

УДК 616.344-002-036.1-085:615.27:576.33]-092.9



ЖЕРЕБЯТЬЄВ О.С., КАМИШНИЙ О.М.

Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології

ВПЛИВ СИМВАСТАТИНУ ТА АНТАГОНІСТА РЕЦЕПТОРІВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1 НА ЕКСПРЕСІЮ АРІЛ-ГІДРОКАРБОНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ (AHR) В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ІЛЕЇТУ

Резюме. Аріл-гідрокарбонівий рецептор (AhR) — фактор транскрипції, який активується великим числом факторів навколишнього середовища і може відігравати роль у патогенезі запальних захворювань кишечника у людини та в мишачих моделях. Ми вивчали можливість застосування симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 для фармакологічної корекції гострого ілеїту у щурів з акцентом на дослідженні інтенсивності експресії AhR лімфоцитами тонкої кишки. AhR-імунопозитивні лімфоцити визначали за допомогою методу непрямой імунофлуоресценції з використанням моноклональних антитіл щура. Ми встановили, що розвиток ілеїту супроводжувався зміною кількості AhR⁺-лімфоцитів і щільності їх на імунопозитивних клітинах. Застосування препаратів під час розвитку експериментальної патології супроводжувалося змінами експресії AhR та їх щільності на лімфоцитах.

Ключові слова: експериментальний ілеїт, запальні захворювання кишечника, Аріл-гідрокарбонівий рецептор.

Актуальність проблеми

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК) складаються з двох захворювань: виразкового коліту та хвороби Крона. Хвороба Крона є результатом поєднання генетичних та екологічних факторів, що викликають порушення імунної відповіді на коменсальну мікрофлору кишечника.

Арил-гідрокарбонівий рецептор (aryl hydrocarbon receptor — AhR) розпізнає численні ксенобіотики (діоксин і хімічні сполуки) та природні молекули (метаболіти кишкової мікрофлори — індол, триптофан і триптамін), а також бере участь у метаболізмі цих сполук. AhR також відіграє регулюючу роль при запальних реакціях [1]. Усе частіше згадують про те, що токсини навколишнього середовища модулюють імунну відповідь і можуть як послабити відповідь на інфекцію, так і виступити в ролі тригера автоімунних захворювань.

Нещодавні роботи показали участь Аріл-гідрокарбонівий рецептора в диференціюванні Т-клітин [2]. Наприклад, активація AhR посилює диференціювання Т-хелперів 17-го типу (Th17), тим самим посилюючи Th17 клітинно-опосередковані автоімунні реакції [3]. Також AhR експресуються в дендритних клітинах [4] і вроджених лімфоїдних клітинах (ILC), а також у різних субпопуляціях CD4⁺ Т-клітин адаптивного імунітету [5]. Хоча AhR відіграють важливу роль як кофактори в регуляції гомеостазу та запалення, про їх участь в розвитку ЗЗК майже нічого невідомо.

Нещодавно було відкрито, що статини на додаток до зниження рівня холестерину чинять різні плейо-

© Жеребят'єв О.С., Камішний О.М., 2015

© «Гастроентерологія», 2015

© Заславський О.Ю., 2015

тропні ефекти, у тому числі імуномодулюючі та протизапальні. Дослідження, проведені на тваринних моделях, свідчать, що статини інгібують як гостре, так і хронічне запалення холестериннезалежним способом. Існує також більше доказів того, що ці препарати мають потужні протизапальні ефекти, які сприяють їх позитивним ефектам у пацієнтів з атеросклерозом, ревматоїдним артритом та сепсисом [6, 7].

Мета дослідження — вивчити особливості експресії AhR клітинами кишково-асоційованої лімфоїдної тканини (КАЛТ) у шурів в умовах розвитку експериментального гострого ілеїту та при корекції його симвастином та рекомбінантним антагоністом рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1).

Матеріали та методи

Дослідження проведені на 40 шурах-самцях лінії Вістар вагою 110–160 г. Експериментальну частину роботи виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів досліджень на тваринах» (Україна, 2001) і положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Тварини були розподілені на чотири групи по 10 шурів: група 1 — контрольні тварини; група 2 — тварини з експериментальною патологією — гострим індометациніндукованим ілеїтом (ГІ); група 3 — тварини з ГІ, яким вводили симвастатин; група 4 — тварини з ГІ, яким вводили АРІЛ-1 (виробництво ВАГ «РЭСБИО», м. Санкт-Петербург, Росія). ГІ індукували одноразовим підшкірним введенням 0,15% розчину індометацину (Sigma, США) в дозі 15 мг/кг [8]. Симвастатин вводили внутрішньоочеревинно в дозі 20 мг/кг через 24 години після останньої ін'єкції індометацину протягом 3 днів. АРІЛ-1 вводили підшкірно в дозі 3 мг/кг через 24 години після останньої ін'єкції індометацину протягом 3 днів. Тварин виводили з експерименту декапітуванням під наркозом на 4-ту добу. Вилучали ділянки клубової кишки і на 20 годин занурювали в фіксатор Буена. Макроскопічні прояви запалення оцінювали, як описано для індометациніндукованого ілеїту [9].

Структуру популяції AhR⁺-клітин вивчали на підставі аналізу серійних гістологічних зрізів і даних їх морфометричних та денситометричних характеристик. Для проведення даного дослідження на ротатійному мікроскопі MICROM HR-360 (Microm, Німеччина) робили 5-мікронні серійні зрізи клубової кишки, які потім депарафінували в ксилолі, проводили дегідратацію в низхідних концентраціях етанолу (100%, 96%, 70%), відмивали у 0,1 М фосфатному буфері (рН = 7,4) і фарбували гематоксиліном-еозином. Для дослідження структури популяції імунопозитивних лімфоцитів зрізи інкубували з первинними кролячими моноклональними антитілами (МКАТ) до AhR шура (Santa Cruz Biotechnology, США) протягом 18 годин у вологій камері при 4 °С. Після відмивання надлишку первинних антитіл у 0,1 М фосфатному буфері зрізи інкубували 60 хвилин (37 °С) з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика або миші, кон'югованими

з FITC. Після інкубації всі зрізи промивали 0,1 М фосфатним буфером і розмішували в суміші гліцерину і фосфатного буфера (1 : 9) для подальшої люмінесцентної мікроскопії. Оброблені гістологічні зрізи вивчали за допомогою комп'ютерної програми Image J (NIH, США). Зображення, що отримується на мікроскопі Primo Star (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) за допомогою високочутливої камери Axio Cam 5c (ZEISS, Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина), негайно вводили в комп'ютер. При цьому в автоматичному режимі визначалися ділянки зі статистично значущою флюоресценцією. Обчислювалися морфометричні і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин.

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, УОІФ): Integrated Density (інтегрована щільність) — (площа виділених клітин × середню флюоресценцію фону). При фарбуванні МКАТ досліджували AhR⁺-лімфоцити, розташовані у власній пластинці слизової оболонки ворсинок (ВПСОВ) і в ізольованих лімфоїдних вузликах (ЛІВ) клубової кишки, які є відповідно ефекторними та індуктивними зонами імунної відповіді в КАЛТ.

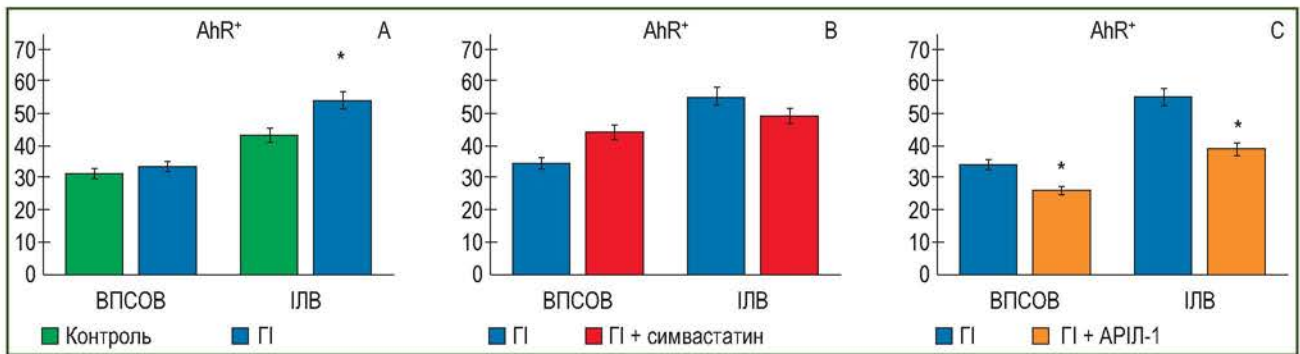
Результати та їх обговорення

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

Аналіз серійних зрізів клубової кишки шурів лінії Wistar показав, що розвиток ГІ супроводжується збільшенням сумарної щільності популяції AhR⁺-лімфоцитів в ЛІВ клубової кишки на 25 % (p < 0,05) порівняно з контролем (рис. 1А). При введенні симвастатину тваринам з ГІ ми не спостерігали вірогідної зміни показників, що вивчаються (рис. 1В). Введення АРІЛ-1 при ГІ призвело до зменшення популяції AhR⁺-лімфоцитів (у ВПСОВ — на 24 %; в ЛІВ — на 29 %, p < 0,05) порівняно з гострим ілеїтом (рис. 1С).

Вивчення інтенсивності флюоресценції імунопозитивних клітин у ЛІВ, яке відображає щільність рецепторів AhR в лімфоцитах, показало, що лише на фоні введення симвастатину тваринам з ГІ цей показник збільшився в лімфобластах на 11 % (p < 0,05) порівняно з гострим ілеїтом.

Активация AhR різними лігандами, такими як продукти харчування, є необхідною для підтримки або збільшення кількості вроджених імунних клітин у



Примітка. * – $P < 0,05$.

Рисунок 1 — Сумарна щільність (на 1 мм²) AhR⁺-клітин у власній пластинці слизової оболонки ворсинок і в ізольованих лімфоїдних фолікулах клубової кишки. Розвиток гострого ілеїту в експериментальних тварин (А); на фоні введення симвастатину (В) або АРІЛ-1 (С) експериментальним тваринам у ході розвитку гострого ілеїту

кишечнику, таких як інтраепітеліальні лімфоцити (IELS) і лімфоїдні клітини, що продукують ІЛ-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 Аріл-гідрокарбонowego рецептора в кишечнику людини показує, що Т-лімфоцити та натуральні клітини-кілери, виділені від пацієнтів із хворобою Крона, експресують низькі рівні AhR і відповідають на ліганди AhR шляхом зниження синтезу запальних цитокінів [10].

Отримані нами дані дещо збігаються з результатами інших дослідників. Зокрема К. 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 Аріл-гідрокарбонowego рецептора в епітелії товстої кишки. Крім того, пероральне введення нетоксичного агоніста AhR — β-нафтофлавона пригнічує розвиток експериментальної патології [11].

Інша група дослідників на чолі з Т. Takamura в своїх роботах щодо вивчення впливу потужного активатора AhR-рецепторів — 2,3,7,8-тетрахлордибензо-п-діоксину (ТХДД) на перебіг коліту у мишей, попередньо оброблених ТХДД, показала підвищене вироблення простагландину E2 (PGE2) у товстій кишці, при цьому введення індометацину знижувало рівень PGE2 та скасовувало інгібуючий вплив ТХДД. У сукупності активація шляху AhR ТХДД може поліпшити перебіг коліту, принаймні частково, за рахунок вироблення PGE2 [12]. Узагальнюючи результати вчених, можна прийти до висновку, що активація шляху AhR може покращити перебіг експериментальних ВЗК.

Проте абсолютно протилежні результати були отримані Veldhoen et al. Вони показали, що активація AhR за допомогою FICZ (метаболіт триптофану) посилює запальну реакцію, сприяючи диференціюванню Th17 в деяких мишачих моделях захворювань, таких як експериментальний аутоімунний енцефаліт [13].

Наявні терапевтичні стратегії для ЗЗК включають поєднання кортикостероїдів та імуномодулюючих пре-

паратів і швидко зменшують запалення та викликають ремісію. Проте ці терапевтичні засоби часто мають серйозні побічні ефекти. Хоча ТХДД пригнічує запалення в кишечнику, слід визнати, що він не буде корисним терапевтичним засобом для пацієнтів через його потенційні токсичні побічні ефекти. Хоча лігандоспецифічні ефекти можуть бути різними залежно від тривалості активації AhR, необхідно підкреслити, що на сьогодні не дуже зрозуміло, чому деякі ліганди, такі як FICZ, потенційно сприяють розвитку Th17-опосередкованих запальних реакцій, у той час як інші, такі як ТХДД, сприяють розвитку Treg-опосередкованих супресивних імунних відповідей. Тому важливо продовжувати оцінювати вплив на активацію AhR інших лігандів у контексті запалення кишечника.

Висновки

1. Аріл-гідрокарбоніві рецептори експресуються на різних клітинах імунної системи: Th17-клітини, вроджені лімфоїдні клітини та дендритні клітини. Відповіді від них важливі для контролю просвітних патогенів. При розвитку гострого ілеїту збільшується кількість AhR⁺-лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині клубової кишки шурів.

2. Введення симвастатину тваринам із гострим ілеїтом призвело до збільшення щільності AhR лише в лімфобластах, а введення АРІЛ-1 тваринам призвело до зменшення популяції AhR⁺-лімфоцитів у кишково-асоційованій лімфоїдній тканині клубової кишки шурів.

Список літератури

- Zelante T. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22 / T. Zelante, R.G. Iannitti, C. Cunha [et al.] // *Immunity*. — 2013. — Vol. 39. — P. 372-385.
- Apetoh L. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27 / L. Apetoh, F.J. Quintana, C. Pot [et al.] // *Nat. Immunol.* — 2010. — Vol. 11(9). — P. 854-861.
- Veldhoen M. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins / M. Veld-

hoen, K. Hirota, A.M. Westendorf [et al.] // *Nature*. — 2008. — Vol. 453(7191). — P. 106-109.

4. Platzer B. 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.

5. Kiss E.A. 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.

6. 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.

7. Hackam D.G. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis / D.G. Hackam, M. Mamdani, P. Li [et al.] // *Lancet*. — 2006. — Vol. 367(9508). — P. 413-418.

8. Nandi J. TNF- α modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis / J. Nandi, B. Saud, J. Zinkievich [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* — 2010. — Vol. 336(1-2). — P. 17-24.

9. Yamada T. 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.

10. Monteleone I. The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis / I. Monteleone, T.T. MacDonald, F. Pallone [et al.] // *Curr. Opin. Gastroenterol.* — 2012. — Vol. 28(4). — P. 310-313.

11. Furumatsu K. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis / K. Furumatsu, S. Nishiumi, Y. Kawano [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* — 2011. — Vol. 56(9). — P. 2532-2544.

12. Takamura T. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice / T. Takamura, D. Harama, S. Matsuoka [et al.] // *Immunol. Cell. Biol.* — 2010. — Vol. 88(6). — P. 685-689.

13. Veldhoen M. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins / M. Veldhoen, K. Hirota, A.M. Westendorf [et al.] // *Nature*. — 2008. — Vol. 453(7191). — P. 106-109.

Отримано 02.02.15 ■

Жеребят'єв А.С., Камышний А.М.

Запорізький державний медичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології

ВЛИЯНИЕ СИМВАСТАТИНА И АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 НА ЭКСПРЕССИЮ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ (АHR) В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ИЛЕИТА

Резюме. Арил-гидрокарбонный рецептор (AhR) — фактор транскрипции, который активируется большим числом факторов окружающей среды и может играть роль в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника у человека и в мышинных моделях. Мы изучали возможность применения симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 для фармакологической коррекции острого илеита у крыс с акцентом на исследовании интенсивности экспрессии AhR лимфоцитами тонкой кишки. AhR-иммунопозитивные лимфоциты

определяли с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител крысы. Мы установили, что развитие илеита сопровождалось изменением количества AhR⁺-лимфоцитов и плотности их на иммунопозитивных клетках. Применение препаратов во время развития экспериментальной патологии сопровождалось изменениями экспрессии AhR и их плотности на лимфоцитах.

Ключевые слова: экспериментальный илеит, воспалительные заболевания кишечника, Арил-гидрокарбонный рецептор.

Zherebiat'iev O.S., Kamyshnyi O.M.

Zaporizhzhia State Medical University, Department of Microbiology, Virusology and Immunology, Zaporizhzhia, Ukraine

INFLUENCE OF SIMVASTATIN AND INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST ON EXPRESSION OF ARYL HYDROCARBON RECEPTORS UNDER EXPERIMENTAL ACUTE ILEITIS

Summary. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) — transcription factor activated by a large number of environmental agents, and may play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases in humans and mouse models. We have investigated the possibility of using simvastatin and interleukin 1 receptor antagonist for pharmacological correction of acute ileitis in rats, with a focus on the studying intensity of AhR expression by lymphocytes of the small intestine. The AhR-immunopositive lymphocytes were determined by means of indirect immunofluorescence technique using monoclonal rat anti-

bodies. We have established that development of ileitis was associated with changes in the amount of AhR⁺ lymphocytes and their density on immunopositive cells. Drug administration during the development of experimental pathology was accompanied by changes in the expression of AhR and their density on lymphocytes.

Key words: experimental ileitis, inflammatory bowel diseases, aryl hydrocarbon receptor.