \pm 3,8\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{44,3 \pm 4,0\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{17,7 \pm 1,8\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{23,0 \pm 2,1\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{16,3 \pm 2,0\%^2}$	$\frac{5 \pm 1^2}{17,6 \pm 2,7\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{49,0 \pm 2,6\%}$	$\frac{16 \pm 1}{28,4 \pm 2,4\%}$	$\frac{15 \pm 1}{38,0 \pm 3,5\%^2}$	$\frac{11 \pm 2^2}{38,1 \pm 5,6\%}$
<b>Foxp3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{23 \pm 2}{37,7 \pm 3,3\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{35,1 \pm 2,6\%}$	$\frac{10 \pm 1}{37,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{11 \pm 1}{31,7 \pm 3,4\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{24,3 \pm 2,3\%}$	$\frac{6 \pm 1^1}{18,2 \pm 2,3\%}$	$\frac{4 \pm 1}{16,3 \pm 2,4\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{28,3 \pm 2,6\%^2}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{23 \pm 2}{37,9 \pm 3,2\%}$	$\frac{16 \pm 2^1}{46,8 \pm 5,3\%}$	$\frac{12 \pm 2}{46,0 \pm 7,1\%}$	$\frac{14 \pm 1}{39,8 \pm 3,6\%}$

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) — p<0,05 стосовно контролю. (2) — p<0,05 стосовно коліту.

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у підслизовій основі  
проксимального відділу товстої кишки щурів (M ± m)**

Транс-крип. фактор	Серія Клас клітин	Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІЛ-1
<b>T-bet</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{31 \pm 2}{46,7 \pm 3,4\%}$	$\frac{20 \pm 1^1}{56,2 \pm 4,0\%}$	$\frac{21 \pm 2}{44,9 \pm 3,4\%^2}$	$\frac{24 \pm 2}{50,0 \pm 4,1\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{23,9 \pm 2,2\%}$	$\frac{6 \pm 1^1}{15,9 \pm 2,3\%^1}$	$\frac{8 \pm 1^2}{17,6 \pm 2,1\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{20,5 \pm 2,2\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{20 \pm 2}{29,5 \pm 2,8\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{28,0 \pm 3,4\%}$	$\frac{18 \pm 2^2}{37,5 \pm 3,4\%}$	$\frac{14 \pm 1^2}{29,5 \pm 2,8\%}$
<b>GATA 3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{25 \pm 2}{44,4 \pm 4,3\%}$	$\frac{18 \pm 1^1}{56,5 \pm 3,8\%^1}$	$\frac{13 \pm 1^2}{43,8 \pm 2,7\%^2}$	$\frac{14 \pm 1^2}{47,9 \pm 3,7\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{11 \pm 1}{19,3 \pm 2,2\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{20,8 \pm 2,7\%}$	$\frac{7 \pm 1}{22,9 \pm 2,9\%}$	$\frac{6 \pm 1}{21,1 \pm 3,7\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{21 \pm 2}{36,2 \pm 3,6\%}$	$\frac{7 \pm 1^1}{22,7 \pm 3,1\%^1}$	$\frac{10 \pm 1^2}{33,3 \pm 3,4\%^2}$	$\frac{9 \pm 1}{30,9 \pm 4,5\%}$
<b>RORγt</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{32 \pm 3}{51,3 \pm 4,2\%}$	$\frac{28 \pm 2}{45,2 \pm 2,7\%}$	$\frac{20 \pm 1^2}{41,2 \pm 3,0\%}$	$\frac{15 \pm 1^2}{38,9 \pm 3,7\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{23,3 \pm 2,0\%}$	$\frac{14 \pm 1}{23,1 \pm 1,9\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{16,7 \pm 2,2\%^2}$	$\frac{7 \pm 1^2}{17,5 \pm 2,1\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 2}{25,5 \pm 2,5\%}$	$\frac{19 \pm 2}{31,7 \pm 2,8\%}$	$\frac{20 \pm 2}{42,0 \pm 3,9\%^2}$	$\frac{17 \pm 2}{43,6 \pm 4,4\%^2}$
<b>Foxp3</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{24 \pm 2}{29,8 \pm 2,7\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{25,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{15 \pm 2}{30,3 \pm 3,1\%}$	$\frac{16 \pm 1}{26,8 \pm 2,5\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{24 \pm 2}{29,5 \pm 2,7\%}$	$\frac{12 \pm 1^1}{23,3 \pm 2,5\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{16,8 \pm 1,9\%^2}$	$\frac{15 \pm 1}{25,3 \pm 2,2\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{33 \pm 2}{40,6 \pm 2,6\%}$	$\frac{25 \pm 2^1}{51,0 \pm 4,7\%}$	$\frac{26 \pm 3}{52,8 \pm 5,1\%}$	$\frac{28 \pm 2}{47,9 \pm 4,1\%}$

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на 1мм<sup>2</sup>), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. (1) — p<0,05 стосовно контролю. (2) — p<0,05 стосовно коліту.

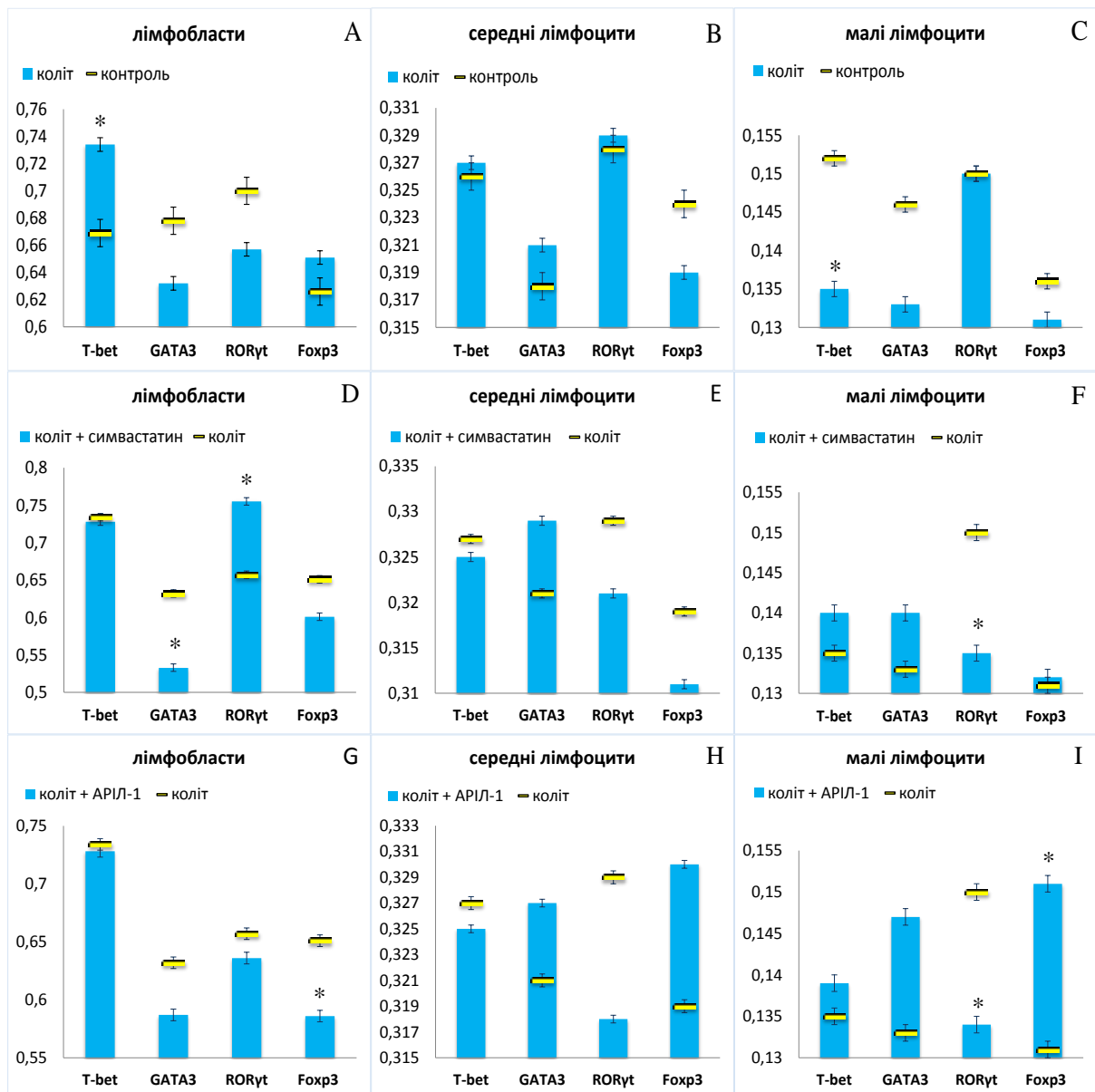


Рис. 5.8 (А-І). Концентрація транскрипційних факторів ( $YO_{1\Phi}$ ) у лімфоцитах ВПСО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й АРІЛ-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

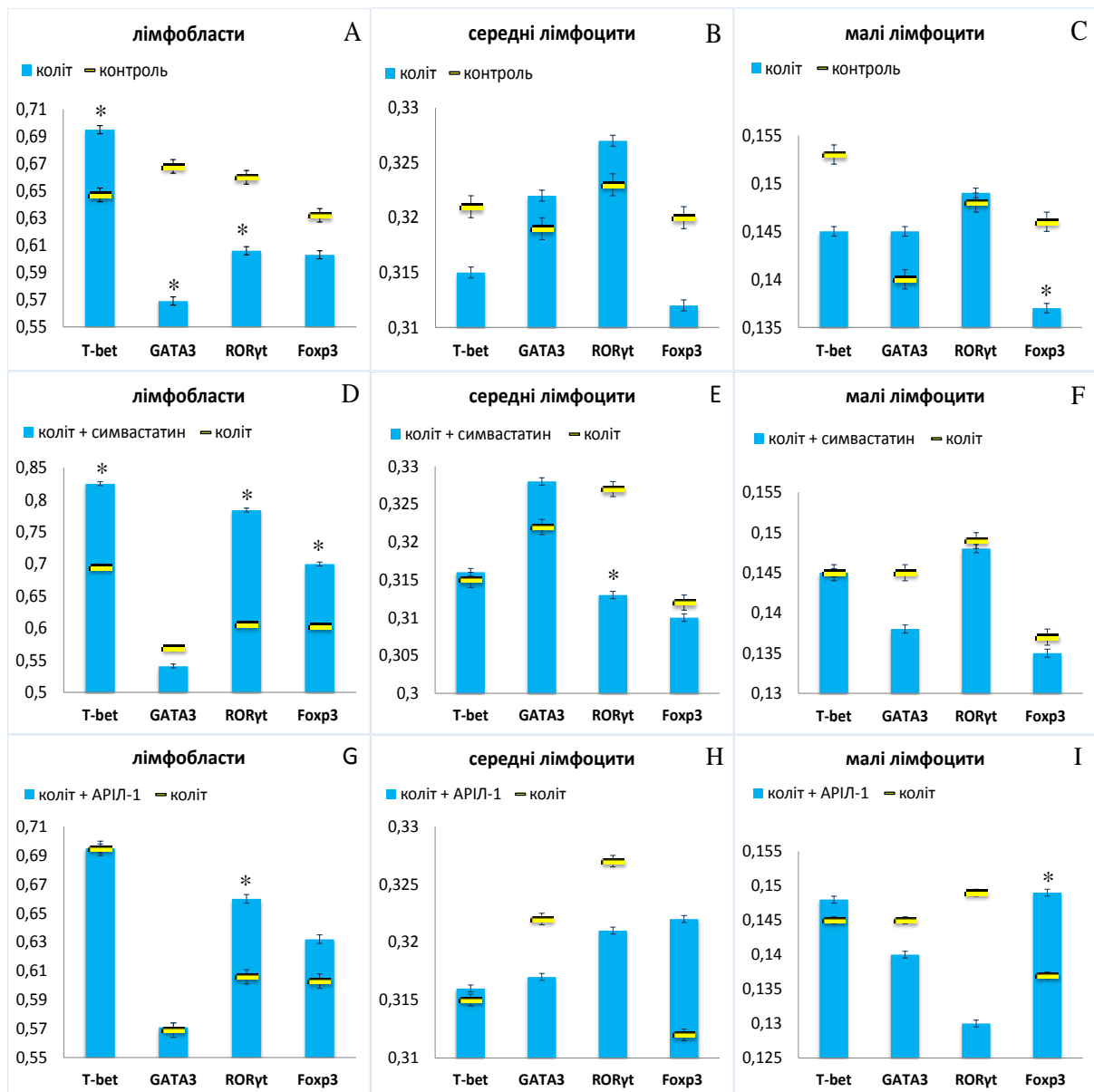


Рис. 5.9 (А-І). Концентрація транскрипційних факторів ( $Y_{OI\Phi}$ ) у лімфоцитах ПО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й APII-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до GATA3, показав, що сумарна щільність GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 48±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 16% менше, ніж в ПО. Серед GATA3<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали GATA3<sup>+</sup>-лімфобласти та малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були GATA3<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 38% (p<0,05) і в ПО на 44% (p<0,05). При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився тільки у ВПСО на 27% (p<0,05) (див. рис. 5.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції GATA3<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції у ВПСО та ПО GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 24% і 28% (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в 2,3 і 3 рази (p<0,05), GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів тільки в ПО на 36% (p<0,05), у порівнянні з контролем. У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСО і лімфобластів і малих лімфоцитів у ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів на 38 і 28% (p<0,05), збільшенням GATA3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО на 50% (p<0,05), збільшенням GATA3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ПО на 42% (p<0,05). У структурі популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лімфобластів і середніх лімфоцитів у ВПСО, лімфобластів і малих лімфоцитів у ПО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО і ПО щільності популяції GATA3<sup>+</sup>-лімфобластів в 2 рази і 22% (p<0,05) у порівнянні з ЕК (див. табл. 5.5, табл. 5.6.).

Вивчення інтенсивності флюоресценції, що відображає концентрацію GATA3 в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним



зниженням концентрації GATA3 в лімфобластах ВПСО у порівнянні з контролем (див. рис. 5.8, рис. 5.9).

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до ROR $\gamma$ t, показав, що сумарна щільність ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 52±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 16% менше, ніж в ПО. Серед ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕК не супроводжувався вірогідними змінами сумарної щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 29% (p<0,05) і у ПО на 20% (p<0,05), у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився на 47% і 36% (p<0,05) (див. рис. 5.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО на 44% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки: ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів на 33% і 29% (p<0,05), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,2 разів і на 43% (p<0,05). У структурі популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх і малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО і ПО щільності популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,1 разів і 46% (p<0,05), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,6 і 2 рази (p<0,05) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів в ПО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі лише малих лімфоцитів (див. табл. 5.5, табл. 5.6).

Вимірювання інтенсивності флуоресценції ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію ROR $\gamma$ t в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався зниженням даного показника в лімфобластах ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням

концентрації ROR $\gamma$ t в лімфобластах ВПСО і ПО, а також зниженням в малих лімфоцитах ВПСО і середніх лімфоцитах ПО. Введення АРІІ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації ROR $\gamma$ t в лімфобластах і зниженням в малих лімфоцитах ПО (див. рис. 5.8, рис. 5.9).

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Foxp3, показав, що сумарна щільність Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 61±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 24% менше, ніж в ПО. Серед Foxp3<sup>+</sup>-клітин у ВПСО і ПО всі клітини були практично рівномірно представлені. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався зменшенням сумарної щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО і ПО на 46% і 38% (p<0,05) відповідно. При введенні симвастатину цей показник зменшився у ВПСО на 21% (p<0,05) (див. рис. 5.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Foxp3<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення у ВПСО та ПО щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфобластів на 48% і 46% (p<0,05), Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,5 і 2 рази (p<0,05), Foxp3<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 30% і 24% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ПО Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 33% (p<0,05). У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів у ПО. Введення АРІІ-1 щурам з ЕК супроводжувалось збільшенням у ВПСО щільності популяції Foxp3<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 67% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів у ВПСО (див. табл. 5.5, табл. 5.6).

Вивчення інтенсивності флуоресценції Foxp3<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію Foxp3 в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним зниженням концентрації Foxp3 у малих лімфоцитах ПО в порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації Foxp3 у

лімфобластах ПО. Введення APII-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації Foxp3 у малих лімфоцитах ВПСО і ПО, а також зниженням у лімфобластах ВПСО (див. рис. 5.8, рис. 5.9).

Таким чином, проведено дослідження особливостей експресії T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t і Foxp3 у нормі та в експериментальних тварин дозволяє зробити наступні проміжні висновки:

1. Розвиток ЕГІ супроводжується зменшенням кількості імунопозитивних клітин: T-bet<sup>+</sup>-, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів. При цьому кількість GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів не змінювалась. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>- і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів, а також зменшенням Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів.

2. Ефекти від введень симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшилась кількість ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшилась GATA3<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав зменшення T-bet<sup>+</sup>- і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів. Ефекти від введень APII-1 теж залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшувалась кількість T-bet<sup>+</sup>- і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшувалась кількість GATA3<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, введення APII-1 тваринам з ЕХІ викликало зменшення T-bet<sup>+</sup>- і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів, та збільшення GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів.

3. Розвиток ЕК супроводжується зменшенням практично всіх досліджуваних імунопозитивних клітин в проксимальному відділі товстої кишки окрім ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів, на відміну від дистального відділу де спостерігалось збільшення GATA3<sup>+</sup>- і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів і зменшення T-bet<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів.

4. Введення симвастатину і APII-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості всіх досліджуваних імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки. Однак в проксимальному відділі збільшилась кількість T-bet<sup>+</sup>-лімфоцитів і не змінилась кількість GATA3<sup>+</sup>-

лімфоцитів при введенні симвастатину, а також Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів при введенні АРІІ-1.

Результати досліджень, наведені в цій главі, опубліковані в наступних роботах:

1. 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. — Т. 36, № 3. — С. 139-144
2. 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.
3. Жеребятъев А. С. Роль транскрипционных факторов T-bet и GATA-3 в развитии острого илеита у крыс / А. С. Жеребятъев, А. М. Камышный // Российский иммунологический журнал. — 2014. — № 3. — С. 314–316.
4. 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.
5. Zherebiatiev A. S. Foxp3<sup>+</sup> 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.
6. 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/dop073-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>.
  7. 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.
  8. Жеребят'єв 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. Жеребят'єв, А. М. Камышный // Клиническая и экспериментальная морфология. — 2015. — № 3 (15). — С. 42-47.

## РОЗДІЛ 6

### ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКСПРЕСІЇ AhR І Atg16 У НОРМІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Важливий внесок у розвиток ЗЗК вносять фактори навколишнього середовища: куріння, мікроорганізми, НПЗЗ, антибіотики, стрес і продукти харчування. AhR активуються великою кількістю вищезазначених факторів, модулюють активність імунних і не імунних клітин в кишківнику, і можуть являти собою важливу ланку між навколишнім середовищем та імунними збуреннями, які лежать в основі патогенезу ЗЗК. Недавні дослідження в різних мишачих моделях коліту допомогли виявити важливість механізмів дисфункції AhR у розвитку ЗЗК [15]. Наявність цих рецепторів є необхідним для утворення певних популяцій імунних клітин в кишківнику. Крім того, харчові ліганди для AhR, а також ліганди які виробляються бактеріями ШКТ, взаємодіють і змінюють систему КАЛТ. Мікробіота генерує ліганди, які взаємодіють з AhR і підтримують структуру і стабільність імунітету кишківника. Фізіологічна важливість AhR показана також при апоптозі [106] і відповіді на стрес ендоплазматичного ретикулума (СЕР) [108]. Апоптоз нерозривно пов'язаний з аутофагією — фундаментальною і еволюційно високо-консервативною відповіддю на голодування. Аутофагія представляє лізосомальний шлях, який бере участь в обігу клітинних макромолекул і органел і відіграє важливу роль в різних біологічних процесах — інфекція, імунітет, рак і старіння. Аутофагія активується різними факторами і складається з утворення аутофагосом з подвійною мембраною які поглинають вміст клітини і пізніше зливаються з лізосомами. Зв'язок між СЕР і аутофагією включає кілька рівнів й імовірно відрізняється між типами клітин. Вона також відіграє важливу роль в імунній системі для елімінації внутрішньоклітинних збудників, презентації ендогенних антигенів і

формування В- і Т-клітин. Ген *Atg16l1* кодує однойменний білок Atg16L1 який безпосередньо бере участь у процесі аутофагії, і має вирішальне значення для її індукції. Білковий кон'югат Atg5-Atg12 взаємодіє з Atg16L1 і формує комплекс з високою молекулярною масою, необхідний для елонгації аутофагосомальної мембрани. Активація каспази-3 у присутності загальної алелі ризику, призводить до прискореної деградації ATG16L1, клітинного стресу, апоптозу і порушення аутофагії в єдиному шляху, який зумовлює розвиток ХК [179]. Saitoh et al. показали, що у Atg16L1-дефіцитних химерних мишей з DSS-колітом помітно загострився перебіг захворювання зі зниженим виживанням. Миші з нестачею Atg16L1 в кровотворних клітинах дуже чутливі до розвитку коліту, який послаблюється шляхом введення анти-IL-1 і IL-18 антитіл, що вказує на важливість Atg16L1 в пригніченні запалення кишківника [51]. Таким чином, існує зв'язок між AhR, апоптозом, відповіддю на CEP, аутофагією і Atg16L1 [180, 181].

**6.1 Особливості експресії AhR і Atg16 в ізольованих лімфоїдних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, експериментального хронічного ілеїту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам**

*6.1.1 Експресія AhR і Atg16 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕГІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до AhR, показав, що сумарна щільність AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 32±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 38% менше, ніж

в ІЛВ. Серед AhR<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали AhR<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції ВПСОВ були AhR<sup>+</sup>-лімфобласти, в ІЛВ — AhR<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів в ІЛВ на 25% ( $p < 0,05$ ). Введення симвастатину щурам з ЕГІ не супроводжувалось вірогідною зміною сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився на 41% ( $p < 0,05$ ), в ІЛВ на 29% ( $p < 0,05$ ) (рис. 6.1).

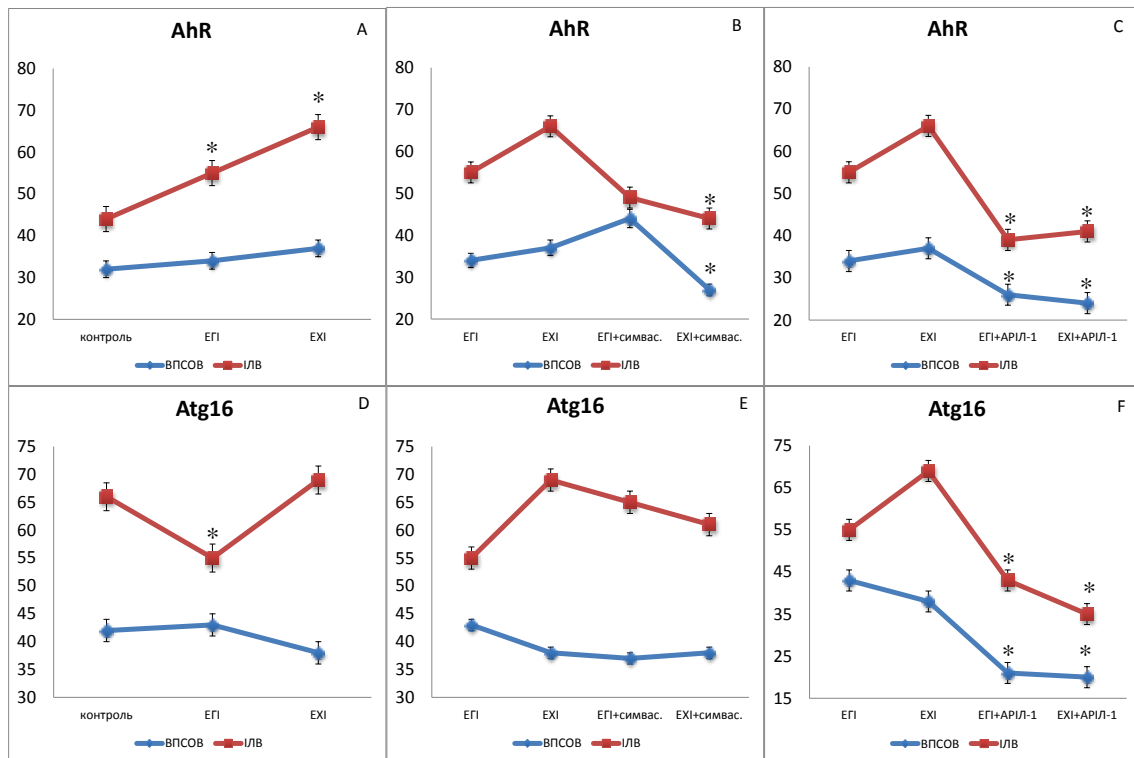


Рис. 6.1 (А-F). Сумарна щільність (на 1мм<sup>2</sup>) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого (ЕГІ) та хронічного ілеїту (ЕХІ) (А, D) та після введення симвастатину (В, Е) й АРІЛ-1 (С, F) експериментальним тваринам, \*—  $p < 0,05$



Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції AhR<sup>+</sup>-клітин при розвитку ЕГІ засвідчило збільшення щільності популяції AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСОВ на 42% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось збільшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ВПСОВ на 41% ( $p < 0,05$ ), проте зменшилась щільність популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів в ІЛВ на 40% ( $p < 0,05$ ). Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСОВ на 30% ( $p < 0,05$ ), зменшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів в ІЛВ на 33% ( $p < 0,05$ ) і AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 32% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕГІ (табл. 6.1, табл. 6.2).

Вивчення щільності AhR рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕГІ не супроводжувався вірогідними змінами даного показника. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності AhR у лімфобластах ІЛВ у порівнянні з ЕГІ (рис. 6.2, рис. 6.3).

Таблиця 6.1

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки щурів  
( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
	Клас клітин								
AhR	лімфобласти	$\frac{5 \pm 1}{16,8 \pm 3,0\%}$	$\frac{8 \pm 1}{22,4 \pm 3,5\%}$	$\frac{17 \pm 2^1}{47,4 \pm 4,2\% ^1}$	$\frac{10 \pm 1}{23,6 \pm 3,3\%}$	$\frac{8 \pm 1^3}{29,2 \pm 3,8\% ^3}$	$\frac{6 \pm 1}{24,4 \pm 3,2\%}$	$\frac{4 \pm 1^3}{16,8 \pm 3,1\% ^3}$	
	середні лімфоцити	$\frac{7 \pm 1}{20,5 \pm 2,9\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{28,4 \pm 3,3\%}$	$\frac{6 \pm 1}{15,9 \pm 2,1\%}$	$\frac{9 \pm 1}{21,3 \pm 2,8\%}$	$\frac{5 \pm 1}{19,4 \pm 2,4\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{25,5 \pm 3,6\%}$	$\frac{4 \pm 1}{18,2 \pm 2,8\%}$	
	малі лімфоцити	$\frac{20 \pm 3}{62,6 \pm 1,3\%}$	$\frac{17 \pm 2}{49,2 \pm 4,6\%}$	$\frac{14 \pm 1}{36,6 \pm 4,0\% ^1}$	$\frac{24 \pm 3^2}{55,1 \pm 6,1\%}$	$\frac{14 \pm 2}{51,3 \pm 5,6\% ^3}$	$\frac{13 \pm 2}{50,0 \pm 6,2\%}$	$\frac{16 \pm 2}{65,0 \pm 6,0\% ^3}$	
Atg16	лімфобласти	$\frac{10 \pm 1}{24,3 \pm 3,2\%}$	$\frac{15 \pm 2^1}{36,4 \pm 4,0\% ^1}$	$\frac{17 \pm 2^1}{43,6 \pm 3,9\% ^1}$	$\frac{8 \pm 1^2}{20,4 \pm 2,9\% ^2}$	$\frac{9 \pm 1^3}{25,2 \pm 3,1\% ^3}$	$\frac{5 \pm 1^2}{23,0 \pm 3,7\% ^2}$	$\frac{6 \pm 1^3}{28,8 \pm 3,6\% ^3}$	
	середні лімфоцити	$\frac{8 \pm 1}{19,2 \pm 2,0\%}$	$\frac{8 \pm 1}{19,7 \pm 1,9\%}$	$\frac{7 \pm 1}{18,9 \pm 2,1\%}$	$\frac{10 \pm 1}{26,7 \pm 3,1\%}$	$\frac{7 \pm 1}{17,3 \pm 2,4\%}$	$\frac{6 \pm 1}{28,7 \pm 4,0\%}$	$\frac{4 \pm 1^3}{19,3 \pm 2,9\%}$	
	малі лімфоцити	$\frac{24 \pm 2}{56,6 \pm 5,3\%}$	$\frac{19 \pm 2}{43,8 \pm 4,9\%}$	$\frac{14 \pm 1^1}{37,3 \pm 3,7\% ^1}$	$\frac{19 \pm 2}{52,8 \pm 5,0\%}$	$\frac{22 \pm 3^3}{57,4 \pm 7,7\% ^3}$	$\frac{10 \pm 1^2}{48,2 \pm 6,6\%}$	$\frac{10 \pm 1}{51,8 \pm 6,1\% ^3}$	

Примітки:

1. В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів.
2. <sup>(1)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно контролю.
3. <sup>(2)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно гострого ілеїту.
4. <sup>(3)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно хронічного ілеїту.

Таблиця 6.2

Кількість імунопозитивних лімфоцитів в ізольованих лімфоїдних вузликах клубової кишки щурів ( $M \pm m$ )

Рецептор	Серія		Контроль	Гострий ілеїт	Хронічний ілеїт	Гострий ілеїт + симвастатин	Хронічний ілеїт + симвастатин	Гострий ілеїт + АРІЛ-1	Хронічний ілеїт + АРІЛ-1
	Клас клітин								
AhR	лімфобласти	$\frac{12 \pm 2}{27,8 \pm 3,9\%}$	$\frac{15 \pm 2}{28,2 \pm 4,1\%}$	$\frac{33 \pm 3^1}{49,9 \pm 4,4\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{18,4 \pm 2,9\%}$	$\frac{7 \pm 1^3}{16,3 \pm 2,8\%}$	$\frac{10 \pm 1^2}{25,7 \pm 2,7\%}$	$\frac{8 \pm 1^3}{18,6 \pm 3,5\%}$	
	середні лімфоцити	$\frac{8 \pm 1}{19,0 \pm 2,7\%}$	$\frac{12 \pm 1}{21,5 \pm 2,2\%}$	$\frac{11 \pm 1}{17,1 \pm 1,5\%}$	$\frac{11 \pm 1}{22,2 \pm 2,6\%}$	$\frac{6 \pm 1^3}{13,0 \pm 2,6\%}$	$\frac{10 \pm 1}{26,2 \pm 3,3\%}$	$\frac{8 \pm 1^3}{18,8 \pm 2,4\%}$	
	малі лімфоцити	$\frac{23 \pm 2}{53,2 \pm 4,3\%}$	$\frac{28 \pm 2}{50,4 \pm 4,4\%}$	$\frac{22 \pm 2}{32,9 \pm 2,8\%}$	$\frac{29 \pm 3}{59,3 \pm 5,5\%}$	$\frac{31 \pm 4^3}{70,7 \pm 8,5\%}$	$\frac{19 \pm 2^2}{48,0 \pm 6,0\%}$	$\frac{26 \pm 2}{62,5 \pm 6,2\%}$	
Atg16	лімфобласти	$\frac{15 \pm 2}{22,4 \pm 3,0\%}$	$\frac{17 \pm 2}{30,6 \pm 3,2\%}$	$\frac{25 \pm 2^1}{36,8 \pm 3,3\%}$	$\frac{17 \pm 2}{25,5 \pm 2,8\%}$	$\frac{13 \pm 1^3}{20,9 \pm 2,3\%}$	$\frac{11 \pm 2^2}{26,4 \pm 3,5\%}$	$\frac{8 \pm 1^3}{24,0 \pm 2,7\%}$	
	середні лімфоцити	$\frac{13 \pm 1}{19,5 \pm 2,3\%}$	$\frac{10 \pm 1}{18,8 \pm 1,8\%}$	$\frac{14 \pm 1}{20,0 \pm 1,9\%}$	$\frac{15 \pm 1^2}{22,2 \pm 2,2\%}$	$\frac{12 \pm 1}{20,3 \pm 2,0\%}$	$\frac{12 \pm 1}{27,4 \pm 2,4\%}$	$\frac{7 \pm 1^3}{21,2 \pm 1,9\%}$	
	малі лімфоцити	$\frac{39 \pm 3}{58,1 \pm 4,4\%}$	$\frac{28 \pm 2^1}{50,6 \pm 4,1\%}$	$\frac{30 \pm 2^1}{43,2 \pm 3,4\%}$	$\frac{34 \pm 2}{52,2 \pm 3,8\%}$	$\frac{36 \pm 3}{58,7 \pm 5,5\%}$	$\frac{20 \pm 2^2}{46,1 \pm 3,9\%}$	$\frac{19 \pm 2^3}{53,8 \pm 3,8\%}$	

Примітки:

1. В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів.
2. <sup>(1)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно контролю.
3. <sup>(2)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно гострого ілеїту.
4. <sup>(3)</sup> — вірогідність відмінностей показників  $p < 0,05$  стосовно хронічного ілеїту.

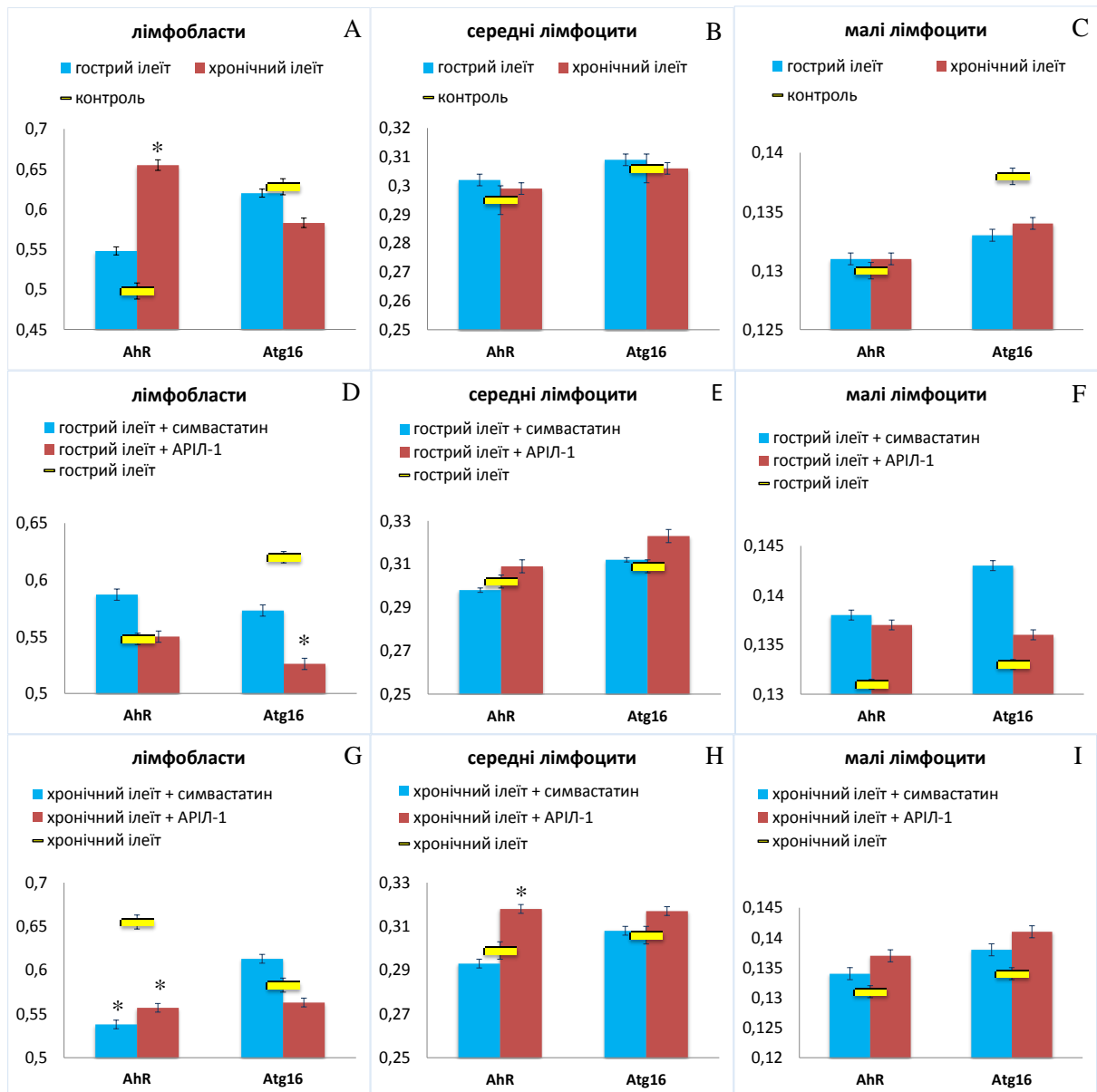


Рис. 6.2 (А-І). Щільність рецепторів ( $Y_{01\Phi}$ ) у лімфоцитах ВПСОВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого та хронічного ілеїту (А, В, С) та після введення симвастатину й АРІЛ-1 (Д, Е, Ф, Г, Н, І) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

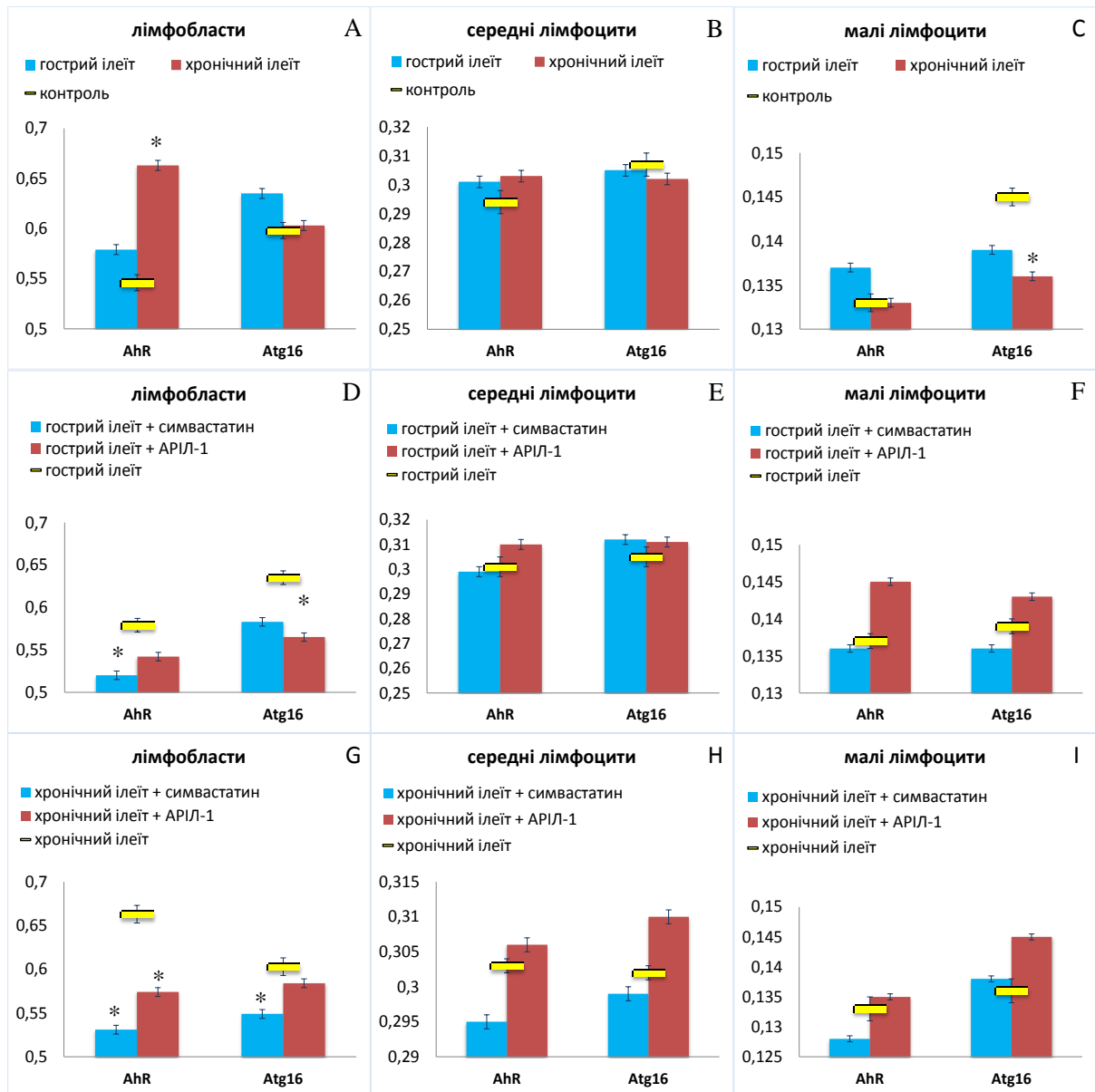


Рис. 6.3 (А-І). Щільність рецепторів ( $Y_{010}$ ) у лімфоцитах ІЛВ клубової кишки при розвитку експериментального гострого та хронічного ілеїту (А, В, С) та після введення симвастатину й АРІЛ-1 (D, E, F, G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Atg16, показав, що сумарна щільність Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ становила 42±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 36% менше, ніж в ІЛВ. Серед Atg16<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали Atg16<sup>+</sup>-малі лімфоцити, на частку яких припадало близько половини від загальної кількості імунопозитивних лімфоцитів, тоді як найменше представлені у структурі популяції ВПСОВ та ІЛВ були Atg16<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕГІ супроводжувався вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів в ІЛВ на 17% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕГІ не супроводжувалось вірогідними змінами сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ВПСОВ зменшився в 2 рази (p<0,05), в ІЛВ на 22% (p<0,05) (див. рис. 6.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Atg16<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ на 50% (p<0,05) та зменшення в ІЛВ Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 28% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі тільки Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів. Введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСОВ клубової кишки Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів на 47% (p<0,05), проте збільшилась щільність популяції в ІЛВ Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 50% (p<0,05) відповідно. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі тільки Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки: Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів в 3 рази і 35% (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 47% і 29% (p<0,05) відповідно. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі тільки Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів (див. табл. 6.1, табл. 6.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції Atg16<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію Atg16 в клітині засвідчило, що введення симвастатину щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним підвищенням концентрації Atg16 в малих лімфоцитах ВПСОВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕГІ супроводжувалось вірогідним зменшенням концентрації Atg16 в лімфобластах ВПСОВ і ІЛВ у порівнянні з ЕГІ (див. рис. 6.2, рис. 6.3).

*6.1.2 Експресія AhR і Atg16 в ІЛВ і ВПСОВ клубової кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕХІ та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до AhR, показав, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів в ІЛВ на 50% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ клубової кишки на 27% і 33% (p<0,05) у порівнянні з ЕХІ. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився на 35% і 38% (p<0,05) відповідно (див. рис. 6.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції AhR<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ в 3,4 рази (p<0,05) та в ІЛВ в 2,8 разів (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі AhR<sup>+</sup>-лімфобластів і AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ і ІЛВ клубової кишки в 2,1 і 4,7 разів (p<0,05), зменшенням щільності популяції в ІЛВ AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 45% (p<0,05) і збільшенням AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в ІЛВ на 40% (p<0,05) у порівнянні з ЕХІ. У структурі популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової

долі AhR<sup>+</sup>-лімфобластів і AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ і ІЛВ клубової кишки в 4,3 і 4,1 разів ( $p < 0,05$ ) і зменшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в ІЛВ клубової кишки на 27% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі AhR<sup>+</sup>-лімфобластів і AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів (див. табл. 6.1, табл. 6.2).

Вивчення щільності AhR рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕХІ супроводжувався вірогідним збільшенням даного показника в AhR<sup>+</sup>-лімфобластах ВПСОВ і ІЛВ у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності AhR у лімфобластах ВПСОВ і ІЛВ. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням щільності AhR у лімфобластах обох морфофункціональних зон у порівнянні з ЕХІ а також збільшенням у середніх лімфоцитах ІЛВ (див. рис. 6.2, рис. 6.3).

Аналіз серійних зрізів клубової кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Atg16, показав, що розвиток ЕХІ не супроводжувався змінами сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ на 47% і 49% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 6.1).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Atg16<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСОВ та ІЛВ на 70% і 66% ( $p < 0,05$ ) і зменшення Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 42% і 23% ( $p < 0,05$ ) відповідно. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів та Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСОВ та ІЛВ клубової кишки Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів на 47% і 48% ( $p < 0,05$ ), а також збільшенням у ВПСОВ щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 57%



відповідно. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів і Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕХІ супроводжувалось зменшенням щільності популяції майже всіх імунопозитивних клітин у ВПСОВ та ІЛВ: Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,8 і 3,1 разів ( $p < 0,05$ ) Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів на 43% і в 2 рази ( $p < 0,05$ ), Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів тільки в ІЛВ на 37% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСОВ і ІЛВ спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів і Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів (див. табл. 6.1, табл. 6.2).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції Atg16<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію Atg16 в клітині засвідчило, що введення симвастатину щурам з ЕХІ супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації Atg16 у лімфобластах ІЛВ у порівнянні з ЕХІ (див. рис. 6.2, рис. 6.3).

## **6.2 Особливості експресії AhR і Atg16 у власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку експериментального коліту та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1 експериментальним тваринам**

*6.2.1 Експресія AhR і Atg16 у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до AhR, показав, що сумарна щільність AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила  $46 \pm 1$  на  $1 \text{ мм}^2$ , що на

25% менше, ніж у ПО. Серед AhR<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали AhR<sup>+</sup>-малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були AhR<sup>+</sup>-лімфобласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕК не супроводжувався вірогідними змінами сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів в ПО на 24% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник у ПО ще більше зменшився — в 2,1 разів ( $p < 0,05$ ) (рис. 6.4).

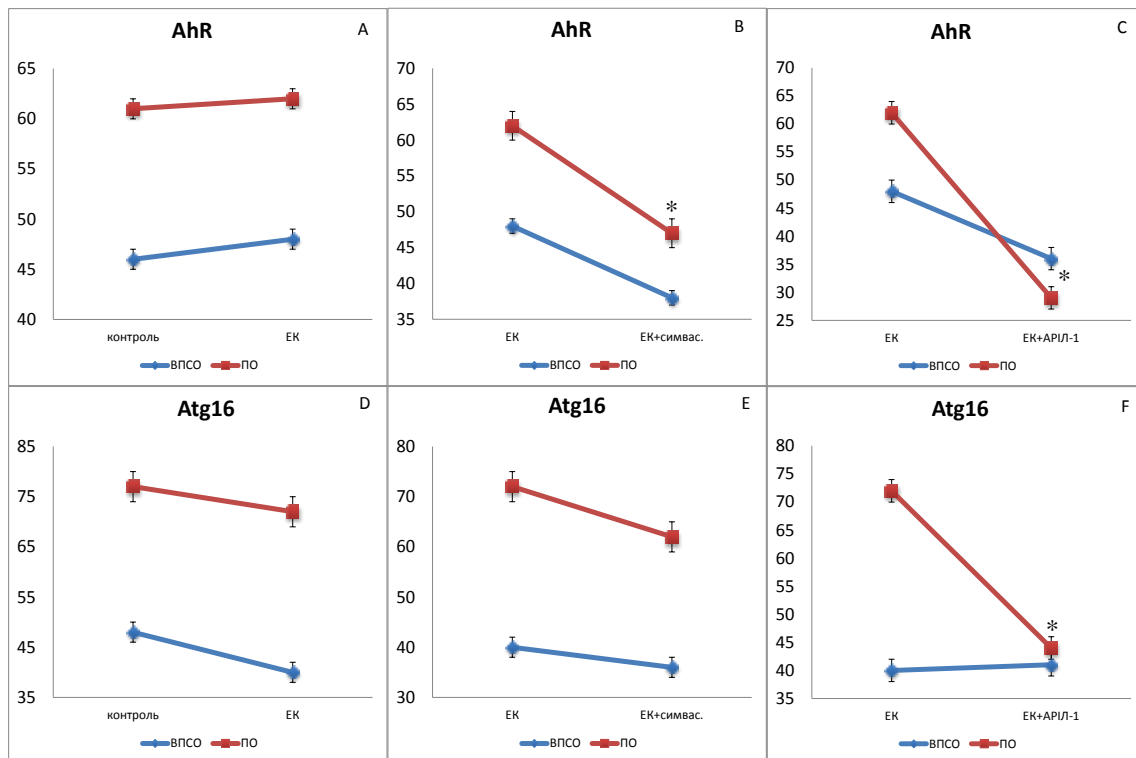


Рис. 6.4 (А-В). Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (А, D) та після введень симвастатину (В, Е) й АРІЛ-1 (С, F) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції AhR<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО на 35% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зміною щільності популяції у ВПСО і ПО дистального відділу товстої кишки: зменшенням щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів у ВПСО на 42% ( $p < 0,05$ ), AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів і малих лімфоцитів в ПО на 36% і 23% ( $p < 0,05$ ) відповідно. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів в 2,1 рази ( $p < 0,05$ ), зменшенням у ПО щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфобластів в 3 рази ( $p < 0,05$ ), AhR<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,7 разів ( $p < 0,05$ ) і AhR<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 42% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі AhR<sup>+</sup>-лімфобластів (табл. 6.3, табл. 6.4).

Вивчення щільності AhR рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що розвиток ЕК не супроводжувався вірогідними змінами даного показника (рис. 6.5, рис. 6.6).

Таблиця 6.3

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової  
оболонки дистального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія	Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІЛ-1
	Клас клітин				
<b>AhR</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{14 \pm 2}{29,5 \pm 3,8\%}$	$\frac{19 \pm 2^1}{38,6 \pm 3,1\%}$	$\frac{11 \pm 2^2}{28,6 \pm 4,5\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{24,7 \pm 3,7\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 2}{31,6 \pm 3,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{22,8 \pm 2,6\%^1}$	$\frac{10 \pm 1}{27,0 \pm 3,1\%}$	$\frac{10 \pm 1}{28,1 \pm 2,6\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{18 \pm 2}{38,8 \pm 4,0\%}$	$\frac{18 \pm 1}{38,4 \pm 2,8\%}$	$\frac{17 \pm 2}{44,2 \pm 4,3\%}$	$\frac{17 \pm 1}{47,0 \pm 4,1\%}$
<b>Atg16</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{19 \pm 3}{40,5 \pm 5,6\%}$	$\frac{17 \pm 1}{41,6 \pm 2,7\%}$	$\frac{10 \pm 2^2}{28,7 \pm 4,3\%^2}$	$\frac{11 \pm 1^2}{27,0 \pm 3,2\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{13 \pm 1}{27,7 \pm 2,2\%}$	$\frac{10 \pm 1^1}{24,3 \pm 2,5\%}$	$\frac{9 \pm 1}{24,9 \pm 2,4\%}$	$\frac{11 \pm 1}{27,6 \pm 3,0\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 2}{31,7 \pm 3,6\%}$	$\frac{14 \pm 2}{34,2 \pm 3,8\%}$	$\frac{17 \pm 2}{46,3 \pm 4,4\%^2}$	$\frac{18 \pm 2^2}{45,3 \pm 4,1\%}$

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. <sup>(1)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно контролю. <sup>(2)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

Таблиця 6.4

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у підслизовій основі дистального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІІ-1
	Клас клітин					
<b>AhR</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{18 \pm 3}{28,6 \pm 5,0\%}$	$\frac{12 \pm 2}{19,9 \pm 2,7\%}$	$\frac{12 \pm 2}{24,3 \pm 3,8\%}$	$\frac{4 \pm 1^2}{14,0 \pm 2,7\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{17 \pm 2}{27,9 \pm 4,0\%}$	$\frac{19 \pm 2}{30,7 \pm 2,4\%}$	$\frac{12 \pm 2^2}{25,4 \pm 3,3\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{24,6 \pm 2,4\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{27 \pm 2}{43,3 \pm 3,8\%}$	$\frac{31 \pm 2}{49,3 \pm 3,1\%}$	$\frac{24 \pm 2^2}{50,2 \pm 4,2\%}$	$\frac{18 \pm 2^2}{61,3 \pm 7,0\%}$	
<b>Atg16</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{32 \pm 3}{41,9 \pm 4,4\%}$	$\frac{29 \pm 2}{40,5 \pm 2,4\%}$	$\frac{21 \pm 2^2}{33,2 \pm 2,9\%}$	$\frac{13 \pm 1^2}{30,5 \pm 3,2\%^2}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{21 \pm 2}{27,6 \pm 2,6\%}$	$\frac{18 \pm 2}{24,7 \pm 2,8\%}$	$\frac{14 \pm 1}{22,8 \pm 2,1\%}$	$\frac{14 \pm 1}{32,7 \pm 2,7\%^2}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{23 \pm 2}{30,4 \pm 2,7\%}$	$\frac{25 \pm 2}{34,8 \pm 2,8\%}$	$\frac{27 \pm 2}{43,8 \pm 3,6\%^2}$	$\frac{16 \pm 2^2}{38,8 \pm 3,5\%}$	

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. <sup>(1)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно контролю. <sup>(2)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

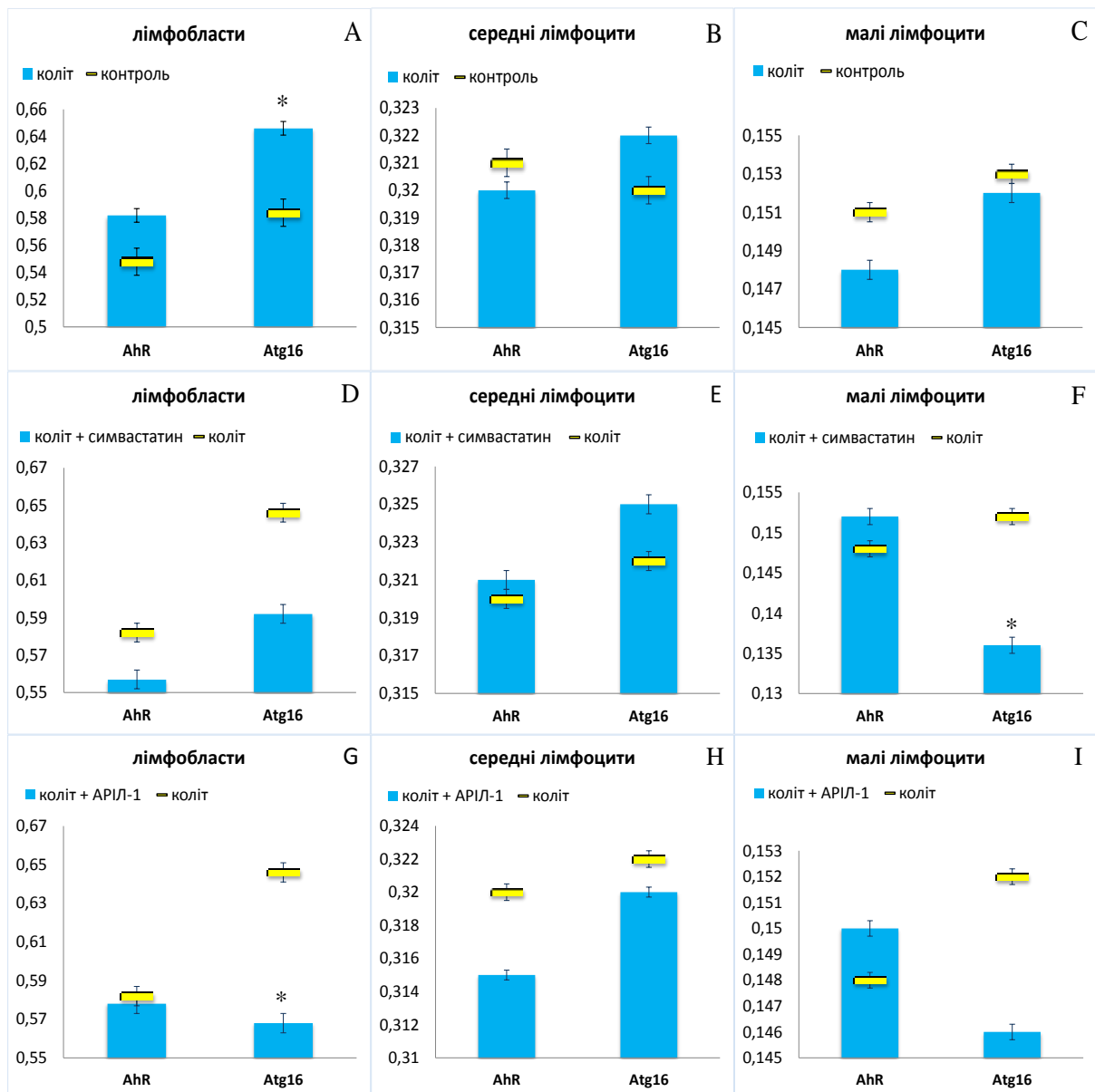


Рис. 6.5 (А-І). Щільність рецепторів ( $UO_{I\Phi}$ ) у лімфоцитах ВПСО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й APII-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

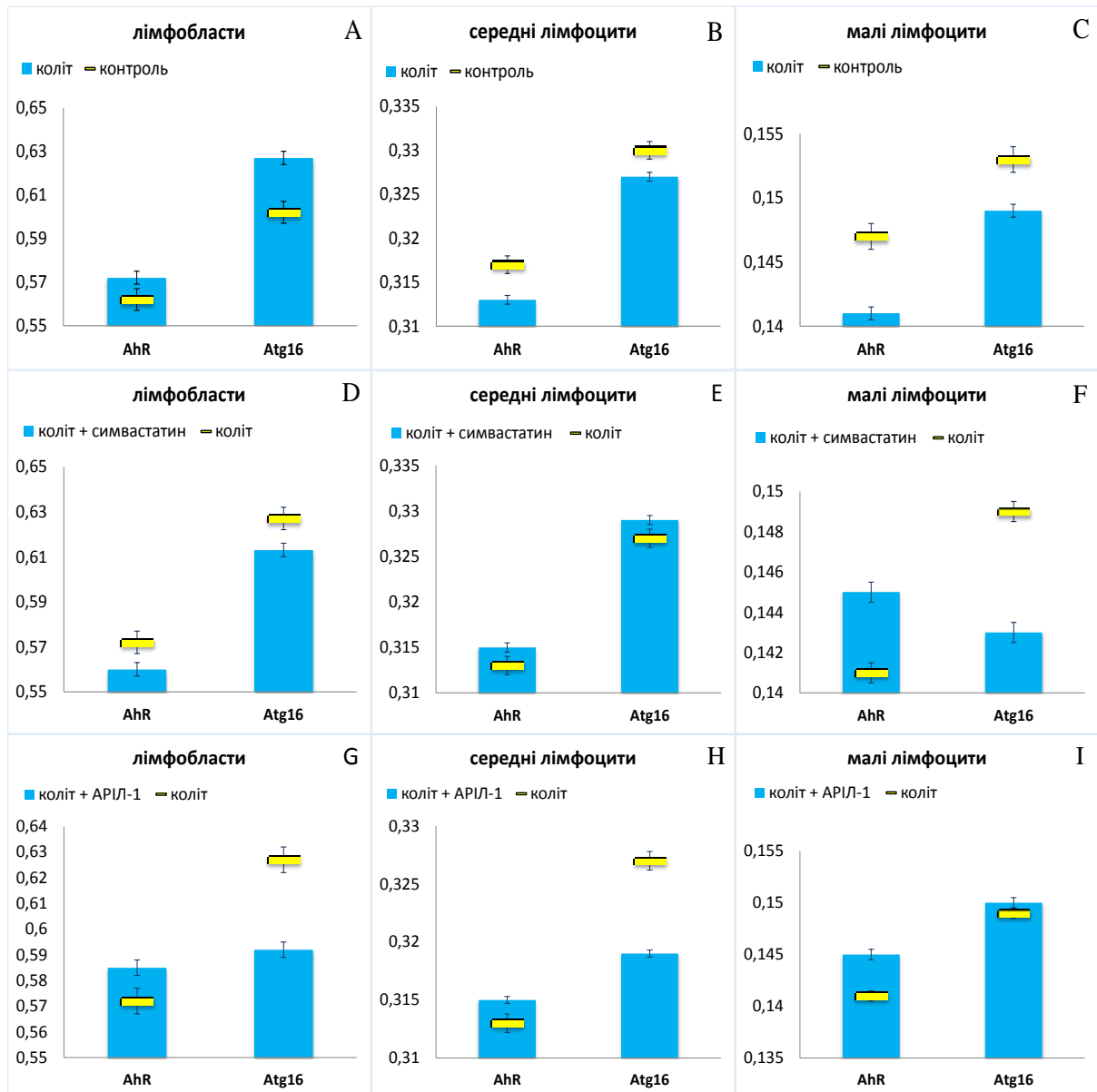


Рис. 6.6 (А-І). Щільність рецепторів (Y<sub>O1Ф</sub>) у лімфоцитах ПО дистального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й АРІІ-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* — p < 0,05

Аналіз серійних зрізів дистального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Atg16, показав, що сумарна щільність Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 48±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 38% менше, ніж у ПО. Серед Atg16<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали Atg16<sup>+</sup>-лімфобласти, тоді як найменше представлені у структурі популяції були Atg16<sup>+</sup>-середні лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК не супроводжувався вірогідними змінами сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів в ПО на 39% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. (див. рис. 6.4).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Atg16<sup>+</sup>-клітин засвідчило зменшення щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ВПСО на 23% (p<0,05) у порівнянні з контролем. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО та ПО дистального відділу товстої кишки Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів на 41% і 28% (p<0,05). У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів і Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів в обох морфофункціональних зонах. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО та ПО щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів на 35% і 2,2 рази (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 29% і 36% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів в обох морфофункціональних зонах (див. табл. 6.3, табл. 6.4).

Вимірювання інтенсивності флюоресценції Atg16<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію Atg16 в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним підвищенням даного показника в Atg16<sup>+</sup>-лімфобластах ВПСО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації Atg16 у малих лімфоцитах ВПСО в



порівнянні з ЕК. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації Atg16 у лімфобластах ВПСО в порівнянні з ЕК. (див. рис. 6.5, рис. 6.6).

*6.2.2 Експресія AhR і Atg16 у ВПСО і ПО проксимального відділу товстої кишки щурів лінії Wistar у нормі, в умовах розвитку ЕК та на фоні введення симвастатину й АРІЛ-1.*

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до AhR, показав, що сумарна щільність AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 39±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 30% менше, ніж у ПО. Серед AhR<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали AhR<sup>+</sup>-середні та малі лімфоцити, тоді як найменше представлені у структурі популяції були AhR<sup>+</sup>-лімфобласти. Нами було встановлено, що розвиток ЕК не супроводжувався вірогідними змінами щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО на 39% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник зменшився лише в ПО на 35% (p<0,05) (рис. 6.7).

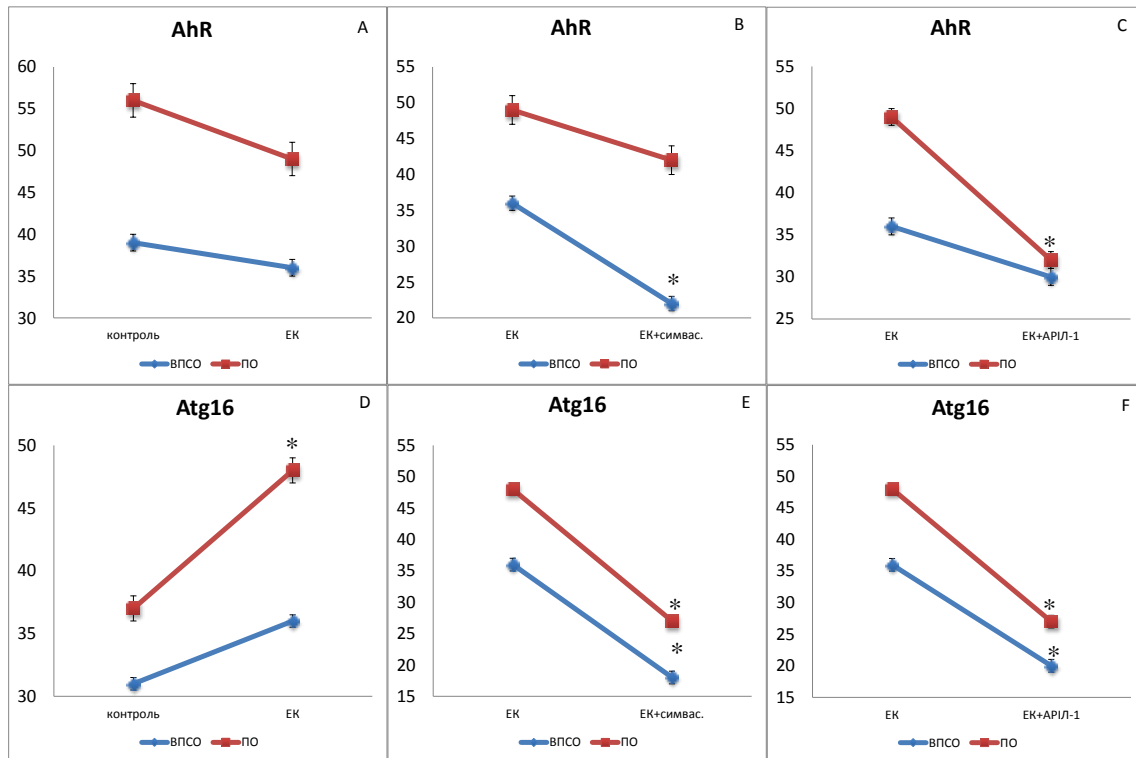


Рис. 6.7 (А-В). Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) імунопозитивних лімфоцитів у ВПСО та ПО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (А, D) та після введення симвастатину (В, Е) й АРІЛ-1 (С, F) експериментальним тваринам,\*—  $p < 0,05$

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції  $\text{AhR}^+$ -клітин засвідчило зменшення щільності популяції  $\text{AhR}^+$ -лімфобластів у ВПСО на 38% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контролем. У структурі популяції  $\text{AhR}^+$ -лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі  $\text{AhR}^+$ -лімфобластів і  $\text{AhR}^+$ -малих лімфоцитів у ВПСО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО проксимального відділу товстої кишки  $\text{AhR}^+$ -середніх лімфоцитів в 2,2 рази ( $p < 0,05$ ),  $\text{AhR}^+$ -малих лімфоцитів на 33% ( $p < 0,05$ ). Проте у ПО збільшилась щільність популяції  $\text{AhR}^+$ -лімфобластів на 86% ( $p < 0,05$ ) і зменшилась щільність популяції  $\text{AhR}^+$ -середніх лімфоцитів на 44% ( $p < 0,05$ ). У структурі популяції  $\text{AhR}^+$ -лімфоцитів спостерігались вірогідні

зміни відсоткової долі лімфобластів і середніх лімфоцитів у ВПСО і ПО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО і ПО щільності популяції  $AhR^+$ -середніх лімфоцитів на 36% і в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ),  $AhR^+$ -малих лімфоцитів на 26 і 36% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з ЕК. У структурі популяції  $AhR^+$ -лімфоцитів у ВПСО спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі  $AhR^+$ -лімфобластів, у ПО —  $AhR^+$ -лімфобластів і  $AhR^+$ -середніх лімфоцитів (табл. 6.5, табл. 6.6).

Вивчення щільності  $AhR$  рецепторів на імунопозитивних клітинах засвідчило, що введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним збільшенням щільності  $AhR$  у лімфобластах ПО в порівнянні з ЕК (рис. 6.8, рис 6.9).

Таблиця 6.5

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки проксимального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія		Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІІ-1
	Клас клітин					
<b>AhR</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{8 \pm 1}{21,4 \pm 2,6\%}$	$\frac{5 \pm 1^1}{14,3 \pm 2,0\%}$	$\frac{6 \pm 1}{25,2 \pm 3,4\%}$	$\frac{8 \pm 1}{25,5 \pm 3,7\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{15 \pm 1}{38,6 \pm 3,5\%}$	$\frac{11 \pm 1}{31,9 \pm 3,9\%}$	$\frac{5 \pm 1^2}{21,5 \pm 3,4\%}$	$\frac{7 \pm 1^2}{24,8 \pm 3,1\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{16 \pm 1}{39,9 \pm 3,6\%}$	$\frac{19 \pm 1}{53,7 \pm 4,1\%}$	$\frac{12 \pm 1^2}{53,2 \pm 6,0\%}$	$\frac{14 \pm 2^2}{49,6 \pm 5,5\%}$	
<b>Atg16</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{9 \pm 1}{28,0 \pm 2,7\%}$	$\frac{8 \pm 1}{22,7 \pm 3,1\%}$	$\frac{6 \pm 1}{31,7 \pm 3,5\%}$	$\frac{4 \pm 1^2}{21,5 \pm 4,5\%}$	
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{9 \pm 1}{29,0 \pm 3,6\%}$	$\frac{13 \pm 1^1}{34,8 \pm 3,3\%}$	$\frac{4 \pm 1^2}{22,9 \pm 3,4\%}$	$\frac{6 \pm 1^2}{31,8 \pm 4,5\%}$	
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{13 \pm 2}{42,9 \pm 5,2\%}$	$\frac{15 \pm 1}{42,5 \pm 4,0\%}$	$\frac{8 \pm 1^2}{45,4 \pm 4,8\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{46,7 \pm 6,0\%}$	

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. <sup>(1)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно контролю. <sup>(2)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

Таблиця 6.6

**Кількість імунопозитивних лімфоцитів у підслизовій основі  
проксимального відділу товстої кишки щурів ( $M \pm m$ )**

Рецептор	Серія Клас клітин	Контроль	Коліт	Коліт + симвастатин	Коліт + АРІІ-1
<b>AhR</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{9 \pm 1}{16,9 \pm 2,3\%}$	$\frac{7 \pm 1}{14,5 \pm 2,1\%}$	$\frac{13 \pm 2^2}{31,6 \pm 4,3\%^2}$	$\frac{9 \pm 1}{27,5 \pm 3,9\%^2}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{19 \pm 2}{33,5 \pm 2,7\%}$	$\frac{16 \pm 2}{33,7 \pm 3,4\%}$	$\frac{9 \pm 1^2}{20,5 \pm 2,9\%^2}$	$\frac{7 \pm 1^2}{21,0 \pm 2,3\%^2}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{28 \pm 2}{49,5 \pm 3,8\%}$	$\frac{25 \pm 2}{51,7 \pm 4,6\%}$	$\frac{20 \pm 2}{47,8 \pm 5,7\%}$	$\frac{16 \pm 2^2}{51,3 \pm 5,9\%}$
<b>Atg16</b>	<i>лімфобласти</i>	$\frac{13 \pm 1}{34,2 \pm 2,6\%}$	$\frac{11 \pm 1}{23,8 \pm 1,9\%^1}$	$\frac{9 \pm 1^2}{32,6 \pm 3,4\%^2}$	$\frac{6 \pm 1^2}{24,7 \pm 3,8\%}$
	<i>середні лімфоцити</i>	$\frac{7 \pm 1}{19,9 \pm 2,4\%}$	$\frac{15 \pm 1^1}{30,5 \pm 2,9\%^1}$	$\frac{5 \pm 1^2}{17,2 \pm 2,1\%^2}$	$\frac{9 \pm 1^2}{31,8 \pm 2,8\%}$
	<i>малі лімфоцити</i>	$\frac{17 \pm 2}{45,9 \pm 4,3\%}$	$\frac{22 \pm 2^1}{45,7 \pm 3,2\%}$	$\frac{13 \pm 2^2}{50,2 \pm 5,9\%}$	$\frac{12 \pm 1^2}{43,4 \pm 5,4\%}$

Примітки: В чисельнику — щільність популяції імунопозитивних лімфоцитів (на  $1\text{mm}^2$ ), в знаменнику — відсоткова частка окремих класів імунопозитивних лімфоцитів. <sup>(1)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно контролю. <sup>(2)</sup> —  $p < 0,05$  стосовно коліту.

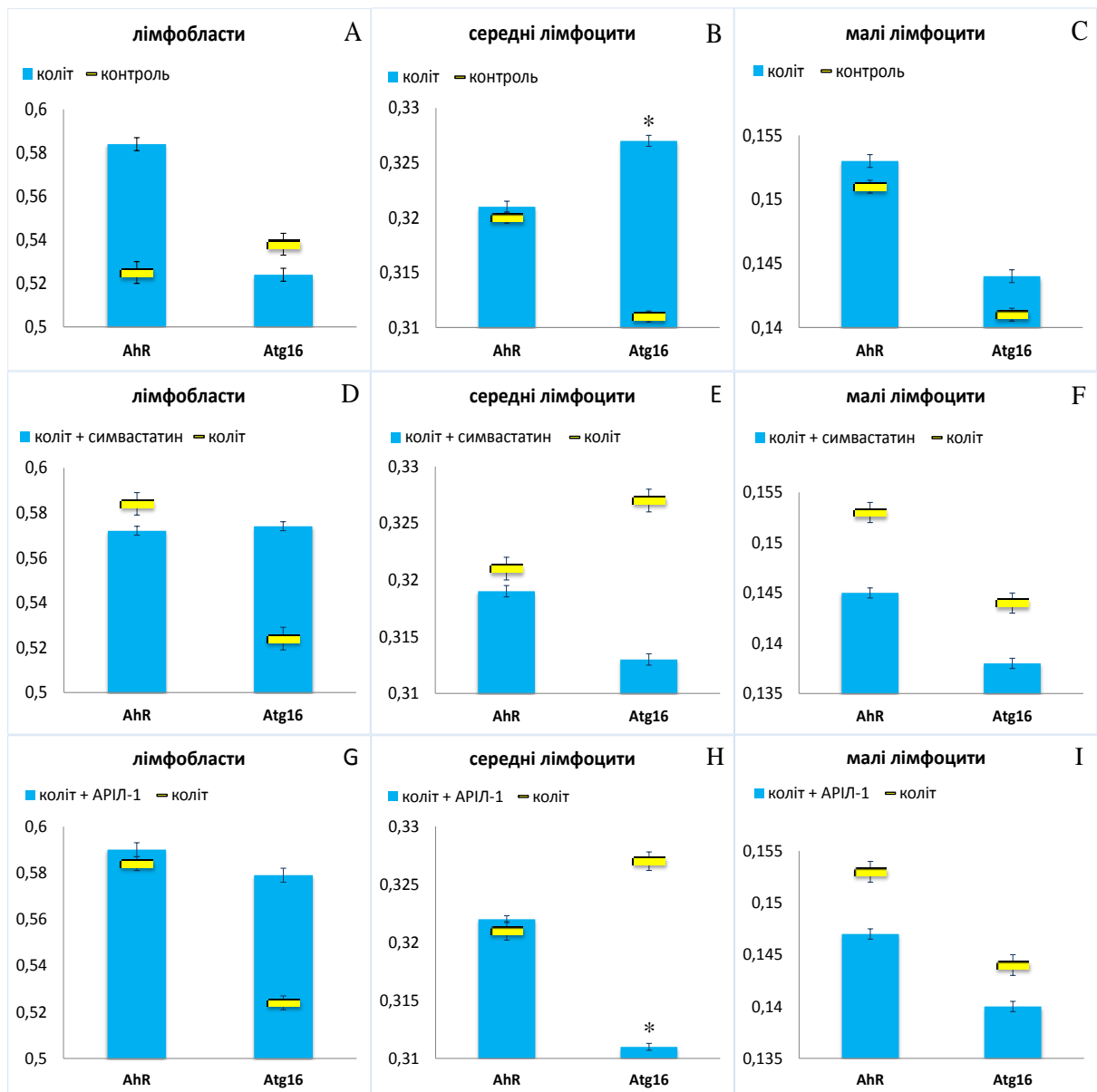


Рис. 6.8 (А-І). Щільність рецепторів (УО<sub>1F</sub>) у лімфоцитах ВПСО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й APII-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

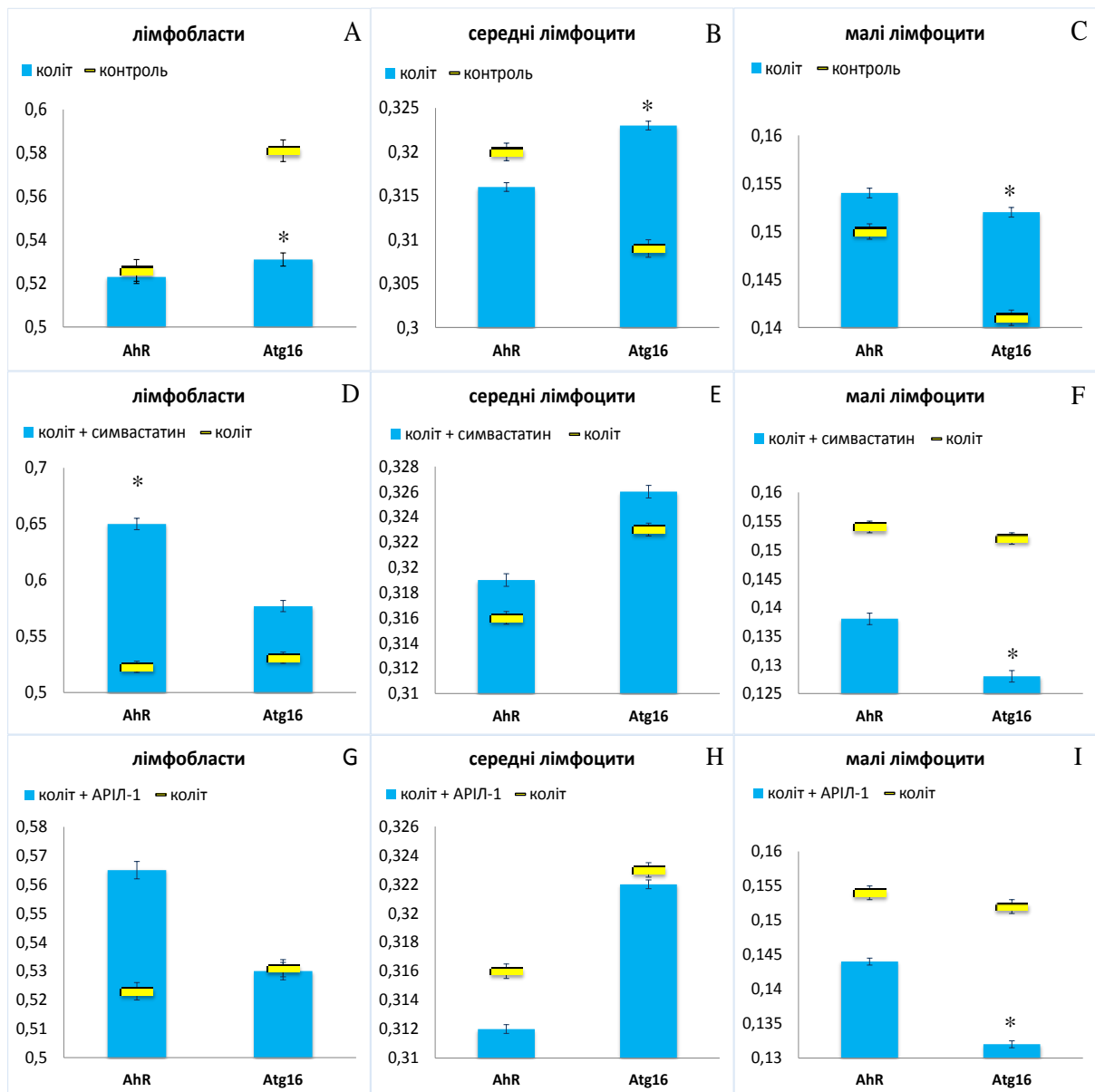


Рис. 6.9 (А-І). Щільність рецепторів ( $Y_{OIF}$ ) у лімфоцитах ПО проксимального відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (А, В, С) та після введення симвастатину (D, E, F) й APII-1 (G, H, I) експериментальним тваринам, \* —  $p < 0,05$

Аналіз серійних зрізів проксимального відділу товстої кишки контрольних щурів лінії Wistar, попередньо інкубованих з МКАТ до Atg16, показав, що сумарна щільність Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО становила 31±1 на 1 мм<sup>2</sup>, що на 16% менше, ніж у ПО. Серед Atg16<sup>+</sup>-клітин в обох досліджуваних морфофункціональних зонах переважали Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцити. Нами було встановлено, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним збільшенням сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ПО на 30% (p<0,05). Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зменшенням сумарної щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у ВПСО в 2 рази (p<0,05) і ПО на 44% (p<0,05) у порівнянні з ЕК. При введенні АРІЛ-1 цей показник також зменшився — у ВПСО на 44% (p<0,05), у ПО на 44% (p<0,05) (див. рис. 6.7).

Вивчення розподілу окремих класів та структури популяції Atg16<sup>+</sup>-клітин засвідчило збільшення щільності популяції у ВПСО та ПО Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів на 44% і в 2,1 рази (p<0,05), проте зменшилась кількість Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів у ПО на 29% (p<0,05) у порівнянні з контролем. У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів і Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів у ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням щільності популяції у ВПСО проксимального відділу товстої кишки: Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 3,3 рази (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 47% (p<0,05). Зменшенням у ПО проксимального відділу товстої кишки: Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів на 18% (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 3 рази (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 41% (p<0,05). У структурі популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів спостерігались вірогідні зміни відсоткової долі середніх лімфоцитів у ВПСО, а також лімфобластів і середніх лімфоцитів у ПО. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось зменшенням у ВПСО і ПО щільності популяції Atg16<sup>+</sup>-лімфобластів в 2 рази і на 45% (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-середніх лімфоцитів в 2,2 і 1,7 разів (p<0,05), Atg16<sup>+</sup>-малих лімфоцитів на 40% і 45% (p<0,05), у порівнянні з ЕК (див. табл. 6.5, табл. 6.6.).



Вимірювання інтенсивності флюоресценції Atg16<sup>+</sup>-клітин, що відображає концентрацію Atg16 в клітині засвідчило, що розвиток ЕК супроводжувався вірогідним підвищенням даного показника в лімфобластах ВПСО, зниженням в лімфобластах і підвищенням в середніх і малих лімфоцитах ПО. Введення симвастатину щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації Atg16 в малих лімфоцитах ПО в порівнянні з ЕК. Введення АРІЛ-1 щурам з ЕК супроводжувалось вірогідним зниженням концентрації Atg16 в середніх лімфоцитах ВПСО і малих лімфоцитах ПО (див. рис. 6.8, рис. 6.9).

Таким чином, проведене дослідження особливостей експресії AhR і Atg16 у нормі та в експериментальних тварин дозволяє зробити наступні проміжні висновки:

1. Розвиток ЕГІ супроводжується зміною кількості імунопозитивних клітин: збільшенням AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів та зменшенням Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів, при цьому кількість Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів не змінюється.

2. Ефекти від введень симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ не змінилась кількість AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав збільшення AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів при не зміненої кількості Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Ефекти від введень АРІЛ-1 не залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ та ЕХІ зменшувалась кількість AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів.

3. Розвиток ЕК не супроводжується змінами досліджуваних імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки на відміну від проксимального відділу де спостерігалось збільшення Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів.

4. Введення симвастатину і АРІЛ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів в проксимальному і дистальному відділі товстої кишки. Однак в дистальному відділі не змінилась кількість Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів при введенні симвастатину.

Результати досліджень, наведені в цій главі, опубліковані в наступних роботах:

1. 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. — Т. 61, № 5. — С. 57-64.
2. Жеребят'єв О. С. Вплив симвастатину та антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на експресію арил-гідрокарбонівих рецепторів (AHR) в умовах експериментального гострого ілеїту / О. С. Жеребят'єв, О. М. Камишний // Гастроентерологія. — 2015. — №1(55). — С. 42-45.
3. 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. конгреса асоц. колопроктологів Росії і першого ESCP/ECCO регіонального мастер-класа. — Москва, 2015. — №1(51) (приложение). — С. 101.

## РОЗДІЛ 7

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Метою нашого дослідження стало удосконалення 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 за допомогою імунофлюоресцентних і молекулярно-генетичних методів.

Відповідно до мети роботи були поставлені наступні завдання:

1. Оцінити розвиток експериментальної патології та відносний рівень мРНК прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і IL-17A, NLRP3-інфламасоми, c-Rel субодиниці NF- $\kappa$ B та рецептора коротколанцюгових жирних кислот FFAR2, а також HMGB1 у кишківнику самців щурів лінії Wistar у контролі, та в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, хронічного ілеїту та коліту.

2. Вивчити розподіл TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>- і NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів а також особливості експресії NOD- і RIG-подібних рецепторів вродженого імунітету в ізольованих лімфоїдних вузликах і власній пластинці слизової оболонки ворсинок клубової кишки та власній пластинці слизової оболонки і підслизовій основі товстої кишки у самців щурів лінії Wistar у контролі, в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту, хронічного ілеїту та коліту і після введення симвастатину та антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1.

3. Визначити клітинний склад T-bet<sup>+</sup> (Th1), GATA3<sup>+</sup> (Th2), ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> (Th17) і Foxp3<sup>+</sup>-клітин (Treg) у лімфоїдних структурах тонкої та товстої кишок в цих же експериментальних групах.

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

Для цього ми використовували патофізіологічні, морфометричні, біохімічні, імунофлюоресцентні (реакція прямої або непрямої імунофлюоресценції з використанням моноклональних або поліклональних антитіл) методи аналізу гістологічного матеріалу, метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР), комп'ютерний аналіз зображень і математичний класифікаційний аналіз, методи статистичного аналізу отриманих результатів.

На першому етапі ми дослідили тканини клубової кишки, проксимального та дистального відділу товстої кишки для верифікації, підтвердження діагнозу, реєстрації динаміки процесу, який моделювали, а також для оцінки впливу препаратів, які застосовували для лікарської корекції. Нами було встановлено, що розвиток експериментальної патології у щурів супроводжується значними змінами клінічних, макроскопічних та мікроскопічних ознак. При цьому введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам з експериментальною патологією справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки ілеїту й коліту. За силою ефекту симвастатин відрізняється від АРІЛ-1 який чинить більш виражену дію.

Наступним етапом стало оцінити експресію мРНК ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-17А, NLRP3, c-Rel, FFAR2 і HMGB1 в кишківнику щурів в нормі та у експериментальних тварин.

При цьому аналіз фрагментів клубової кишки щурів показав підвищенні рівні експресії прозапальних цитокінів ІЛ-1 $\beta$  і ІЛ-17А в зразках клубової кишки щурів з ЕГІ та ЕХІ. Експресія ІЛ-1 $\beta$  підвищилась в 4,3 і 3 рази ( $p < 0,05$ ) відповідно, ІЛ-17А — в 6,5 і 7 разів ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контролем. Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 4,3-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії мРНК NLRP3 в клубовій кишці тварин з ЕГІ та 4,3-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії в клубовій кишці тварин з ЕХІ.

Вивчення експресії HMGB1 в зразках клубової кишки щурів з ЕГІ та ЕХІ засвідчило підвищення експресії в 6,5 і 7 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно в порівнянні з контролем. Рівень експресії FFAR2 також підвищився в 8,2 і 7,0 разів ( $p < 0,05$ ) відповідно. Нарешті, 16- та 6-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії c-Rel було продемонстровано в клубовій кишці щурів з ЕГІ та ЕХІ.

Аналіз фрагментів дистального відділу товстої кишки щурів з ЕК показав: по-перше, збільшення рівня експресії прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і IL-17A. Експресія IL-1 $\beta$  збільшилась в 4,3 рази ( $p < 0,05$ ), IL-17A — в 6,5 разів ( $p < 0,05$ ) в порівнянні з контролем. Аналіз ЗТ-ПЛР продемонстрував 4,3-кратне ( $p < 0,05$ ) підвищення експресії мРНК NLRP3 в дистальному відділу товстої кишки тварин з ЕК. Ми виявили 6-кратне ( $p < 0,05$ ) збільшення експресії c-Rel в дистальному відділу товстої кишки щурів з ЕК в порівнянні з контрольними щурами. Рівень експресії FFAR2 також дещо підвищився (в 1,4 рази ( $p < 0,05$ )). Нарешті, практично не змінився рівень експресії HMGB1 в зразках товстої кишки щурів з ЕК.

Отримані нами дані збігаються з рядом інших досліджень, так Bersudsky et al. вивчаючи різну роль агоністів IL-1, IL-1 $\alpha$ , які в основному асоційовані з клітиною в порівнянні з IL-1 $\beta$ , який секретується в запаленні товстий кишці, показали, що IL-1 $\beta$  бере участь у відновленні епітеліоцитів кишківника і епітеліального бар'єру при коліті [182]. У нашій роботі ми показали, що експресія IL1 $\beta$  була збільшена приблизно в 4 рази в запаленій клубовій кишці в порівнянні з нормальною тканиною, припускаючи, що зміни експресії IL1 $\beta$  грає роль в патофізіології ХК.

Одним з факторів, що бере участь в ініціації і підтримці запалення при ЗЗК може бути порушення балансу прозапальних і протизапальних цитокінів. Хоча підвищені рівні IL-1 і дисбаланс між IL-1 і IL-1ra були зареєстровані у хворих, роль інших IL-1 модуляторів при ЗЗК ще не з'ясована. Дисбаланс між виробленням IL-1 і IL-1ra був описаний в епітеліоцитах і біоптатах слизової оболонки товстої кишки, отриманих від пацієнтів зі ЗЗК [183]. Введення рекомбінантного IL-1ra запобігає запаленню і некрозу слизової оболонки в

кролячій моделі DSS-коліту [184]. З іншого боку, нейтралізація ендogenous IL-1ra збільшує тяжкість запалення кишківника, вказуючи що він чинить протизапальну роль. Важливість IL-1 і IL-1ra у патогенезі ЗЗК була підтверджена взаємозв'язком між IL-1RN 2 алелем, низьким виробленням IL-1ra і тяжкістю захворювання на НБК [185]. Maeda et al. показали дисбаланс IL-1 $\beta$  і антагоніста рецептора інтерлейкіну-1 в слизовій оболонці собак з експериментальними ЗЗК. Значне зниження в кишківнику IL-1ra, співвідношення мРНК IL-1 $\beta$  і протеїну спостерігалось при ЗЗК в порівнянні зі здоровими контрольними собаками [112].

Цитокіни IL-1 $\beta$  і IL-18 з'являються на початку запалення в кишківнику і їх проформи обробляються через каспаза-1-активуючий мультибілковий комплекс — NLRP3 інфламасому. Тим не менше, роль інфламасоми в гострому кишковому запаленні залишається дискусійним питанням, а участь інфламасоми і IL-1 $\beta$  при розвитку хронічного коліту погано зрозуміло. Завдяки своєму потенціалу індукувати прозапальні відповіді і бути причиною пошкодження організму, вироблення IL-1 $\beta$  строго контролюється на декількох рівнях. Вироблення зрілого IL-1 $\beta$  вимагає принаймні два сигнали: перший сигнал ініціюється TLR лігандами або ендogenous молекулами, які індукують експресію гена про-IL-1 $\beta$ ; другий сигнал включає в себе дуже різноманітні стимули, що активують інфламасому, призводячи до дозрівання IL-1 $\beta$  [186].

Інфламасоми — це мультимолекулярні комплекси, що складаються з білка NLR, ASC і каспази-1, які контролюють процесінг прозапальних цитокінів IL-1 $\beta$  і IL-18. У той час як деякі дослідження показують, що миші, дефіцитні за компонентами інфламасоми в тому числі NLRP3, ASC, і каспаза-1 дуже чутливі до розвитку DSS-індукованого гострого коліту, одне дослідження демонструє протилежні результати — дефектні за NLRP3 інфламасомою миші захищені від розвитку цієї патології [187].

Удаване протиріччя про роль інфламасоми в імунітеті слизової оболонки кишківника можливо, в значній мірі залежить від кишкової

мікрофлори, хоча необхідні подальші дослідження, щоб вирішити цю проблему. Оскільки ЗЗК є гетерогенними захворюваннями, цілком можливо, що у деяких пацієнтів генетичні мутації або фактори навколишнього середовища можуть призвести до зниження активації інфламасоми і вироблення IL-1 $\beta$ , що піддає ризику цілісність епітеліального бар'єру до мікрофлори, і призводить до запалення кишківника. У той час як у інших пацієнтів з ЗЗК генетичні фактори і синантропна мікрофлора може призвести до тривалої або нерегульованої активації інфламасоми, збільшенню вироблення IL-1 $\beta$ , викликаючи тим самим неконтрольований запальний процес у кишківнику. Таким чином, інфламасоми є посередником між імунним захистом проти патогенних мікроорганізмів і кишковим гомеостазом, порушення її регуляції може сприяти розвитку ЗЗК, і тому удосконалення знань про інфламасоми може дати уявлення про потенційні терапевтичні мішені у пацієнтів з ЗЗК.

Родина NF- $\kappa$ B складається з 5 основних білків — c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> (p50 та його прекурсору p105) та NF- $\kappa$ B<sub>2</sub> (p52 та його прекурсору p100), здатних утворювати різні гетеродимерні комбінації які експресуються практично у всіх клітинах організму. [188] Спочатку експресія NF- $\kappa$ B була виявлена в В-лімфоцитах і він був ідентифікований як фактор швидкої проліферації та дозрівання даних клітин. Однак, не дивлячись на те, що класичні АПК відрізняються найбільш інтенсивною експресією NF- $\kappa$ B, він також експресований в Т-лімфоцитах [10]. Більш того, зміна рівня експресії NF- $\kappa$ B Т-лімфоцитами має прямий вплив на процеси їх дозрівання, диференціювання й активації, що було показано для всіх основних субпопуляцій Т-хелперів та Т-регуляторних лімфоцитів [189].

Наша оцінка рівня експресії мРНК c-Rel показала збільшення її в дистальному відділу товстої кишки щурів з ЕК і в клубовій кишці щурів з ЕГІ та ЕХІ. Генетичні та екологічні фактори, у тому числі комменсальна мікрофлора, відіграють вирішальну роль у розвитку ЗЗК, вони також пов'язані з хромосомою 2p16, яка містить *REL*, що кодує c-Rel —

субодиницю NF-κB. Аномальна активація фактора транскрипції NF-κB пов'язана з гострим і хронічним запаленням кишківника у щурів і грає ключову роль в регуляції генів цитокінів у пацієнтів з ЗЗК [190]. Очевидно, що експресія та активація NF-κB індукована в запаленій кишці пацієнтів з ЗЗК. Особливо макрофаги і епітеліальні клітини, ізольовані із зразків запаленого кишківника, показали збільшенні рівні NF-κB p65 [191]. Цікаво, що кількість активованого NF-κB достовірно корелює з тяжкістю запалення [192]. На додаток до макрофагів і епітеліальних клітин, фібробласти власної пластинки також грають NF-κB-опосередковану прозапальну роль при ЗЗК [193]. Через нерівноцінну роль та функції макрофагів, епітеліальних клітин і фібробластів в імунитеті слизових оболонок і дуже широкої панелі генів, які контролюються NF-κB, необхідно ретельно розглядати різні клітинно-специфічні ефекти NF-κB, які беруть участь у патогенезі ЗЗК. У пацієнтів з цими захворюваннями, підвищена експресія NF-κB в макрофагах супроводжується збільшенням здатності цих клітин продукувати і виділяти TNF-α, IL-1 і IL-6. Ця знахідка позначає центральну функцію NF-κB в моноцитах, який індукує і контролює прозапальні цитокіни [194].

Th17 клітини розвиваються з наївних Т-лімфоцитів і секретують IL-17, який сприяє залученню запальних клітин до слизової оболонки кишківника за допомогою своєї здатності підсилювати синтез хемоаттрактантів і молекул адгезії на епітеліальних, ендотеліальних і мезенхімальних клітинах. Зростаючий обсяг досліджень показує, що Th17-ефекторні цитокіни сприяють хронічному запаленню кишківника, індукуючи деякі прозапальні медіатори. Наша оцінка рівня експресії мРНК IL-17A показала значні відмінності в рівнях експресії в клубової кишці щурів з ілеїтом в порівнянні з незапаленою кишкою контрольних тварин. Вони узгоджуються з попередніми спостереженнями, і говорять про залучення IL-17A в патофізіологію ЗЗК [173]. Weidlich et al. показали підвищення рівня експресії мРНК IL-8, IL-17 і IL-10 у пацієнтів з ХК і НЯК [195]. Sugihara et al. показали



підвищення експресії мРНК в слизовій оболонці кишківника комплементу С3 і IL-17 при ЗЗК [196].

В умовах запалення HMGB1 активно секретується з клітин імунної системи в позаклітинний матрикс, де він поводить себе як прозапальний цитокін. Vitali et al. вперше показали, що HMGB1 секретується запаленими тканинами кишківника людини і був знайдений в випорожненнях пацієнтів з ЗЗК, так що його можна розглядати в якості нового маркера цих захворювань [197]. Численні дані показують, що HMGB1 є важливим медіатором у патогенезі коліту та коліт-асоційованої карциноми [198]. Підвищені рівні циркулюючого HMGB1 були виявлені в тваринних моделях ЗЗК і явно пов'язані з тяжкістю захворювання [199]. Встановлено, що високі рівні HMGB1 збільшують проникливість епітеліальних клітин і порушують бар'єрну функцію кишківника [200]. Разом ці дослідження показують, що HMGB1 є важливою мішенню при ЗЗК і нейтралізація його може бути корисна для контролю тяжкості захворювання.

Шлунково-кишковий тракт ссавців містить трильйони бактерій. Точно збалансований взаємовигідний симбіоз існує в слизовій оболонці кишківника, де мікроби також можуть ініціювати і підтримувати хвороби слизових оболонок. Мікроби виробляють ряд вітамінів і надають користь господареві через локальний синтез SCFAs, у тому числі бутирату, пропіонату та ацетату. Зниження кількості бутират-продукуючих мікроорганізмів пов'язане із захворюваннями товстої кишки, в тому числі ЗЗК кажучи про те, що бутират є найважливішим чинником, що визначає стійкість до хвороб [201]. Існує підвищений інтерес в розумінні того, як організм господаря взаємодіє з мікроорганізмами [202]. Епітеліоцити функціонують як основний інтерфейс для зв'язку господаря і мікроорганізмів. Ми вважаємо що метаболізм SCFAs в епітелії може слугувати важливим зв'язком між організмом господаря і просвітною мікрофлорою. Враховуючи діапазон доступних субстратів, слід зазначити, що переважаюче джерело енергії — бутират, кінцевий продукт метаболізму

бактерій. Накопичені літературні дані підкреслюють що бутират виявляє антиканцерогенні, протизапальні і захисні ефекти в кишківнику [203]. Призначення екзогенного бутирата сприяє стійкості до експериментального коліту [204]. Дослідження причин дисбактеріозу при ЗЗК виявили зниження бутират-продукуючих мікроорганізмів, а низькі концентрації бутирата асоціювалися із захворюваннями [201]. Ряд досліджень оцінили ефективність бутирата в лікуванні хвороб людини, в першу чергу НВК з різними результатами [203].

Таким чином, ми вважаємо, що ідентифікація аномальної експресії мРНК IL-1 $\beta$ , IL-17A, NLRP3, FFAR2 і HMGB1 може мати відношення у з'ясуванні патогенезу ЗЗК, а також може сприяти визначенню майбутніх потенційних мішеней для терапевтичного втручання.

Наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 4, полягав у вивченні регіональних особливостей розподілу TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, RIGI<sup>+</sup>-імунопозитивних лімфоцитів по всій довжині кишківника (від клубової кишки до дистального відділу товстої кишки) контрольної групи щурів, а також вивченні експресії рецепторів вродженого імунітету, а саме TLR2, TLR4, NOD2, RIGI, а також транскрипційного фактору NF- $\kappa$ B у нормі та в експериментальних тварин. Нами були виявлені регіональні відмінності в розподілі популяцій імунних клітин по всій довжині кишківника експериментальних тварин. Найбільша щільність TLR2<sup>+</sup>-лімфоцитів виявлена в проксимальному відділі товстої кишки, TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів в клубовій кишці, NOD2<sup>+</sup>-лімфоцитів в клубовій кишці і дистальному відділі товстої кишки, RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів в дистальному відділі товстої кишки (рис. 7.1).

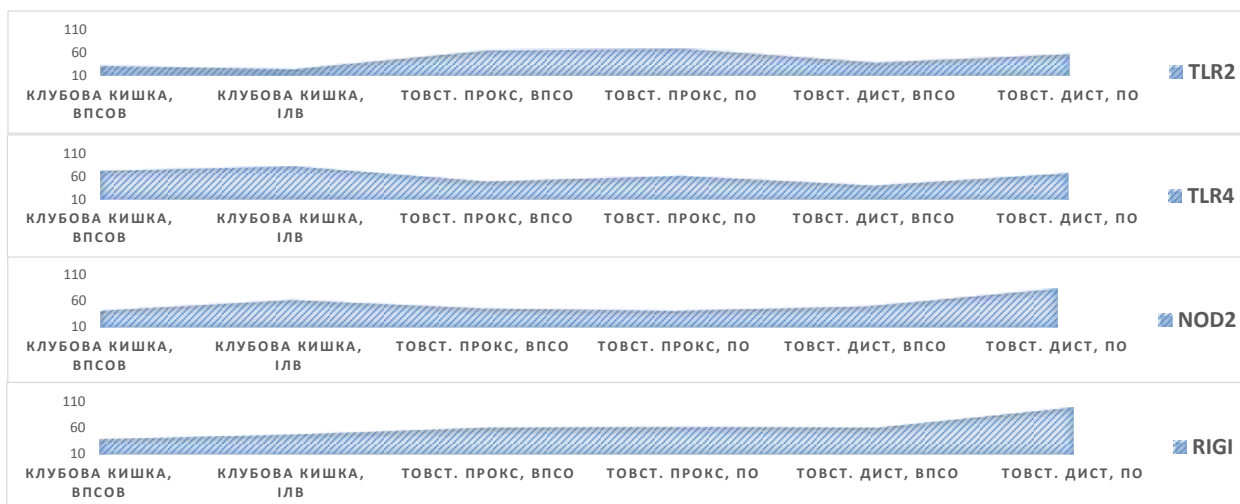


Рис. 7.1 Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ )  $\text{TLR2}^+$ -,  $\text{TLR4}^+$ -,  $\text{NOD2}^+$ -,  $\text{RIGI}^+$ -імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (КЛУБОВА КИШКА, ВПСОВ) та ізольованих лімфоїдних вузликів (КЛУБОВА КИШКА, ІЛВ) клубової кишки контрольної групи тварин; власній пластинці слизової оболонки проксимального (ТОВСТ. ПРОКС, ВПСО) і дистального (ТОВСТ. ДИСТ, ВПСО) відділу товстої кишки; підслизовій основі проксимального (ТОВСТ. ПРОКС, ПО) і дистального (ТОВСТ. ДИСТ, ПО) відділу товстої кишки контрольної групи тварин.

Ми встановили, що розвиток ЕГІ супроводжується зміною кількості імунопозитивних клітин: збільшенням  $\text{TLR2}^+$ -лімфоцитів, зменшенням  $\text{TLR4}^+$ - і  $\text{NF-}\kappa\text{B}^+$ -лімфоцитів. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості  $\text{TLR2}^+$ - і  $\text{NOD2}^+$ - лімфоцитів на фоні зменшення  $\text{TLR4}^+$ - і  $\text{RIGI}^+$ - клітин. Ефекти від введення симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшилась кількість  $\text{TLR2}^+$ - і  $\text{RIGI}^+$ -лімфоцитів та збільшилась  $\text{TLR4}^+$ - і  $\text{NF-}\kappa\text{B}^+$  лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав зменшення  $\text{NF-}\kappa\text{B}^+$  і  $\text{NOD2}^+$ -лімфоцитів та збільшення  $\text{TLR2}^+$ - і  $\text{TLR4}^+$ -лімфоцитів. Ефекти від введення АРІЛ-1 теж залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшувалась кількість  $\text{TLR2}^+$ -,  $\text{NOD2}^+$ -,  $\text{RIGI}^+$ -лімфоцитів та збільшувалась кількість  $\text{TLR4}^+$ - і  $\text{NF-}\kappa\text{B}^+$ -лімфоцитів, введення АРІЛ-1

тваринам з ЕХІ викликало зменшення TLR2<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів, та збільшення TLR4<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів (рис. 7.2).

Розвиток ЕК супроводжується зменшенням всіх досліджуваних імунопозитивних клітин в проксимальному відділі товстої кишки на відміну від дистального відділу де спостерігалось збільшення TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>- і NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину і АРІІ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості всіх досліджуваних імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки. Однак в проксимальному відділі збільшилась кількість NF-κB<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів (рис. 7.3).



Рис. 7.2 (А-F). Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ ) TLR2<sup>+</sup>-, TLR4<sup>+</sup>-, NF-κB<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>-, RIGI<sup>+</sup>-, T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>-імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (КЛУБОВА КИШКА, ВПСОВ) та ізольованих лімфоїдних вузликах (КЛУБОВА КИШКА, ІЛВ) клубової кишки при розвитку експериментального гострого (EGI) та хронічного ілеїту (EXI) (A, D) та після введення симвастатину й АПІЛ-1 (B, C, E, F) експериментальним тваринам, \*—  $p < 0,05$



Рис. 7.3 (A-F). Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ )  $\text{TLR2}^{+/-}$ ,  $\text{TLR4}^{+/-}$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}^{+/-}$ ,  $\text{NOD2}^{+/-}$ ,  $\text{RIGI}^{+/-}$ ,  $\text{T-bet}^{+/-}$ ,  $\text{GATA3}^{+/-}$ ,  $\text{ROR}\gamma\text{t}^{+/-}$ ,  $\text{Foxp3}^{+/-}$ -імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки проксимального (ТОВСТ. ПРОКС, ВПСО) і дистального (ТОВСТ. ДИСТ, ВПСО) відділу товстої кишки; підслизовій основі проксимального (ТОВСТ. ПРОКС, ПО) і дистального (ТОВСТ. ДИСТ, ПО) відділу товстої кишки при розвитку експериментального коліту (ЕК) (A, D) та після введень симвастатину (B, C, E, F) експериментальним тваринам, \*—  $p < 0,05$

На сьогодні лише деякі дослідження описують регіональні зміни експресії PRR в різних відділах кишківника. Наші результати збігаються з даними отриманими Ortega-Cava et al. 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 [205]. Функціональні наслідки цих відмінностей залишаються неясними і вони здається, обумовлені мікробіотою. Нарешті, NOD2 в основному експресується в клубової кишці. Це узгоджується з асоціацією мутацій NOD2 з ХК [206]. Пряма експресія PRR лімфоцитами впливає на їх активацію, проліферацію, виживання і продукцію цитокінів [207].

Літературні дані свідчать про неоднорідний рівень експресії TLR2 різними типами клітин ШКТ, і якщо їх наявність на АПК та кишковому епітелії функціонально зрозуміла (сенсінг PAMP, збереження щільних контактів між епітеліоцитами) [208], то наявність рецепторів вродженого імунітету на клітинах адаптивної ланки імунної системи — Т- і В-лімфоцитах, викликає багато питань. Однак, найбільший інтерес викликають дані про прямий вплив TLR2 на експресуючі їх Т-регуляторні клітини і Т-хелпери 17 типу, що здатен змінювати баланс Treg / Th17. С одного боку, сигналізація через TLR2 виступає в ролі модулятора функцій Treg і підсилює в них експресію Foxp3, а нокаутні по TLR2 миші показують більш низьку кількість CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg-клітин у порівнянні з контролем [209]. З іншого боку, незважаючи на те, що введення агонистів TLR2 стимулюють проліферацію Treg, їх супресорні функції можуть бути тимчасово пригнічені. Крім того, посилення експресії TLR2 наївними лімфоцитами може стимулювати синтез IL-17 та їх диференціювання в напрямку Th17-клітин, а також сприяти утворенню зі зрілих Treg-клітин лімфоцитів з так званим «Th17-подібним фенотипом» і скороченою супресорної активністю [210].

Отримані нами результати не суперечать даним інших дослідників, які свідчать про важливу роль TLRs у розвитку ЗЗК. Зокрема Tanaka et al. при вивченні експресії Toll-подібних рецепторів у пацієнтів з ЗЗК, виявив збільшення рівня TLR2 і TLR4 в клубовій кишці у порівнянні зі здоровими волонтерами [6]. Frolova et al. вивчаючи біоптати пацієнтів з ЗЗК, показали значне підвищення експресії TLR2 в клубовій кишці у хворих з ХК і НБК [211]. Candia et al. визначили, що у таких пацієнтів відбувається збільшення вироблення розчинної форми TLR2 мононуклеарними клітинами власної пластинки слизової оболонки кишківника [26]. Noronha et al. у своїй роботі прийшли до висновку, що клінічна активність ХК корелює безпосередньо з В-клітинною експресією TLR2 і продукцією такими клітинами IL-8 [212], а Cario встановила, що TLR2 відіграють ключову роль у підтримці цілісності слизової оболонки в мишачій моделі пошкодження епітеліального бар'єру кишківника [27]. Разом з тим є протилежні погляди на цю проблему. Так, Mowat показав, що нокаут за TLR2 не перешкоджає розвитку ЗЗК у експериментальних тварин. Крім того, Foxp3<sup>+</sup> Treg, які здатні запобігати розвитку ЗЗК, не обов'язково повинні експресувати TLR2 [213]. Можливо, ці розбіжності обумовлені тим, що TLR2 грають більш важливу роль при гострих, а не хронічних запальних процесах в кишківнику, а також використанням різних експериментальних моделей ЗЗК — хімічно індукованих і генетичних, пов'язаних з нокаутом певних генів.

Експресія практично всіх відомих Toll-подібних рецепторів на CD4<sup>+</sup> Т-клітинах була ідентифікована на рівні мРНК, а Myd88<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> Т-клітини показали знижену проліферацію у відповідь на активацію TLR, не змогли продукувати прозапальні цитокіни (IL-6, IL-17) і були не здатні індукувати коліт. Стимуляція агоністами TLR2 сприяє диференціюванню Th17 *in vitro* і призводить до проліферації та продукції Th17-залежних цитокінів, а сигналізація через TLR4 впливає на функціональну активність Treg — введення LPS призводить до посилення їх проліферації і виживання *in vitro* та *in vivo*, а супресивна активність Treg збільшується в 10 раз [210]. Тому



виявлені нами зміни рівня експресії TLR2 і TLR4 лімфоцитами можуть безпосередньо впливати на їх функціональну активність.

Отже, пряма активація TLR у різних субпопуляціях Т-лімфоцитів може значно впливати на їх активацію, проліферацію, виживання і продукцію лінійних цитокінів і костимуляторних молекул, істотно змінюючи баланс різних субпопуляцій клітин адаптивної ланки імунної системи. Глобальні стратегії, орієнтовані на використання Toll-подібних рецепторів як фармакологічної мішені, можуть мати непередбачувані наслідки у зв'язку із виявленою їх повсюдною експресією як на кровотворних, так і на інших клітинах. При ЗЗК необхідні додаткові дослідження, щоб визначити, чи можна інгібувати TLR безпосередньо в Т-клітинах для зниження рівня лімфоцитів із прозапальною спрямованістю (насамперед Th1 і Th17). Подальші дослідження і визначення фізіологічного значення як екзогенних, так і ендогенних шляхів активації TLR у лімфоцитах людини дозволять розробити безпечний та ефективний терапевтичний підхід для корекції ЗЗК.

Відомо, що порушення експресії RIGI у мишей призводить до серйозних пошкоджень і запальної інфільтрації в слизовій оболонці кишки [44]. Збільшення експресії RLR в структурах КАЛТ може призводити до надлишкової продукції INF, що в свою чергу, є одним з факторів ризику розвитку ЗЗК. Крім того, зміна рівня експресії RLR може впливати на баланс субпопуляцій Т-хелперів, впливаючи на рівень утворення прозапальних Th17 і Th1-клітин [167].

NOD2 експресується внутрішньоклітинно, в тому числі мієлоїдними клітинами, епітеліоцитами кишківника, клітинами Панета [168, 214] і як нещодавно повідомлялося, Т-клітинами [215]. У NOD2<sup>-/-</sup> та Nod<sup>22939insC</sup> мишей не розвиваються ентерит та коліт [216, 217], але загальний шлях який призводить до хвороби ще не з'ясований. Три загальних ЖК-пов'язаних поліморфізма NOD2 призводять до зниження активації NF-κB [218], маючи на увазі, гіпоморфну функцію NOD2. Тому мононуклеарні клітини від хворих, гомозиготних за цими варіантами показують зменшену секрецію

протизапальних цитокінів після стимуляції MDP (компонент клітинної стінки бактерій) [219]. Тим не менш, хронічне стимулювання NOD2 за допомогою MDP, в контексті мікробіоти кишківника, призводить до толерантності подальшою стимуляцією через TLRs, яка втрачається у пацієнтів з ХК, гомозиготних по алелю NOD<sup>23020insC</sup> [220]. Відповідно до цього, сигналінг від NOD2 може навіть пригнічувати TLR2-опосередковану активацію NF-κB в АПК, яка втрачається у мишачого гомолога — NOD<sup>23020insC</sup> варіанта [221]. Посилення NF-κB активації при стимуляції MDP також спостерігалось у мишей експресуючих мишачий гомолог NOD<sup>23020insC</sup>. Ці миші були більш чутливі до DSS-коліту, який можливо запобігти введенням рекомбінантного IL-1ra [217]. NOD2 також бере участь в аутофагічній відповіді на інвазивні бактерії, індукуючи залучення білка аутофагії ATG16L1 до місця проникнення бактерій на плазматичній мембрані. Примітно, що основні ХК-асоційовані NOD2 варіанти не викликають аутофагію через ATG16L1, отже аутофагічне упакування бактерій порушується [55, 56]. Ці змінені функції NOD2 можуть сприяти збільшенню взаємодії кишкових бактерій з епітелієм, яке спостерігається при ЗЗК [222], а також призводить до нездатності управляти патогенами і синантропної флорою, створюючи умови для запалення [216].

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 [223]. У щурів з нормальним рівнем холестерину в крові, симвастатин поліпшує перебіг гострого TNBS-коліту, блокуючи накопичення нейтрофілів у тонкій кишці і знижуючи рівень сироваткового TNF-α [224]. Lee et al. показали що симвастатин блокує TNF-α-індуковану транскрипційну активність NF-κB, фосфорилування / деградацію IκB і ДНК-зв'язувальну активність NF-κB. Введення симвастатину значно знижує активність DSS-індукованого коліту у мишей за

оцінкою маси тіла, довжиною ободової кишки і гістологічного бала в дозозалежній манері [125].

Наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 5, полягав у вивченні регіональних особливостей розподілу T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>-імунопозитивних лімфоцитів по всій довжині кишківника (від клубової кишки до дистального відділу товстої кишки) контрольної групи щурів, а також вивченні експресії транскрипційних факторів T-bet, GATA3, RORγt і Foxp3 у нормі та в експериментальних тварин.

Що стосується розподілу різних субпопуляцій T-хелперів, ми спостерігали поступове збільшення числа T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>-, Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, від клубової кишки до дистальних відділів товстої кишки (рис. 7.4). Ми встановили що, розвиток ЕГІ супроводжується зменшенням кількості імунопозитивних клітин: T-bet<sup>+</sup>-, RORγt<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів. При цьому кількість GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів не змінювалась. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості T-bet<sup>+</sup>-, GATA3<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів, а також зменшенням Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів. Ефекти від введень симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшилась кількість RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшилась GATA3<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, при ЕХІ симвастатин викликав зменшення T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів. Ефекти від введень АРІЛ-1 теж залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ зменшувалась кількість T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів та збільшувалась кількість GATA3<sup>+</sup>- і Foxp3<sup>+</sup>-лімфоцитів, введення АРІЛ-1 тваринам з ЕХІ викликало зменшення T-bet<sup>+</sup>- і RORγt<sup>+</sup>-лімфоцитів, та збільшення GATA3<sup>+</sup>-лімфоцитів (див. рис. 7.2).

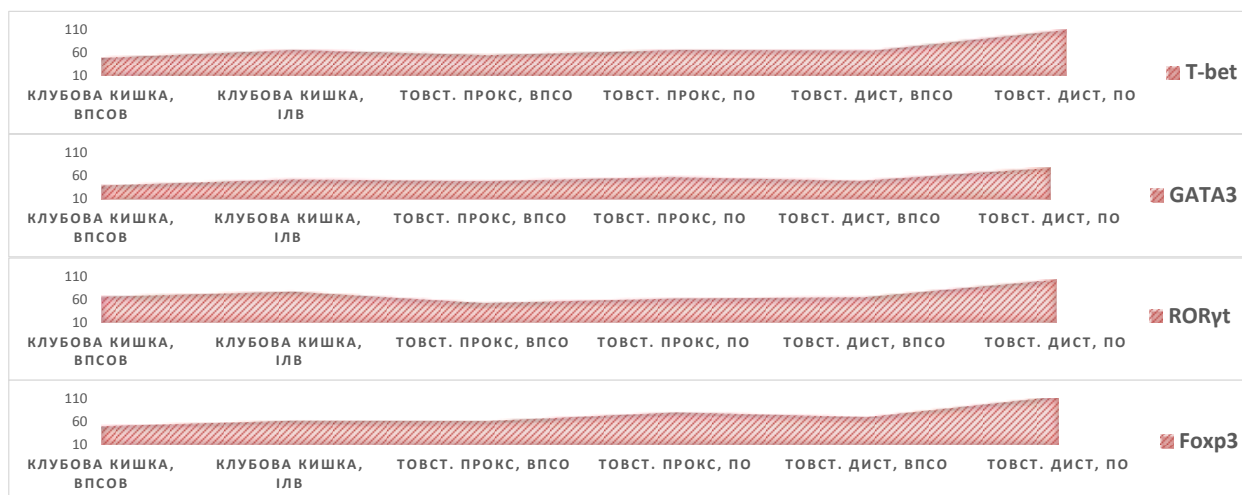


Рис. 7.4 Сумарна щільність (на  $1\text{мм}^2$ )  $T\text{-bet}^+$ ,  $GATA3^+$ ,  $ROR\gamma t^+$ ,  $Foxp3^+$ -імунопозитивних лімфоцитів у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (КЛУБОВА КИШКА, ВПСОВ) та ізольованих лімфоїдних вузликах (КЛУБОВА КИШКА, ІЛВ) клубової кишки контрольної групи тварин; власній пластинці слизової оболонки проксимального (ТОВСТ. ПРОКС, ВПСО) і дистального (ТОВСТ. ДИСТ, ВПСО) відділу товстої кишки; підслизовій основі проксимального (ТОВСТ. ПРОКС, ПО) і дистального (ТОВСТ. ДИСТ, ПО) відділу товстої кишки контрольної групи тварин.

Розвиток ЕК супроводжується зменшенням практично всіх досліджуваних імунопозитивних клітин в проксимальному відділі товстої кишки окрім  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів, на відміну від дистального відділу де спостерігалось збільшення  $GATA3^+$ - і  $ROR\gamma t^+$ -лімфоцитів і зменшення  $T\text{-bet}^+$ - і  $Foxp3^+$ -лімфоцитів. Введення симвастатину і АРІЛ-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості досліджуваних імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки. Однак в проксимальному відділі збільшилась кількість  $T\text{-bet}^+$ -лімфоцитів і не змінилась кількість  $GATA3^+$ -лімфоцитів при введенні симвастатину, а також  $Foxp3^+$ -лімфоцитів при введенні АРІЛ-1 (див. рис. 7.3).

Як повідомлялося Denning et al. — існує зворотна кореляція між числом  $Th17$  і  $Treg$  клітинами по всій довжині кишківника у мишей, число

Th17 поступово зменшується від дванадцятипалої кишки до товстої кишки, а число Treg найвище в товстій кишці [225]. Наші дані збігаються з вищевикладеними і також показують наростання кількості Т-хелперів від клубової кишки до дистального відділу товстої кишки.

Крім того, в тонкій кишці CD4<sup>+</sup> Т-клітини представлені приблизно рівним співвідношенням Foxp3<sup>+</sup> та Foxp3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Т-клітинами, в той час як більшість IL-10-продукуючих клітин в товстій кишці є Foxp3<sup>+</sup> Treg клітинами [226]. У людей більш високий відсоток IL-17-продукуючих CD4<sup>+</sup> Т-клітин був зареєстрований у власній пластинці товстої кишки і клубової кишки [227]. Інші дослідження, проведені Wolff et al. показують, що сліпа кишка має більш високі рівні Th17, Th22 і Foxp3<sup>+</sup> Treg клітин в порівнянні зі термінальним відділом клубової кишки і більш дистальними відділами товстої кишки. На відміну від цього, частота Th1 і Th2 клітин, здається не істотно розрізняється по всій довжині кишківника людини [228].

У тонкій кишці переважають процеси, які пов'язані із захистом від позаклітинних мікроорганізмів, у тому числі вироблення IL-17, IL-22 і антимікробних пептидів. З іншого боку, товста кишка виступає в якості основного резервуара для коменсальної мікрофлори, і її імунітет, здається, спрямован на запобігання запальних реакцій проти неї. Виявлені нами регіональні особливості розподілу клітин вродженого і адаптивного імунітету в різних відділах кишківника можуть бути визначальними факторами локалізації патологічного процесу, і подальше вивчення цих особливостей має велике значення. Стає все більш очевидним, що різноманітність в концентрації харчових та бактеріальних метаболітів, а також широке розмаїття індивідуальних видів бактерій, які населяють різні ділянки в кишківнику, відіграють ключову роль у регіональній імунній спеціалізації. Ці результати підкреслюють потенціал для нових стратегій лікування ЗЗК. Тим часом, ще цілий ряд питань залишається невирішеним: який відносний внесок факторів навколишнього середовища і внутрішніх метаболітів організму в розподілі імунних клітин на протязі кишківника?; як

регіонарні відмінності в мікробному складі і харчових антигенів впливають на склад лімфоцитів і які молекулярні механізми таких впливів?; як різне представництво клітин вродженого і адаптивного імунітету впливає на фізіологічні функції кишківника і локалізацію патологічного процесу?

Більшість захворювань кишківника анатомічно обмежені. Хоча це більш очевидно у випадку з патогенними інфекціями, у яких є своя власна спеціальна ніша, це також відноситься до запальних і онкологічних захворювань. Тим не менш, залишається неясним, як вищезгадані відмінності в співвідношенні ефекторних Т-клітин, Трег клітин та інших субпопуляцій в тонкій і товстій кишці впливає на локалізацію хвороби. Багато з генетичних факторів, що лежать в основі ХК, детерміновані вродженими і адаптивними імунними відповідями на бактерії. До них відносяться NOD2, ATG16L1 і IRGM1. Виробництво антимікробних пептидів клітинами Панета зменшується у пацієнтів з ХК. Найбільш частий ген сприйнятливості — нефункціональна мутація в NOD2, яка визначається у 25-30% хворих з термінальним ілеїтом [206]. Експериментальні моделі спонтанних ЗЗК у дефіцитних по цих генах мишей, або мишей у яких захворювання викликане передачею Т-клітин, або введенням хімічних агентів, як правило обмежені товстою кишкою, часто дистальним відділом товстої кишки і сліпою кишкою [205]. Майже всі з цих моделей є залежними від наявності мікробіоти і пов'язані з CD4<sup>+</sup> Т-клітинами, що продукують ІЛ-17 та інші прозапальні цитокіни. Один винятком з цього — експериментальний коліт, індукований у гризунів шляхом ректальної інстиляції оксазолону, обумовлений зміною продукції супресорного ІЛ-13 вродженими лімфоцитами, в тому числі іNKТ-клітинами [229]. Схожі ІЛ-13-продукуючі іNKТ-клітини були зареєстровані у людей з НВК, але їх пряма роль при цій патології була поставлена під сумнів.

Участь різних субпопуляцій Т-хелперів в імунопатогенезі ЗЗК показано і в інших численних дослідженнях. Так, Neurath et al. показали акумуляцію Т-клітин, що експресують Т-bet у власній пластинці кишківника у пацієнтів з ХК, а також більш високу експресію його в цих клітинах [89]. Переміщення

диференційованих Th17 в організм мишей з лімфопенією призводить до розвитку коліту. Ці дані доводять, що Th17 клітини відіграють центральну роль в патогенезі ЗЗК. Dambacher et al. показали, що пацієнти з ХК мають підвищений рівень IL-17A в слизовій оболонці кишківника, власна пластинка містить підвищену кількість Th17, а фактор транскрипції ROR $\gamma$ t експресується на більш високих рівнях [92]. Ohtani et al. виявили значне посилення експресії GATA3 в слизовій оболонці кишківника у дітей з цими захворюваннями [87], а Vamias et al показали, що розвиток хронічного ілеїту асоційовано зі значним збільшенням експресії мРНК IL-5 і IL-13 — цитокінів Th2 типу у лімфоцитах КАЛТ [88].

Також слід зазначити, що досліджувані нами транскрипційні фактори можуть експресуватися крім класичних Т-хелперів і так званими вродженими лімфоїдними клітинами (innate lymphoid cells, ILCs), що відіграють важливу роль в регулюванні і підтримці кишкового гомеостазу [230]. ILC можуть бути згруповані виходячи з їх селективної залежності від специфічних факторів транскрипції необхідних для їх розвитку і функціонування, і в даний час виділяють три основні групи: T-bet<sup>+</sup> ILCs (група 1), GATA3<sup>+</sup> ILCs (група 2) і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ILCs (група 3). ILC відіграють важливу роль у розвитку, дозріванні КАЛТ та формуванні ІЛВ [231]. Цікаво, що цей процес залежить від наявності синантропних бактерій в кишківнику, припускаючи, що отримані від бактерій сигнали, сприяють ILC-опосередкованому утворенню і дозріванню вторинних лімфоїдних структур в кишківнику. Крім того, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ILCs також сприяють відновленню архітекtonіки вторинних лімфоїдних органів внаслідок порушення гомеостазу імунних клітин вірусними або бактеріальними інфекціями. Секреція ILC3 клітинами цитокіну IL-22 сприяє зниженню проникливості кишкового епітелію і анатомічному стримуванню конкретних видів синантропних бактерій, а зрив цього шляху призводить до транслокації та поширенню бактерій в периферійних тканинах і початку прозапальної відповіді за участю клітин адаптивної ланки імунної системи [232]. Було показано, що зниження IL-22-продукуючих NCR<sup>+</sup> ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> ILC3-

клітин і реципрокне збільшення IFN $\gamma$ -продукуючих ILC1-клітин в товстій і клубовій кишці у пацієнтів з ХК, зумовлює гіпотезу, що баланс між IFN $\gamma$ -продукуючими і IL-22-продукуючими ILC клітинами може впливати на тяжкість запалення кишківника, впливаючи на проникливість кишківника і його репарацію [233]. Powrie et al. встановили збільшення експресії генів Th17-асоційованих цитокінів IL-17A і IL-17F в CD3<sup>-</sup> клітинах кишкової тканини у пацієнтів з ХК [234]. Ці дослідження підкреслюють необхідність кращого розуміння того, як ILC регулюють адаптивний імунітет з метою розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на лікування захворювань, пов'язаних з неадекватними запальними реакціями на синантропну мікрофлору, алергени або аутоантигени. Крім того, розвиток і прогресування ЗЗК може бути пов'язане не тільки зі зміною рівня експресії PRR і дисбалансом адаптивних субпопуляцій Th1, Th2, Th17 і Treg-клітин, а й розподілом в КАЛТ вроджених T-bet<sup>+</sup>, GATA3<sup>+</sup> і ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-лімфоцитів.

Bereswill et al. показали, що після перорального введення симвастатину, миші були захищені від розвитку гострого ілеїту. У тварин які одержували симвастатин значно збільшилося число Treg-клітин, і збільшилася проліферація / регенерація епітеліоцитів в клубовій кишці в порівнянні з плацебо-контролем. На противагу цьому, число Т-лімфоцитів і нейтрофілів у слизовій оболонці мишей які лікувалися, були знижені. Крім того, рівні протизапального цитокіну IL-10 в клубовій кишці, брижових лімфатичних вузлах і селезінці були збільшені, тоді як рівні прозапальних цитокінів (IL-23p19, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1) значно знижені у оброблених тварин в порівнянні з контрольною групою [147].

Наступний етап наших досліджень, якому присвячений розділ 6, полягав у вивченні експресії AhR і Atg16 у нормі та в експериментальних тварин. Ми встановили що, розвиток ЕГІ супроводжується зміною кількості імунопозитивних клітин: збільшенням AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів та зменшенням Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Розвиток ЕХІ супроводжується збільшенням кількості



AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів, при цьому кількість Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів не змінилась. Ефекти від введення симвастатину залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ не змінилась кількість AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів, при EXI симвастатин викликав збільшення AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів при не зміненої кількості Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Ефекти від введення APII-1 не залежали від тривалості перебігу ілеїту: при ЕГІ та EXI зменшувалась кількість AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Розвиток ЕК не супроводжується змінами досліджуваних імунопозитивних клітин в дистальному відділі товстої кишки на відміну від проксимального відділу де спостерігалось збільшення Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів. Введення симвастатину і APII-1 на фоні розвитку коліта призвело до зменшення кількості AhR<sup>+</sup>- і Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів в проксимальному і дистальному відділі товстої кишки. Однак в дистальному відділі не змінилась кількість Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів при введенні симвастатину.

Отримані нами дані дещо збігаються з результатами інших дослідників. Зокрема Furumatsu et al. вивчаючи потенційну роль активаторів AhR в імунній регуляції кишкового епітелію при ЗЗК показали, що при розвитку DSS-індукованого коліту збільшився рівень експресії мРНК AhR в епітелії товстої кишки. Крім того, пероральне введення нетоксичного агоніста AhR — β-нафтофлавона, пригнічує розвиток експериментальної патології. В експериментах на клітинних культурах, пригнічення AhR в клітинах карциноми товстої кишки людини SW480 підсилює запальні відповіді викликані ЛПС, а активація AhR послаблює ЛПС-індуковані запальні відповіді, припускаючи, що експресія AhR епітеліальними клітинами кишківника залучена в запобігання коліту [235].

Активація AhR різними лігандами, такими як продукти харчування, є необхідним для підтримки або збільшення кількості вроджених імунних клітин в кишківнику, таких як інтраепітеліальні лімфоцити кишківника (intestinal intraepithelial lymphocytes, IELs) і лімфоїдні клітини, що продукують IL-22. AhR-дефіцитні миші позбавлені IELs і більш сприйнятливі до бактеріальних інфекцій і експериментального коліту. В

тваринних моделях, активатори AhR інгібують синтез прозапальних цитокінів та послаблюють перебіг коліту. Вивчення AhR в кишківнику людини, показує, що Т-лімфоцити та натуральні клітини-кілери, виділені від пацієнтів з ХК експресують низькі рівні AhR і відповідають на ліганди AhR шляхом зниження синтезу запальних цитокінів [15].

Інша група дослідників на чолі з Takamuga в своїх роботах по вивченню впливу потужного активатора AhR-рецепторів — 2,3,7,8-тетрахлордибензо-*p*-діоксину (ТХДД) на перебіг коліту, у мишей попередньо оброблених ТХДД, показала підвищене вироблення простагландину E2 (PGE2) в товстій кишці, при цьому введенням індометацину знижувало рівень PGE2 та скасовувало інгібуючий вплив ТХДД. В сукупності, активація шляху AhR ТХДД може поліпшити перебіг коліту, принаймні частково, за рахунок виробництва PGE2 [236]. Узагальнюючи результати вчених можна прийти до висновку що, активація шляху AhR може покращити перебіг експериментальних ЗЗК.

Крім того, було показано, що AhR відіграють важливу роль у розвитку Th17 і Treg клітин. Ефект активації Т-клітин цими рецепторами є ліганд-залежним. ТХДД індукує стійку активацію AhR в Treg клітинах [237]. З іншого боку, ліганди що є похідними продуктів харчування, такі як FICZ (метаболіт триптофану) індукують диференціювання Th17 [236]. Відносний вміст різних лігандів, разом з системою поліморфізмів AhR може також модулювати ці відповіді [238]. Підвищена експресія макрофагами товстої кишки мишей дикого типу в порівнянні з  $AHR^{-/+}$  мишами додатково підтверджує роль цього рецептора при коліті. Нове дослідження *in vitro* в макрофагах описало ARNT-незалежний, не геномний AhR шлях, який індукує запальну відповідь [239].

Наявні терапевтичні стратегії для ЗЗК включають поєднання кортикостероїдів та імуномодельюючих препаратів, які швидко зменшують запалення і викликають ремісію. Ці терапевтичні засоби, проте, часто мають

серйозні побічні ефекти. Хоча ТХДД пригнічує запалення в кишківнику, слід визнати, що він не буде слугувати в якості корисного терапевтичного засобу для пацієнтів, в зв'язку з його потенційними токсичними побічними ефектами. Хоча ліганд-специфічні ефекти можуть бути різними в залежності від тривалості активації AhR, необхідно підкреслити, що, на сьогоднішній день, не дуже зрозуміло, чому деякі ліганди, такі як FICZ, потенційно сприяють розвитку Th17-опосередкованих запальних реакцій, в той час як інші, такі як ТХДД, сприяють розвитку Treg-опосередкованих супресивних імунних відповідей. Тому, важливо продовжувати оцінювати вплив на активацію AhR інших лігандів в контексті запалення кишківника.

Функціональний ATG16L1 має вирішальне значення для індукції аутофагії. Білковий кон'югат Atg5-Atg12 взаємодіє з Atg16L1 для формування складного білкового комплексу з високою молекулярною масою, необхідного для елонгації аутофагосомальної мембрани. Активація каспази-3 за наявності загальної алелі ризику призводить до прискореної деградації ATG16L1, клітинного стресу, стимулюючи апоптоз і порушуючи аутофагію в єдиному шляху, який призводить до ХК [179].

Saitoh et al. продемонстрували, що Atg16L1-дефіцитні химерні миші які отримували 5% розчин DSS протягом 7 днів, показали помітне загострення коліту з пониженим виживанням. Миші, позбавлені Atg16L1 в гемопоетичних клітинах дуже чутливі до DSS-індукованого коліту, який був пом'якшений шляхом ін'єкції анти-IL- $\beta$  та IL-18 антитіл, що вказує на важливість Atg16L1 в пригніченні запалення кишківника [51]. Atg16L1<sup>HM</sup> миші також показали підвищену чутливість до DSS-індукованого коліту, який може бути скасований введенням антибіотиків, або введенням анти-TNF або анти-IFN $\gamma$ , антитіл [240].

Таким чином, у дисертаційній роботі ми виявили цілий ряд патофізіологічних і функціональних змін в кишківнику щурів з експериментальними ілеїтом і колітом, які є експериментальним аналогом

ЗЗК у людини. Хоча необхідно підкреслити, що повне екстраполювання результатів отриманих в тваринних моделях на організм людини не цілком доречно з причини того, що виявлені нами зміни функціонального стану КАЛТ при експериментальних ЗЗК, безумовно, є вторинними і грають роль не у виникненні даних захворювань, а в їх розвитку та прогресуванні, на відміну від організму людини при яких вони ж являються первинним тригером і запускають весь ланцюг патофізіологічних змін призводячи власне до ЗЗК.

В цілому виявлені нами закономірності дозволяють виділити наступні ключові ланки розвитку і прогресії ЗЗК (див. схему).

1. Порушення безпосередньо з боку вродженої ланки імунної системи полягає у виявлених нами змінах розподілу TLR2<sup>+</sup> та TLR4<sup>+</sup>-лімфоцитів а також зміні експресії NOD- і RIG-подібних рецепторів. TLR2 розпізнає PAMP бактерій, грибів, вірусів та паразитів які мають у своєму складі ліпопротеїди, ліпотейхоєві кислоти, пептидоглікан. Основним лігандом для TLR4 є ЛПС грамнегативних бактерій. NOD-like рецептори беруть участь у розпізнаванні внутрішньоклітинних патогенів, а RIGI здатні до зондування внутрішньоклітинної вірусної РНК. TLRs можуть індукуватися не тільки PAMP а і DAMP, що походять із середини організму. До них відносять найбільш вивчений негістоновий ядерний білок HMGB1, зміни рівня мРНК якого ми виявили. Після вивільнення із клітини, під час дії клітинного стресу або пошкодження, HMGB1 може зв'язуватися з декількома PRR і сприяти запаленню [69]. Можливо зміни складу мікрофлори кишківника призводять до ненормальної активації перерахованих вище рецепторів вродженого імунітету що тягне за собою розвиток запалення, і може сприяти розвитку ЗЗК. Збудження TLR після розпізнавання PAMP приводить до каскадної активації у клітині факторів транскрипції таких як, NF-κB та інтерферонрегулюючих транскрипційних факторів, кульмінацією чого є утворення прозапальних цитокінів та активація адаптивного імунітету. Зміни в експресії NF-κB в КАЛТ також можуть суттєво впливати на баланс про- і

протизапальних субпопуляцій Т-хелперів [241]. Нами були виявлені зміни рівня експресії мРНК c-Rel субодиниці NF-κB і кількості NF-κB<sup>+</sup>-лімфоцитів в експерименті. NF-κB також сприяє транскрипції найважливішого цитокіна — 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, які були нами продемонстровані, вказують на безпосереднє залучення їх в розвиток і підтримку ЗЗК. TLR4 можуть контролювати функції Т-хелперів. Показано, що CD4<sup>+</sup> Т-клітини експресують різні TLRs. Основні ефекти коstimуляції TLR на ефекторних CD4<sup>+</sup> Т-клітинах включають позитивну регуляцію проліферації, виживання і вироблення цитокінів. Експресія TLR2 у субпопуляціях Th може являти собою еволюційно консервативні шляхи коstimуляції розвитку запалення через індукцію вироблення прозапальних цитокінів IL-17 і IFNγ, а сигнали від TLR можуть як опосередковано підтримувати розвиток Т-клітин через активацію вродженого імунітету, так і безпосередньо сприяти або перешкоджати розвитку і функціонуванню деяких субпопуляцій Т-хелперів [242].

Активация вродженої ланки імунної системи в подальшому запускає набутий імунітет що призводить до залучення різних субпопуляцій Т-хелперів у патологічний процес, яке ми виявили в зміні клітинного складу Tbet<sup>+</sup> (Th1), GATA3<sup>+</sup> (Th2), RORγt<sup>+</sup> (Th17) і Foxp3<sup>+</sup>-клітин (Treg) в кишківнику. Потрібно підкреслити що Th17 є потужними прозапальними клітинами. Недавні дослідження з використанням експериментальної моделі коліту показали, що перенесення Т-клітин з відсутністю RORγt не збільшує рівень синтезу IL-17 у мишей і не індукує коліт, тоді як вплив IL-17A відновило клінічну картину коліту [243]. Ці дослідження показують, що втрата функції RORγt сильно зменшує сприйнятливість до розвитку аутоімунного захворювання у мишей і дозволяють припустити, що, контролюючи диференціювання Th17 і експресію IL-17, RORγt відіграє критичну роль у регуляції запальних та аутоімунних процесів. Важливе значення у розвитку

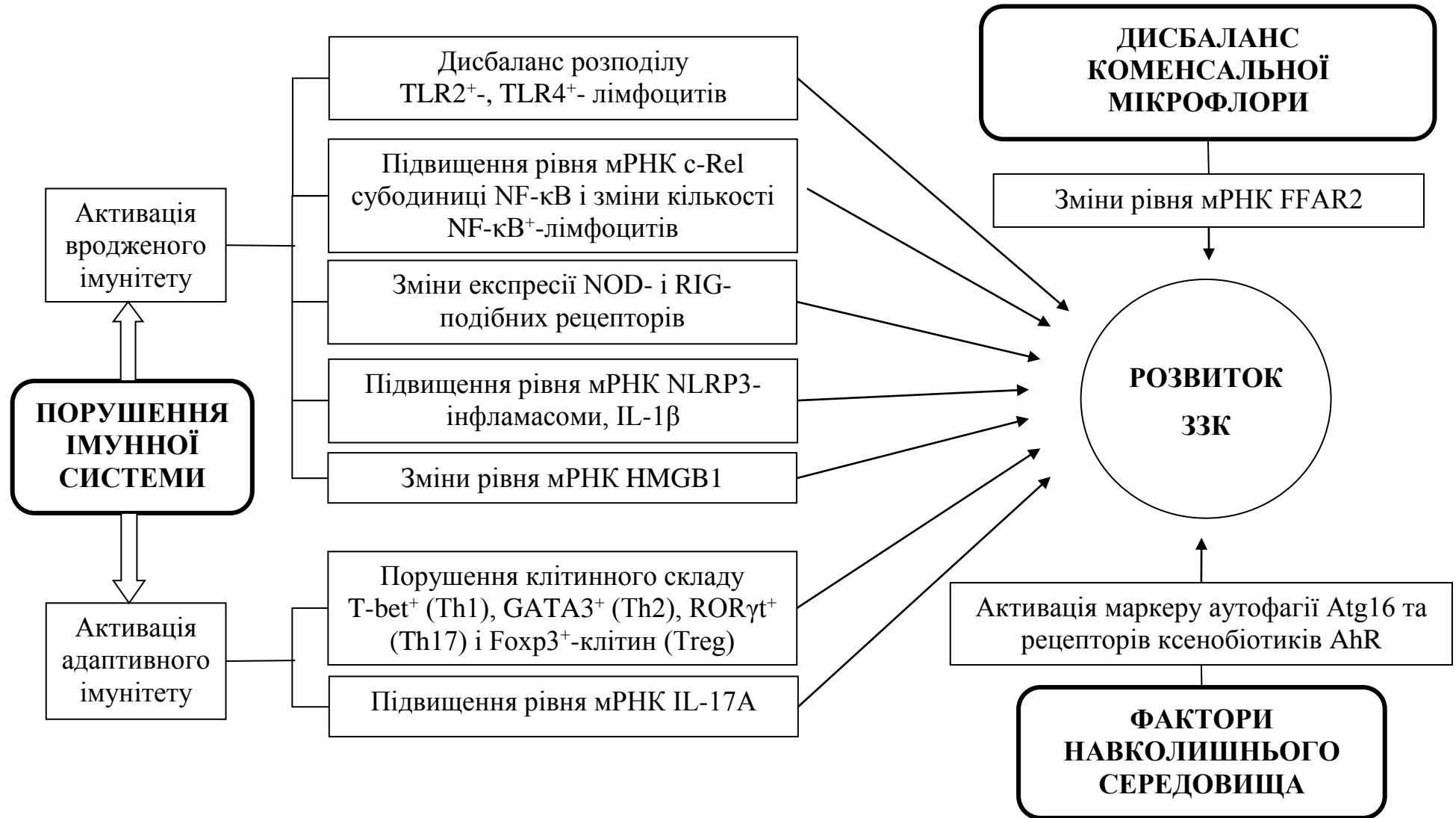
ЗЗК відіграє співвідношення між числом Th17 і Treg-клітин. Treg клітини мають імуносупресивну активність і пригнічують ненормальну або гіперімунну відповідь. Зменшення чисельності субпопуляції натуральних Treg-клітин призводить до розвитку аутоімунних захворювань [244]. Клітини Treg і Th17 взаємно регулюються за участю кількох позитивних і негативних регуляторів. Рівновага між експресією транскрипційних факторів ROR $\gamma$ t і Foxp3 відіграє критичну роль у визначенні, чи будуть наївні CD4<sup>+</sup> Th-клітини диференціюватися в Treg або в Th17. Що до участі Th1 та Th2 в розвитку ЗЗК, є багато повідомлень які показали важливість цих клітин в забезпеченні балансу імунних і аутоімунних реакцій при цих захворюваннях [87]. Тому ми вважаємо що порушення балансу Th17 / Treg та Th1 / Th2 безпосередньо сприяє розвитку ЗЗК.

2. Дисбаланс коменсальної мікрофлори, що змінює рівень лігандів для PRR може призводити до активації вродженого імунітету. Також було показано що рецептор коротколанцюгових жирних кислот — FFAR2 впливає на диференціювання T-клітин, особливо Treg. Так, було продемонстровано що зменшення концентрації трьох найбільш поширених просвітних коротколанцюгових жирних кислот (оцтова, пропіонова і масляна кислота) може сприяти зменшенню числа Treg але не змінює значно кількість Th1 або Th17 в товстій кишці [245]. Ми виявили зміни рівня мРНК FFAR2 в кишківнику експериментальних тварин і вважаємо, що зменшення числа Treg в ньому яке викликане змінами в складі кишкової мікрофлори і відповідно концентрації коротколанцюгових жирних кислот, 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 T-хелперів. Наявність цього рецептора є необхідним для створення певних популяцій імунних клітин в кишківнику. Наприклад, активація AhR посилює диференціювання Th17-клітин, тим самим посилюючи Th17 клітинно-опосередковані аутоімунні реакції [236].

Також AhR експресуються в ДК і ILC-клітинах, а також в різних субпопуляціях CD4<sup>+</sup> Т-клітин адаптивного імунітету [246, 247]. Крім того, харчові ліганди AhR, а також ліганди, які виробляються бактеріями кишківника взаємодіють і змінюють імунітет ШКТ. Мікробіота генерує ліганди, які взаємодіють з AhR і підтримують структуру і стабільність імунітету кишківника. Фізіологічна важливість AhR показана також при апоптозі і відповіді на СЕР. Апоптоз нерозривно пов'язаний з аутофагією — шляхом, який бере участь в обігу клітинних макромолекул і органел і грає важливу роль в різних біологічних процесах. Аутофагія активується різними факторами і включає утворення аутофагосом з подвійною мембраною поглинаючи вміст клітини, пізніше зливаючись з лізосомами. Зв'язок між СЕР і аутофагією включає кілька рівнів і ймовірно відрізняється між типами клітин. Вона також відіграє важливу роль в імунній системі для елімінації внутрішньоклітинних збудників, презентації ендогенних антигенів і формування В- і Т-клітин. Ген *ATG16L1* кодує однойменний білок ATG16L1 який безпосередньо бере участь у процесі аутофагії. Дефіцит ATG16L1 порушує залучення кон'югату ATG12-ATG5 до мембрани, наслідком якого є серйозне порушення формування аутофагосом і деградації білків. Таким чином, існує зв'язок між AhR, апоптозом, відповіддю на СЕР, аутофагією та ATG16L1, і виявлені нами зміни кількості AhR<sup>+</sup>- та Atg16<sup>+</sup>-лімфоцитів у тварин з ілеїтом та колітом яскраво нам це доводять.

## ІМУННІ МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ ЗЗК





## 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 $\beta$  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- $\kappa$ 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<sup>+</sup>-, NOD2<sup>+</sup>- і NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-клітин та зменшення кількості TLR4<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-клітин, а також зміну щільності цих паттерн-розпізнавальних рецепторів і концентрації NF- $\kappa$ 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 $\gamma$ t в імунопозитивних клітинах

4. В умовах розвитку патології у щурів вірогідно зростає кількість AhR<sup>+</sup>-лімфоцитів (при гострому ілеїті на 25%; при хронічному ілеїті на 50%) та щільність цих рецепторів, а також зменшується кількість Atg16<sup>+</sup>-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 APIJ-1 щурам з експериментальною патологією справляє позитивний вплив на клінічні та морфологічні ознаки ілеїту й коліту. За силою ефекту APIJ-1 чинить більш виражену дію. При цьому введення симвастатина і APIJ-1 впливає на вроджений імунітет змінюючи кількість NOD2<sup>+</sup>- і RIGI<sup>+</sup>-лімфоцитів, баланс TLR2<sup>+</sup> / TLR4<sup>+</sup>-клітин, щільність TLR2 і TLR4 рецепторів, кількість NF- $\kappa$ B<sup>+</sup>-лімфоцитів і концентрацію NF- $\kappa$ 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Fiocchi C. J. Inflammatory bowel disease pathogenesis: where are we? / C. J. Fiocchi // *Gastroenterol. Hepatol.* — 2015. — №1. — P. 12–18.
2. Overall and causespecific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies / D. Duricova, N. Pedersen, M. Elkjaer [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2010. — №16. — P. 347–353.
3. Бойко Т. Й. Епідеміологічні особливості запальних захворювань кишечника за даними ДУ «Інститут гастроентерології НАМНУ» / Т. Й. Бойко // *Гастроентерологія.* — 2013. — №1. — С. 12–16.
4. Wang M. H. Gene-environment interactions in inflammatory bowel disease pathogenesis. / M. H. Wang, J. P. Achkar // *Curr. Opin. Gastroenterol.* — 2015. — Vol. 31, №4. — P. 277–282.
5. A novel crosstalk between TLR4- and NOD2-mediated signaling in the regulation of intestinal inflammation. / H. Kim, Q. Zhao, H. Zheng [et al.] // *Sci. Rep.* — 2015. — №5. — P. 12018.
6. Tanaka K. Expression of Toll-like receptors in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease / K. Tanaka // *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* — 2008. — Vol. 2, №2. — P 193–196.
7. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface / J. M. Wells, O. Rossi, M. Meijerink, P. van Baarlen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — №108. — P. 4607–4614.
8. Pattern recognition receptors-molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease / D. Walsh, J. McCarthy, C. O'Driscoll, S. Melgar // *Cytokine Growth Factor Rev.* — 2013. — Vol. 24, №2. — P. 91–104.

9. Spehlmann M. E. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction / M. E. Spehlmann, L. Eckmann // *Curr. Opin. Gastroenterol.* — 2009. — №25. — P. 92–99.
10. Visekruna A. A Key Role for NF-κB Transcription Factor c-Rel in T-Lymphocyte-Differentiation and Effector Functions / A. Visekruna, A. Volkov, U. Steinhoff // *Clin. Dev. Immunol.* — 2012. — №2012. — P. 239–368.
11. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response / A. Baroja-Mazo, F. Martín-Sánchez, A. I. Gomez [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2014. — Vol. 15, №8. — P. 738–748.
12. Role of high-mobility group box 1 protein in inflammatory bowel disease / Z. Hu, X. Wang, L. Gong [et al.] // *Inflamm. Res.* — 2015. — Vol. 64, №8. — P. 557–563.
13. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease / M. Salem, M. Ammitzboell, K. Nys [et al.] // *Autophagy.* — 2015. — Vol. 11, №4. — P. 585–594.
14. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines / M. A. Cox, J. Jackson, M. Stanton [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — №15. — P. 5549–5557.
15. The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis / I. Monteleone, T. T. MacDonald, F. Pallone, G. Monteleone // *Curr. Opin. Gastroenterol.* — 2012. — Vol. 28, №4. — P. 310–313.
16. Immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on the gene expression of major transcription factors of T cell subsets / A. Mohammadzadeh, A. A. Pourfathollah, S. Shahrokhi [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* — 2014. — Vol. 20, №2. — P. 316–321.

17. Hermann-Kleiter N. Orphan nuclear receptor NR2F6 acts as an essential gatekeeper of Th17 CD4+ T cell effector functions / N. Hermann-Kleiter, G. Baier // *Cell Commun. Signal.* — 2014. — Vol. 12, №1. — P. 38.
18. Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Causative Factors, Issues, Drug Treatment Strategies, and Delivery Approaches / D. Singh, S. Srivastava, M. Pradhan [et al.] // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* — 2015. — Vol. 32, №3. — P. 181–214.
19. Effect of atorvastatin with or without prednisolone on Freund's adjuvant induced-arthritis in rats / A. A. Abdin, M. S. Abd El-Halim, S. E. Hedeya, A. A. El-Saadany // *Eur. J. Pharmacol.* — 2012. — Vol. 676, №1-3. — P. 34–40.
20. Artero A. Statins for sepsis: has their time come? / A. Artero // *Crit. Care Med.* — 2012. — Vol. 40, №4. — P. 1336–1337.
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.
22. O'Connor M. B. Ulcerative colitis — epidemiology, pathogenesis and complications / M. B. O'Connor. — InTech: Croatia, 2011. — P. 280.
23. Lakatos P. L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? / P. L. Lakatos // *World J. Gastroenterol.* — 2006. — Vol. 12, №38. — P. 6102–6108.
24. Kaser A. Inflammatory bowel disease / A. Kaser, S. Zeissig, R. S. Blumberg // *Annu. Rev. Immunol.* — 2010. — №28. — P. 573–621.
25. Thompson A. I. Genetics of ulcerative colitis / A. I. Thompson, C. W. Lees // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2011. — №17. — P. 831–848.
26. Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients. / E. Candia, D. Díaz-Jiménez, P. Langjahr [et al.] // *Immunobiology.* — 2012. — Vol. 217, №6. — P. 634–642.

27. Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2 / E. Cario // *Mucosal Immunol.* — 2008. — Vol. 1. — P. 62–66.
28. Jensen S. R. Are NOD2 polymorphisms linked to a specific disease endophenotype of Crohn's disease? / S. R. Jensen, O. H. Nielsen, S. Brix // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2011. — Vol. 17, №11. — P. 2392–2401.
29. Cho J. H. The Nod2 gene in Crohn's disease: implications for future research into the genetics and immunology of Crohn's disease / J. H. Cho // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2001. — №7. — P. 271–275.
30. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis / J. Seiderer, F. Schnitzler, S. Brand [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* — 2006. — №41. — P. 1421–1432.
31. Pasparakis M. IKK/NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells controls immune homeostasis in the gut / M. Pasparakis // *Mucosal Immunol.* — 2008. — №1. — P. 54–57.
32. Opposing functions of IKKbeta during acute and chronic intestinal inflammation / L. Eckmann, T. Nebelsiek, A. A. Fingerle [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — №105. — P. 15058–15063.
33. Hori S. c-Rel: a pioneer in directing regulatory T-cell lineage commitment? / S. Hori // *Eur. J. Immunol.* — 2010. — №40. — P. 664–667.
34. Unravelling the complexities of the NF-κB signaling pathway using mouse knockouts and transgenic models / S. Gerondakis, R. Grumont, R. Gugasyan [et al.] // *Oncogene.* — 2006. — №25. — P. 6781–6799.
35. Gerondakis S. Roles of the NF-κB pathway in lymphocyte development and function / S. Gerondakis, U. Seibenlist // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2010. — Vol. 2, №5. — P. 182.
36. Grumont R. J. Rel-dependent induction of A1 transcription is required to protect B cells from antigen receptor ligation-induced apoptosis / R. J.

- Grumont, I. J. Rourke, S. Gerondakis // *Genes. Dev.* — 1999. — №13. — P. 400–411.
37. Analysis of the REL polymorphism rs13031237 in autoimmune diseases / J. Varadé, R. Palomino-Morales, N. Ortego-Centeno [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* — 2011. — №70. — P. 711–712.
38. Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF- $\kappa$ B signaling / G. Trynka, A. Zhernakova, J. Romanos [et al.] // *Gut.* — 2009. — Vol. 58, №8. — P. 1078–1083.
39. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-c and ERAP1 / A. Strange, F. Capon, C. C. Spencer [et al.] // *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 42, №11. — P. 985–990.
40. Cho J. H. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease / J. H. Cho, S. R. Brant // *Gastroenterology.* — 2011. — №140. — P. 1704–1712.
41. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3) / V. Enciso-Mora, P. Broderick, Y. Ma [et al.] // *Nat. Genet.* — 2010. — №42. — P. 1126–1130.
42. The transcription factors c-rel and RelA control epidermal development and homeostasis in embryonic and adult skin via distinct mechanisms / R. Gugasyan, A. Voss, G. Varigos [et al.] // *Mol. Cell Biol.* — 2004. — №24. — P. 5733–5745.
43. Intestinal Microbiota as Modulators of the Immune System and Neuroimmune System: Impact on the Host Health and Homeostasis / C. M. Maranduba, S. B. De Castro, G. T. de Souza [et al.] // *J. Immunol. Res.* — 2015. — №2015. — P. 931574.
44. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon / X. Wang, M. Li, H. Zheng [et al.] // *J. Virol.* — 2000. — №74. — P. 11566–11573.

45. Rig-I(-/-) mice develop colitis associated with downregulation of Galpha2 / Y. Wang, H. X. Zhang, Y. P. Sun [et al.] // *Cell Res.* — 2007. — №17. — P. 858–868.
46. Interferon- $\gamma$  induces expression of MHC class II on intestinal epithelial cells and protects mice from colitis / C. Thelemann, R. O. Eren, M. Coutaz, J. Brasseit // *PLoS One.* — 2014. — Vol. 9, №1. — P. 86844.
47. Beneficial innate signaling interference for antibacterial responses by a Toll-like receptor-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis / H. Negishi, K. Matsuki, N. Endo [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2013. — Vol. 110, №49. — P. 19884–19889.
48. Programmed cell death and its role in inflammation / Y. Yang, G. Jiang, P. Zhang, J. Fan // *Mil. Med. Res.* — 2015. — № 2. — P. 12.
49. HMGB1-DNA Complex-induced Autophagy Limits AIM2 Inflammasome Activation through RAGE / L. Liu, M. Yang, R. Kang [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2014. — Vol. 450, №1. — P. 851–856.
50. Spalinger M. R. Crohn's disease: loss of tolerance or a disorder of autophagy? / M. R. Spalinger, G. Rogler, M. Scharl // *Dig. Dis.* — 2014. — Vol. 32, №4. — P. 370–377.
51. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production / T. Saitoh, N. Fujita, M. H. Jang [et al.] // *Nature.* — 2008. — №456. — P. 264–268.
52. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells / K. Cadwell, J. Y. Liu, S. L. Brown [et al.] // *Nature.* — 2008. — № 456. — P. 259–263.
53. Jakopin Z. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain (NOD) Inhibitors: A Rational Approach toward Inhibition of NOD Signaling Pathway / Z. Jakopin // *J. Med. Chem.* — 2014. — Vol. 57, №16. — P. 6897–6918.
54. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant / P. Kuballa, A. Huett, J. D. Rioux [et al.] // *PLoS One.* — 2008. — Vol. 3, №10. — P. 3391.



55. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry / L. H. Travassos, L. A. Carneiro, M. Ramjeet [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2010. — Vol. 11, №1. — P. 55–62.
56. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation / R. Cooney, J. Baker, O. Brain [et al.] // *Nat. Med.* — 2010. — Vol. 16, №1. — P. 90–97.
57. Corridoni D. Functional defects in NOD2 signaling in experimental and human Crohn disease / D. Corridoni, K. O. Arseneau, F. Cominelli // *Gut Microbes.* — 2014. — Vol. 5, №3. — P. 340–344.
58. Sutterwala F. S. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation / F. S. Sutterwala, S. Haasken, S. L. Cassel // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2014. — №1319. — P. 82–95.
59. Dinarello C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family / C. A. Dinarello // *Annu. Rev. Immunol.* — 2009. — №27. — P. 519–550.
60. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells / A. J. Beelen, Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter [et al.] // *Immunity.* — 2007. — Vol. 27, №4. — P. 660–669.
61. Павленко В. В. Провоспалительные цитокины в патогенезе язвенного колита / В. В. Павленко // *Новое в гастроэнтерологии от патогенеза к клинической практике: сб. науч. тр. Ставроп. гос. мед. акад.; под ред. А.В. Ягоды.* — Ставрополь: СтГМА. — 2003. — С. 149–158.
62. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation / V. Casini-Raggi, L. Kam, Y. J. Chong [et al.] // *J. Immunol.* — 1995. — №154. — P. 2434–2440.
63. Maeda S. Mucosal imbalance of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist in canine inflammatory bowel disease / S. Maeda // *Vet. J.* — 2012. Vol. 194, №1. — P. 66–70.

64. IL-1 $\beta$ -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation / B. Siegmund, H. A. Lehr, G. Fantuzzi, C. A. Dinarello // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — Vol. 98, №23. — P. 13249–13254.
65. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling / Y. Chung, S. H. Chang, G. J. Martinez [et al.] // *Immunity.* — 2009. — №30. — P. 576–587.
66. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1 $\beta$  secretion / J. Shi, S. Aono, W. Lu [et al.] // *J. Immunol.* — 2007. — №179. — P. 1245–1253.
67. Land W. G. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine / W. G. Land // *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* — 2015. — Vol. 15, № 2. — P. 157–170.
68. High mobility group box 1 is essential for mitochondrial quality control / D. Tang, R. Kang, K. M. Livesey [et al.] // *Cell Metab.* — 2011. — №13. — P. 701–711.
69. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation / X. Zhu, J. S. Messer, Y. Wang [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2015. — Vol. 125, №3. — P. 1098–1110.
70. Li G. HMGB1: the central cytokine for all lymphoid cells / G. Li, X. Liang, M. T. Lotze // *Front. Immunol.* — 2013. — №4. — P. 68.
71. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release / E. Venereau, M. Casalgrandi, M. Schiraldi [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2012. — №209. — P. 1519–1528.
72. Endoplasmic reticulum stress and its regulator XBP-1 contributes to dendritic cell maturation and activation induced by high mobility group box-1 protein / X. M. Zhu, F. H. Yao, Y. M. Yao [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2012. — №44. — P. 1097–1105.

73. High mobility group box chromosomal protein 1 act as a proliferator signal for activated T lymphocytes / E. Sundberg, A. E. Fasth, K. Palmblad [et al.] // *Immunobiology*. — 2009. — №214. — P. 303–309.
74. HMGB1: endogenous danger signaling / J. R. Klune, R. Dhupar, J. Cardinal [et al.] // *Mol. Med.* — 2008. — №14. — P. 476–484.
75. Roles of high-mobility group box 1 in murine experimental colitis / H. Yamasaki, K. Mitsuyama, J. Masuda [et al.] // *Mol. Med. Rep.* — 2009. — Vol. 2, №1. — P. 23–27.
76. Dipotassium Glycyrrhizate Inhibits HMGB1-Dependent Inflammation and Ameliorates Colitis in Mice // R. Vitali, F. Palone, S. Cucchiara [et al.] // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8, №6. — P. 66527.
77. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases / D. A. Peterson, D. N. Frank, N. R. Pace, J. I. Gordon // *Cell Host Microbe*. — 2008. — №3. — P. 417–427.
78. Молекулярные аспекты симбиоза в системе: хозяин-микробиота / В. Н. Бабин, О. Н. Минушкин, А. В. Дубинин [и др.] // *Росс. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. — 1998. — №6. — С. 76–81.
79. G protein-coupled receptor 35: an emerging target in inflammatory and cardiovascular disease / N. Divorcy, A. E. Mackenzie, S. A. Nicklin, G. Milligan // *Front. Pharmacol.* — 2015. — №6. — P. 41.
80. Dietary Gut Microbial Metabolites, Short-chain Fatty Acids, and Host Metabolic Regulation / M. Kasubuchi, S. Hasegawa, T. Hiramatsu [et al.] // *Nutrients*. — 2015. — Vol. 7, №4. — P. 2839–2849.
81. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation / C. Sina, O. Gavrilova, M. Förster [et al.] // *J. Immunol.* — 2009. — №183. — P. 7514–7522.
82. SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor / M. A. Vinolo, G. J. Ferguson, S. Kulkarni [et al.] // *PLoS One*. — 2011. — Vol. 6, №6. — P. 21205.

83. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 / K. M. Maslowski, A. T. Vieira, A. Ng [et al.] // *Nature*. — 2009. — №461. — P. 1282–1286.
84. Regulation of inflammation by short chain fatty acids / M. A. Vinolo, H. G. Rodrigues, R. T. Nachbar, R. Curi // *Nutrients*. — 2011. — №3. — P. 858–876.
85. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: Potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production / M. D. Saemann, G. A. Bohmig, C. H. Osterreicher [et al.] // *The FASEB Journal*. — 2000. — №14. — P. 2380–2382.
86. Histone deacetylase inhibitor, butyrate, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice / Y. F. Ni, J. Wang, X. L. Yan [et al.] // *Respir. Res.* — 2010. — №11. — P. 33.
87. Increased mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 in pediatric ulcerative colitis / K. Ohtani, Y. Ohtsuka, T. Ikuse [et al.] // *Pediatrics International*. — 2010. — Vol. 52, №4. — P. 584–589.
88. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation / G. Bamias, C. Martin, M. Mishina [et al.] // *Gastroenterology*. — 2005. — Vol. 128, №3. — P. 654–666.
89. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease / M. F. Neurath, B. Weigmann, S. Finotto [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2002. — Vol. 195, №9. — P. 1129–1143.
90. T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease / K. Matsuoka, N. Inoue, T. Sato [et al.] // *Gut*. — 2004. — Vol. 53, №9. — P. 1303–1308.
91. Huber S. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine / S. Huber, N. Gagliani, R. A. Flavell // *Eur. J. Immunol.* — 2012. — Vol. 42, №9. — P. 2238–2245.

92. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation / J. Dambacher, F. Beigel, K. Zitzmann [et al.] // *Gut*. — 2009. — Vol. 58, №9. — P. 1207–1217.
93. FoxP3+RORgammat+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes / D. M. Tartar, A. M. Van Morlan, X. Wan [et al.] // *J. Immunol.* — 2010. — Vol. 184, №7. — P. 3377–3385.
94. Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients / A. Ueno, H. Jijon, R. Chan [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2013. — Vol. 19, №12. — P. 2522–2534.
95. Human memory FOXP3+ Tregs secrete IL-17 ex vivo and constitutively express the T(H)17 lineage-specific transcription factor RORgamma t / M. Ayyoub, F. Deknuydt, I. Raimbaud [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106, №21. — P. 8635–8640.
96. Dioxins: an overview / A. Schecter, L. Birnbaum, J. J. Ryan, J. D. Constable // *Environ. Res.* — 2006. — №101. — P. 419–428.
97. Stevens E. A. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system / E. A. Stevens, J. D. Mezrich, C. A. Bradfield // *Immunology.* — 2009. — Vol. 127, №3. — P. 299–311.
98. High levels of dioxin-like potential in cigarette smoke evidenced by in vitro and in vivo biosensing / A. Kasai, N. Hiramatsu, M. Kitamura [et al.] // *Cancer Res.* — 2006. — Vol. 66, №14. — P. 7143–7150.
99. Stejskalova L. Endogenous and exogenous ligands of aryl hydrocarbon receptor: current state of art / L. Stejskalova, Z. Dvorak, P. Pavek // *Curr. Drug Metab.* — 2011. — №12. — P. 198–212.
100. An endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand acts on dendritic cells and T cells to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis / F. J. Quintana, G. Murugaiyan, M. F. Farez [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — №107. — P. 20768–20773.

101. Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells including suppressors of alloreactivity / S. Yamazaki, K. Inaba, K. V. Tarbell, R. M. Steinman // *Immunol. Rev.* — 2006. — №212. — P. 314–329.
102. Mottet C. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use / C. Mottet, D. Golshayan // *Swiss. Med. Wkly.* — 2007. — №137. — P. 625–634.
103. Larosa D. F. Lymphocytes / D. F. Larosa, J. S. Orange // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2008. — №2. — P. 364–369.
104. Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands / K. Kawajiri, Y. Kobayashi, F. Ohtake [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — Vol. 106, №32. — P. 13481–13486.
105. Ray S. S. Dioxin-induced immortalization of normal human keratinocytes and silencing of p53 and p16INK4a / S. S. Ray, H. I. Swanson // *J. Biol. Chem.* — 2004. — Vol. 279, №26. — P. 27187–27193.
106. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis / J. L. Marlowe, Y. Fan, X. Chang [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* — 2008. — Vol. 19, №8. — P. 3263–3271.
107. Vogel C. F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family / C. F. Vogel, F. Matsumura // *Biochem. Pharmacol.* — 2009. — Vol. 77, №4. — P. 734–745.
108. Dual suppression of adipogenesis by cigarette smoke through activation of the aryl hydrocarbon receptor and induction of endoplasmic reticulum stress / T. Shimada, N. Hiramatsu, K. Hayakawa [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2009. — Vol. 296, №4. — P. 721–730.
109. Neurath M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease / M. F. Neurath // *Nat. Rev. Immunol.* — 2014. — Vol. 14, №5. — P. 329–342.

110. Пауков В. С. Роль макрофагов в патогенезе ограниченного воспаления / В. С. Пауков, С. А. Даабуль, Н. Ю. Беляева // Архив патологии, 2005. №4.— С. 3–10.
111. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease / S. C. Ng, J. L. Benjamin, N. E. McCarthy [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2011. — №17. — P. 2027–2037.
112. 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. 191, №1. — P. 66–70.
113. IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4<sup>+</sup> Th17 cells / M. Coccia, O. J. Harrison, C. Schiering [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2012. — №209. — P. 1595–1609.
114. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease / T. Kanai, M. Watanabe, A. Okazawa [et al.] // *Gastroenterology.* — 2001. — №121. — P. 875–888.
115. 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 / B. Neven, I. Marvillet, C. Terrada [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2010. — Vol. 62, №1. — P. 258–267.
116. Фаллер Д. М. Молекулярная биология клетки / Д. М. Фаллер, Д. Шилдс. — Москва: БинОМ-Пресс, 2006. — 256 с.
117. Liao J. K. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins / J. K. Liao // *J. Clin. Invest.* — 2002. — Vol. 110, №3. — P. 285–288.
118. Greenwood J. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation / J. Greenwood, L. Steinman, S. S. Zamvil // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — Vol. 6, №5. — P. 358–370.

119. Atorvastatin attenuates TLR4-mediated NF-kappaB activation in a MyD88-dependent pathway / P. Chansrichavala, U. Chantharaksri, P. Sritara S. C. Chaiyaroj // *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* — 2009. — Vol. 27, №1. — P. 49–57.
120. Differential effects of statins on relevant functions of human monocyte-derived dendritic cells / A. Yilmaz, C. Reiss, A. Weng [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* — 2006. — Vol. 79, №3. — P. 529–538.
121. 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.
122. Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy / S. Linthout, A. Riad, N. Dhayat [et al.] // *Diabetologia.* — 2007. — Vol. 50, №9. — P. 1977–1986.
123. Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model / T. Aprahamian, R. Bonegio, J. Rizzo [et al.] // *J. Immunol.* — 2006. — Vol. 177, №5. — P. 3028–3034.
124. Simvastatin inhibits production of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 and cell proliferation induced by tumor necrosis factor-alpha in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis / K. Yokota, T. Miyazaki, M. Hirano [et al.] // *J. Rheumatol.* — 2006. — Vol. 33, №3. — P. 463–471.
125. Simvastatin inhibits NF-kappaB 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.
126. 3-Hydroxyl-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) Reductase Inhibitor (Statin)-induced 28-kDa Interleukin-1 $\beta$  Interferes with Mature IL-1 $\beta$  Signaling / F. Davaro, S. D. Forde, M. Garfield [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2014. — Vol. 289, №23. — P 16214–16222.



127. 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.
128. Ширинский И. В. Использование статинов — новый подход к терапии аутоиммунных заболеваний / И. В. Ширинский, В. А Козлов, В. С. Ширинский // *Вестник РАМН*. — 2009. — №2. — С. 26–32.
129. Simvastatin treatment does not protect retinal ganglion cells from degeneration in a rat model of autoimmune optic neuritis / M. B. Sattler, R. Diem, D. Merkler [et al.] // *Exp. Neurol*. — 2005. — Vol. 193, №1. — P. 163–171.
130. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis / J. Greenwood, C. E. Walters, G. Pryce [et al.] // *FASEB J*. — 2003. — Vol. 17, №8. — P. 905–907.
131. Effects of pravastatin in murine collagen-induced arthritis / T. Yamagata, K. Kinoshita, Y. Nozaki [et al.] // *Rheumatol. Int*. — 2007. — Vol. 27, №7. — P. 631–639.
132. Suppression of autoimmune retinal disease by lovastatin does not require Th2 cytokine induction / M. E. Gegg, R. Harry, D. Hankey [et al.] // *J. Immunol*. — 2005. — Vol. 174, №4. — P. 2327–2335.
133. The effects of atorvastatin in experimental autoimmune uveitis / P. B. Thomas, T. Albini, R. K. Giri [et al.] // *Br. J. Ophthalmol*. — 2005. — Vol. 89, №3. — P. 275–279.
134. Antiarrhythmic effect of atorvastatin on autoimmune myocarditis is mediated by improving myocardial repolarization / Q. Tang, J. Huang, H. Qian [et al.] // *Life Sci*. — 2007. — Vol. 80, №7. — P. 601–608.
135. Effects of atorvastatin on the Th1/Th2 polarization of ongoing experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats / W. Liu, W. M. Li, C. Gao, N. L. Sun // *J. Autoimmun*. — 2005. — Vol. 25, №4. — P. 258–263.

136. Atorvastatin inhibits autoreactive B cell activation and delays lupus development in New Zealand black/white F1 mice / S. Lawman, C. Mauri, E. C. Jury [et al.] // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 173, №12. — P. 7641–7646.
137. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells / F. Heller, I. J. Fuss, E. E. Nieuwenhuis [et al.] // *Immunity.* — 2002. — №17. — P. 629–638.
138. 16,16-dimethyl prostaglandin E2 inhibits indomethacin-induced small intestinal lesions through EP3 and EP4 receptors / T. Kunikata, M. Umeda, A. Tanaka [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* — 2002. — №47. — P. 894–904.
139. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats / A. Konaka, M. Nishijima, A. Tanaka [et al.] // *Pharmacol. Res.* — 1999. — №40. — P. 517–524.
140. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin / T. Yamada, E. Deitch, R. D. Specian [et al.] // *Inflammation.* — 1993. — Vol. 17, №6. — P. 641–662.
141. Jain M. K. Anti-inflammatory effects of statins:clinical evidence and basic mechanisms / M. K. Jain, P. M. Ridker // *Nat. Rev. Drug. Discov.* — 2005. — Vol. 4, №12. — P. 977–987.
142. Derelanko M. J. Effects of corticosteroids on indomethacin-induced intestinal ulceration in the rat / M. J. Derelanko, J. F. Long // *Dig. Dis. Sci.* — 1980. — Vol. 25, №11. — P. 823–829.
143. Wang X. Oxazolone-induced murine model of ulcerative colitis / X. Wang, Q. Ouyang, W. J. Luo // *Chin. J. Dig. Dis.* — 2004. — Vol. 5, №4. — P. 165–168.
144. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4 / M. Boirivant, I. J. Fuss, A. Chu, W. Strober // *J. Exp. Med.* — 1998. — Vol. 188, №10. — P. 1929–1939.

145. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation / S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M. F. Neurath // *Nat. Protoc.* — 2007. — Vol. 2, №3. — P. 541–546.
146. Therapeutic effects of *Clostridium butyricum* on experimental colitis induced by oxazolone in rats / H. Q. Zhang, T. T. Ding, J. S. Zhao [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2009. — №15. — P. 1821–1828.
147. Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation / S. Bereswill, M. Muñoz, A. Fischer [et al.] // *PLoS One.* — 2010. — №5. — P. 95–96.
148. Коваленко Є. М. Фармакологічне вивчення протизапальної активності антагоніста рецепторів інтерлейкіна-1 (АІЛ-1): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук / Коваленко Євген Миколайович — Харків, 2009. — 19 с.
149. Nonmyeloablative stem cell therapy enhances microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease / P. N. Khalil, V. Weiler, P. J. Nelson [et al.] // *Gastroenterology.* — 2007. — №132. — P. 944–954.
150. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice / G. Hartmann, C. Bidlingmaier, B. Siegmund [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2000. — №292. — P. 22–30.
151. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon / G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge [et al.] // *Gastroenterology.* — 1989. — №96. — P. 795–803.
152. Jagtap A. G. Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel diseases / A. G. Jagtap, S. S. Shirke, A. S. Phadke // *J. Ethnopharmacol.* — 2004. — Vol. 90, №2-4. — P. 195–204.
153. Effects of anti-tumour necrosis factor, interleukin-10 and antibiotic therapy in the indometacin-induced bowel inflammation rat model / S. Colpaert, Z. Liu, B. De Greef [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 2001. — Vol. 15, №11. — P. 1827–1836.

154. Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems / S. A. Bustin // *J. Mol. Endocrinology*. — 2002. — №29. — P. 23–39.
155. Dinarello C. A. A clinical perspective of IL-1 $\beta$  as the gatekeeper of inflammation / C. A. Dinarello // *Eur. J. Immunol.* — 2011. — №41. — P. 1203–1217.
156. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity / L. A. Fouser, J. F. Wright, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins [et al.] // *Immunol. Rev.* — 2008. — №226. — P. 87–102.
157. Mankan A. K. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: inflammasomes: mechanisms of activation / A. K. Mankan, A. Kubarenko, V. Hornung // *Clin. Exp. Immunol.* — 2012. — №167. — P. 369–381.
158. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility / A. C. Villani, M. Lemire, G. Fortin [et al.] // *Nat. Genet.* — 2009. — №41. — P. 71–76.
159. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity / M. T. Lotze, H. J. Zeh, A. Rubartelli [et al.] // *Immunol. Rev.* — 2007. — №220. — P. 60–81.
160. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis / H. Yang, D. J. Antoine, U. Andersson, K. J. Tracey // *J. Leukoc. Biol.* — 2013. — №93. — P. 865–873.
161. c-Rel is Essential for the Development of Innate and T cell-Induced Colitis / Y. Wang, B. H. Rickman, T. Poutahidis [et al.] // *J. Immunol.* — 2008. — Vol. 180, №12. — P. 8118–8125.
162. Gilmore T. D. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease / T. D. Gilmore, S. Gerondakis // *Genes Cancer*. — 2011. — Vol. 2, №7. — P. 695–711.

163. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases / C. M. Ferreira, A. T. Vieira, M. A. Vinolo [et al.] // *J. Immunol. Res.* — 2014. — №2014. — P. 689492.
164. Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets / T. Ulven // *Front. Endocrinol.* — 2012. — №3. — P. 111.
165. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: Toll-like receptors on fetal enterocit / R. D. Fusunyan, N. N. Nanthakumar, M. E. Baldeon W. A. Walker // *Pediatr. Res.* — 2001. — Vol. 49, №4. — P. 589–593.
166. Shih D. Q. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease / D. Q. Shih, S. R. Targan // *World J. Gastroenterol.* — 2008. — №14. — P. 390–400.
167. Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses/ H. Negishi, H. Yanai, A. Nakajima [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2012. — Vol. 13, №7. — P. 659–666.
168. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation / O. Gutierrez, C. Pipaon, N. Inohara [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, №44. — P. 41701–41705.
169. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells / P. Rosenstiel, M. Fantini, K. Brautigam [et al.] // *Gastroenterology.* — 2003. — Vol. 124, №4. — P. 1001–1009.
170. Bouma G. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease / G. Bouma, W. Strober // *Nat. Rev. Immunology.* — 2003. — Vol.3, №7. — P. 521–533.
171. Strober W. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases / W. Strober, I. J. Fuss // *Gastroenterology.* — 2011. — Vol.140, № 6. — P. 1756–1767.

172. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5 / I. J. Fuss, M. Neurath, M. Boirivant [et al.] // *J.Immunol.* — 1996. — №3. — P. 1261–1270.
173. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease / L. Rovedatti, T. Kudo, P. Biancheri [et al.] // *Gut.* — 2009. — №12. — P. 1629–1636.
174. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells / I. I. Ivanov, B. S McKenzie, L. Zhou [et al.] // *Cell.* — 2006. — №6. — P. 1121–1133.
175. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3 and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner / S. Huber, N. Gagliani, E. Esplugues [et al.] // *Immunity.* — 2011. — №4. — P. 554–565.
176. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation / S. Z. Josefowicz, R. E. Niec, H. Y. [et al.] // *Nature.* — 2012. — №7385. — P. 395–399.
177. Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology / M. Kamanaka, S. Huber, L. A. Zenewicz [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2011. — №5. — P. 1027–1040.
178. Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2 / Y. Chen, C. J. Haines, I. Gutcher [et al.] // *Immunity.* — 2011. — №3. — P. 409–421.
179. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3 / A. Murthy, Y. Li, I. Peng [et al.] // *Nature.* — 2014. — №506. — P. 456–462.

180. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1 / J. Hampe, A. Franke, P. Rosenstiel [et al.] // *Nat. Genet.* — 2007. — №39. — P. 207–211.
181. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate / N. Mizushima., A. Kuma., Y. Kobayashi [et al.] // *J. Cell. Sci.* — 2003. — №116. — P. 1679–1688.
182. Non-redundant properties of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  during acute colon inflammation in mice / M. Bersudsky, L. Luski, D. Fishman [et al.] // *Gut.* — 2014. — Vol. 63, №4. — P. 598–609.
183. Influence of interleukin-10 on the interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1 beta ratio in the colonic mucosa of ulcerative colitis / K. Ishizuka, K. Sugimura, T. Homma [et al.] // *Digestion.* — 2001. — №63. — P. 22–27.
184. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells / K. Youngman, P. Simon, G. West [et al.] // *Gastroenterology.* — 1993. — №104. — P. 749–758.
185. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis / N. Tountas, V. Casini-Raggi, H. Yang [et al.] // *Gastroenterology.* — 1999. — №117. — P. 806–813.
186. Inflammasomes: far beyond inflammation / J. Henao-Mejia, E. Elinav, T. Strowig, R. A. Flavell // *Nat. Immunol.* — 2012. — Vol. 13, №4. — P. 321–324.
187. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis / S. A. Hirota, J. Ng, A. Lueng [et al.] // *Inflamm. Bowel Dis.* — 2011. — Vol. 17, №6. — P. 1359–1372.
188. Savinova O. V. The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes / O. V. Savinova, A. Hoffmann, G. Ghosh // *Mol. Cell.* — 2009. — №34. — P. 591–602.

189. Oh H. NF- $\kappa$ B: roles and regulation in different CD4<sup>+</sup> T-cell subsets / H. Oh, S. Ghosh // *Immunological Reviews*. — 2013. — №252. — P. 41–51.
190. Transcription factor c-Rel plays a crucial role in driving anti-CD40-mediated innate colitis / A. Visekruna, T. Linnerz, V. Martinic [et al.] // *Mucosal Immunol.* — 2015. — Vol.8, №2. — P. 307–315.
191. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice / M. F. Neurath, S. Pettersson, K. H. Meyer zum Buschenfelde, W. Strober // *Nat. Med.* — 1996. — №2. — P. 998–1004.
192. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa / G. Rogler, K. Brand, D. Vogl [et al.] // *Gastroenterology*. — 1998. — №115. — P. 357–369.
193. Inducible CD40 expression mediates NFkappaB activation and cytokine secretion in human colonic fibroblasts / C. M. Gelbmann, S. N. Leeb, D. Vogl [et al.] // *Gut*. — 2003. — №52. — P. 1448–1456.
194. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells / C. Becker, S. Wirtz, M. Blessing [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2003. — №112. — P. 693–706.
195. Intestinal expression of the anti-inflammatory interleukin-1 homologue IL-37 in pediatric inflammatory bowel disease / S. Weidlich, A. M. Bulau, T. Schwerd [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2014. — Vol. 59, №2. — P. 18–26.
196. The increased mucosal mRNA expressions of complement C3 and interleukin-17 in inflammatory bowel disease / T. Sugihara, A. Kobori, H. Imaeda [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* — 2010. — Vol. 160, №3. — P. 386–393.
197. Fecal HMGB1 is a novel marker of intestinal mucosal inflammation in pediatric inflammatory bowel disease / R. Vitali, L. Stronati, A. Negroni [et al.] // *Am. J. Gastroenterol.* — 2011. — Vol. 106, №11. — P. 2029–2040.



198. Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis / S. H. Davé, J. S. Tilstra, K. Matsuoka [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — Vol. 86, №3. — P. 633–643.
199. Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer / S. Maeda, Y. Hikiba, W. Shibata [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2007. — Vol. 360, №2. — P. 394–400.
200. HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice / P. L. Sappington, R. Yang, H. Yang [et al.] // *Gastroenterology.* — 2002. — Vol. 123, №3. — P. 790–802.
201. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis / K. Machiels, M. Joossens, J. Sabino [et al.] // *Gut.* — 2013. — №63. — P. 1275–1283.
202. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota / C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon [et al.] // *Nature.* — 2012. — №489. — P. 220–230.
203. Review article: the role of butyrate on colonic function / H. M. Hamer, D. Jonkers, K. Venema [et al.] // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 2008. — №27. — P. 104–119.
204. Cresci G. Lactobacillus GG and tributyrin supplementation reduce antibiotic-induced intestinal injury / G. Cresci, L. E. Nagy, V. Ganapathy // *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* — 2013. — №37. — P. 763–774.
205. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut / C. F. Ortega-Cava, S. Ishihara, M. A. Rumi [et al.] // *J. Immunol.* — 2003. — №170. — P. 3977–3985.
206. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease / J. C. Barrett, S. Hansoul, D. L. Nicolae [et al.] // *Nature Genet.* — 2008. — №40. — P. 955–962.

207. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4+ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease / M. Fukata, K. Breglio, A. Chen [et al.] // *J. Immunol.* — 2008. — Vol. 180, №3. — P. 1886–1894.
208. TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity? / S. Borrello, C. Nicolt, G. Delogu [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 24, №3. — P. 549–556.
209. Liu G. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells / G. Liu, Y. Zhao // *Immunology.* — 2007. — №122. — P. 149–156.
210. Toll-like receptor 2 signaling in CD4+ T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease / J. Reynolds, B. Pappu, J. Peng [et al.] // *Immunity.* — 2010. — №32. — P. 692–702.
211. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis / L. Frolova, P. Drastich, P. Rossmann [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* — 2008. — Vol. 56, №3. — P. 267–274.
212. Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease / A. M. Noronha, Y. Liang, J. T. Hetzel [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — Vol. 86, №4. — P. 1007–1016.
213. Mowat A. M. Does TLR2 regulate intestinal inflammation? / A. M. Mowat // *Eur. J. Immunol.* — 2010. — Vol. 40, №2. — P. 318–320.
214. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells / T. Hisamatsu, M. Suzuki, H. C. Reinecker [et al.] // *Gastroenterology.* — 2003. — №124. — P. 993–1000.
215. T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii* / M. H. Shaw, T. Reimer, C. Sánchez-Valdepeñas [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2009. — №10. — P. 1267–1274.

216. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract / K. S. Kobayashi, M. Chamaillard, Y. Ogura [et al.] // *Science*. — 2005. — №307. — P. 731–734.
217. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- $\kappa$ B activity and IL-1 $\beta$  processing / S. Maeda, L. C. Hsu, H. Liu [et al.] // *Science*. — 2005. — №307. — P. 734–738.
218. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease / N. Inohara, Y. Ogura, A. Fontalba [et al.] // *J. Biol. Chem.* — 2003. — №278. — P. 5509–5512.
219. Muramyl dipeptide and Toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease / D. A. Heel, S. Ghosh, M. Butler [et al.] // *Lancet*. — 2005. — №365. — P. 1794–1796.
220. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products / M. Hedl, J. Li, J. H. Cho, C. Abraham // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2007. — №104. — P. 19440–19445.
221. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses / T. Watanabe, A. Kitani, P. J. Murray, W. Strober // *Nat. Immunol.* — 2004. — №5. — P. 800–808.
222. Mucosal flora in inflammatory bowel disease / A. Swidsinski, A. Ladhoff, A. Pernthaler [et al.] // *Gastroenterology*. — 2002. — №122. — P. 44–54.
223. Statins alter neutrophil migration by modulating cellular Rho activity—a potential mechanism for statins-mediated pleotropic effects? / B. Maher, T. Dhonnchu, J. Burke [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* — 2009. — №85. — P. 186–193.
224. Effects of statins on experimental colitis in normocholesterolemic rats / N. Jahovic, N. Gedik, F. Ercan [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* — 2006. — №41. — P. 954–962.
225. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on

- the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization / T. L. Denning, B. A. Norris, O. Medina-Contreras [et al.] // *J. Immunol.* — 2011. — №187. — P. 733–747.
226. Veenbergen S. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL10 producing regulatory T cell subsets / S. Veenbergen, J. N. Samsom // *Curr. Opin. Immunol.* — 2012. — №24. — P. 269–276.
227. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets / T. Sathaliyawala, M. Kubota, N. Yudanin [et al.] // *Immunity.* — 2013. — №38. — P. 187–197.
228. TH17, TH22 and TReg cells are enriched in the healthy human cecum / M. J. Wolff, J. M. Leung, M. Davenport [et al.] // *PLoS.* — 2012. — Vol. 3, №7. — P. 187–197.
229. Nonclassical CD1d restricted NK T cells that produce IL 13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis / I. J. Fuss, F. Heller, M. Boirivant [et al.] // *J. Clin. Invest.* — 2004. — №113. — P. 1490–1497.
230. Spits H. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function / H. Spits, T. Cupedo // *Annu. Rev. Immunol.* — 2012. — №30. — P. 647–675.
231. Eberl G. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? / G. Eberl // *Nat. Rev. Immunol.* — 2005. — Vol. 5, №5. — P. 413–420.
232. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria / G. F. Sonnenberg, L. A. Monticelli, T. Alenghat [et al.] // *Science.* — 2012. — Vol. 336, №6086. — P. 1321–1325.
233. Interleukin-22 and interleukin-22-producing NKp44+ natural killer cells in subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis / F. Ciccia, A. Accardo-Palumbo, R. Alessandro [et al.] // *Arthritis Rheum.* — 2012. — Vol. 64, №6. — P. 1869–1878.

234. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease / A. Geremia, C. V. Arancibia-Cárcamo, M. P. Fleming [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2011. — Vol. 208, №6. — P. 1127–1133.
235. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis / K. Furumatsu, S. Nishiumi, Y. Kawano [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* — 2011. — №56. — P. 2532–2544.
236. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins / M. Veldhoen, K. Hirota, A. Westendorf [et al.] // *Nature.* — 2008. — №453. — P. 106–109.
237. Ho P. The aryl hydrocarbon receptor: a regulator of Th17 and Treg cell development in disease / P. Ho, L. Steinman // *Cell Res.* — 2008. — №18. — P. 605–608.
238. Stockinger B. Modulation of Th17 development and function by activation of the aryl hydrocarbon receptor—the role of endogenous ligands / B. Stockinger, M. Veldhoen, K. Hirota // *Eur. J. Immunol.* — 2009. — №39. — P. 652–654.
239. Initial and extended inflammatory messages of the nongenomic signaling pathway of the TCDD-activated Ah receptor in U937 macrophages / E. Sciallo, C. Vogel, W. Li, F. Matsumura // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2008. — №480. — P. 143–155.
240. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine / K. Cadwell, K. Patel, N. Maloney [et al.] // *Cell.* — 2010. — №141. — P. 1135–1145.
241. Maciver N. J. Metabolic regulation of T lymphocytes / N. J. Maciver, R. D. Michalek, J. C. Rathmell // *Annu Rev Immunol.* — 2013. — №31. — P. 259–283.
242. Liu G. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells / G. Liu, L. Zhang, Y. Zhao // *Clin. Exp. Immunol.* — 2010. — Vol. 160, №2. — P. 168–175.

243. RORgamma-expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F / M. Leppkes, C. Becker, I. Ivanov [et al.] // *Gastroenterology*. — 2009. — №136. — P. 257–267.
244. Walker L .S. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back / L. S. Walker // *Immunology*. — 2009. — Vol. 126, №4. — P. 466–474.
245. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis / P. M. Smith, M. R. Howitt, N. Panikov [et al.] // *Science*. — 2013. — Vol. 341, №6145. — P. 569–573.
246. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells / B. Platzer, S. Richter, D. Kneidinger [et al.] // *J. Immunol.* — 2009. — Vol. 183, №1. — P. 66–74.
247. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles / E. A. Kiss, C. Vonarbourg, S. Kopfmann [et al.] // *Science*. — 2011. — Vol. 334, №6062. — P. 1561–1565.