

# **ЭКСПРЕССИЯ ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ Т-ХЕЛПЕРОВ ЛИМФОЦИТАМИ КИШЕЧНИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИЛЕИТЕ И ПРИ ВВЕДЕНИИ СИМВАСТАТИНА И АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРОВ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1**

**Жеребятъев А.С., Камышный А.М., Камышная В.А.**

*Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина*

**Резюме.** Патогенез воспалительных заболеваний кишечника является сложным и мультифакторным. Т-хелперы являются компонентами адаптивного иммунного ответа, тогда как Toll-подобные рецепторы, NOD-подобные рецепторы, RIG-I-подобные рецепторы участвуют в сохранении гомеостаза между слизистой оболочкой и синантропными микроорганизмами.

Мы изучили возможность применения симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 для коррекции экспериментального илеита у крыс с акцентом на исследование экспрессии TLR2, TLR4, NOD2, RIG-I и транскрипционных факторов T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t и FoxP3 лимфоцитами тонкой кишки.

Эксперимент проводили на самцах крыс линии Вистар в возрасте 5-7 месяцев. Иммунопозитивные лимфоциты были идентифицированы с помощью метода прямой и непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител крысы.

Развитие острого и хронического илеита сопровождалось однонаправленным увеличением количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов и снижением общего количества TLR4<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки. Введение симвастатина и АРИЛ-1 экспериментальным животным при развитии экспериментальной патологии сопровождалось снижением количества ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> и T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов и увеличением общего числа FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов.

Симвастатин и антагонист рецепторов интерлейкина-1, кажется, благоприятно влияет на исход и течение индометацин-индуцированного илеита через модулирование экспрессии образ-распознающих рецепторов на лимфоцитах и баланса между различными субпопуляциями Т-хелперов тонкой кишки.

*Ключевые слова:* илеит, образ-распознающие рецепторы, антагонист рецепторов интерлейкина-1, симвастатин

## **Адрес для переписки:**

*Жеребятъев Александр Сергеевич  
Запорожский государственный медицинский университет  
69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26.  
Тел.: +38 (061) 234-26-31.  
E-mail: Gerya2009@yandex.ru*

## **Address for correspondence:**

*Zherebiatiev Aleksandr S.  
Zaporozhye State Medical University  
69035, Ukraine, Zaporozhye, Mayakovsky pr., 26.  
Phone: +38 (061) 234-26-31.  
E-mail: Gerya2009@yandex.ru*

## **Образец цитирования:**

*А.С. Жеребятъев, А.М. Камышный, В.А. Камышная,  
«Экспрессия паттерн-распознающих рецепторов  
и транскрипционных регуляторов дифференцировки  
Т-хелперов лимфоцитами кишечника при экспериментальном  
илеите и при введении симвастатина и антагониста  
рецепторов интерлейкина-1» // Медицинская иммунология,  
2015. Т. 17, № 2. С. 119-126.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-119-126*

## **For citation:**

*A.S. Zherebiatiev, A.M. Kamyshnyi, V.A. Kamyshnaya,  
“Expression of pattern-recognizing receptors and transcriptional  
regulators of T helper cell differentiation by intestinal lymphocytes  
in experimental ileitis and upon administration of Simvastatin and  
interleukin-1 receptor antagonist”, Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 119-126.  
doi: 10.15789/1563-0625-2015-2-119-126*

© Жеребятъев А.С. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-119-126>

# EXPRESSION OF PATTERN-RECOGNIZING RECEPTORS AND TRANSCRIPTIONAL REGULATORS OF T HELPER CELL DIFFERENTIATION BY INTESTINAL LYMPHOCYTES IN EXPERIMENTAL ILEITIS AND UPON ADMINISTRATION OF SIMVASTATIN AND INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST

Zherebiatiev A.S., Kamyshnyi A.M., Kamyshnaya V.A.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

**Abstract.** Pathogenesis of inflammatory bowel disease is complicated and multifactorial. T helper cells represent components of adaptive immune response, whereas Toll-like receptors, NOD-like receptors, RIG-I-like receptors are involved in maintenance of mucosal, as well as commensal homeostasis. Aim of study was to evaluate the ability of Simvastatin and IL-1 receptor antagonist to modify the course of experimental ileitis in rats, with a focus on expression of TLR2, TLR4, NOD2, RIG-I, like as T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t, and FoxP3 transcription factors by resident lymphocytes in the small intestine.

Experiments were carried out with male Wistar rats (5 to 7 months old). The immunopositive lymphocytes were determined by means of direct and indirect immunofluorescence technique, using monoclonal rat antibodies.

Development of acute and chronic ileitis was associated with unidirectional tendency for increase of TLR2<sup>+</sup> lymphocyte numbers, and decrease in total TLR4<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> lymphocyte counts in lymphoid structures of ileum. Treatment of experimental animals with Simvastatin and ARIL-1 during the development of experimental pathology was accompanied by decrease of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> and T-bet<sup>+</sup> lymphocytes, along with increasing total numbers of FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes.

Simvastatin and antagonist of IL-1 receptors seem to exert a beneficial effect upon the course and outcomes in the indomethacin-induced rat ileitis model, via changing expression of pattern-recognizing receptors on lymphocytes and modulation of balance between different T helper cell subsets of intestinal tissues.

*Keywords: experimental ileitis, pattern recognition receptors, IL-1 receptor antagonist, Simvastatin*

## Введение

Эпидемиологические исследования различных стран мира свидетельствуют о росте заболеваемости воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), точная причина которых остается неизвестной [16]. Кишечный барьер состоит из бактериальной биопленки, слизи, клеток эпителия и кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани (КАЛТ). Дисфункция этого комплекса создает предпосылки развития воспалительного процесса в кишечнике. В этом ведущую роль играют паттерн-распознающие рецепторы (PRR), которые распознают патоген-ассоциированные молекулярные образы микроорганизмов (PAMP). К ним относятся мембранные и эндосомальные Toll-like рецепторы, цитоплазматические NOD-like рецепторы и сенсоры вирусных РНК – RIG-like рецепторы, сигнализация через которые закономерно приводит к активации адаптивной иммунной системы. Многочисленные работы показывают, что в большинстве случаев воспаление слизистой оболочки кишечника связано с дисбалансом различных субпопуляций

T-хелперов [3], из которых определенную роль в патофизиологии воспаления кишечника играют T-хелперы 1 (Th1), 2 (Th2) и 17 (Th17) типов, а также T-регуляторные лимфоциты (Treg), основными регуляторами дифференцировки которых являются, соответственно, транскрипционные факторы T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t и FoxP3 [9].

Важной задачей является поиск методов патогенетически-обоснованной терапии ВЗК, и в этом аспекте вызывает особый интерес использование таких препаратов, как статины, иммуномодулирующие холестерин-независимые эффекты которых открыты совсем недавно. К ним относятся: подавление экспрессии МНС II макрофагами, повышение активности Th2-лимфоцитов, уменьшение синтеза цитокинов Th1-лимфоцитами, сдвигая Th1-/Th2-баланс в сторону последних. Lee et al. продемонстрировали, что симвастатин подавляет экспрессию провоспалительных генов, блокируя передачу сигналов через NF- $\kappa$ B и ослабляет DSS-индуцированный острый колит у мышей. Некоторые авторы показали, что статины способствуют уменьшению воспаления при экспе-

риментальной патологии как у животных [10], так и у пациентов с ХК [8]. В свою очередь, применение антагонистов основных системных провоспалительных цитокинов IL-1 $\alpha$  та IL-1 $\beta$  показало свою эффективность при некоторых хронических воспалительных заболеваниях, а человеческий рекомбинантный IL-1ra (Anakinra) был одобрен в США для лечения ревматоидного артрита [20], однако высокая цена ограничивает его широкое применение в Украине и побуждает к поиску и изучению более дешевых аналогов. Поэтому мы обратили внимание на возможность применения антагониста рецепторов интерлейкина-1 (АРИЛ-1).

**Цель исследования** – изучение динамики распределения T-bet<sup>+</sup>, GATA-3<sup>+</sup>, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> и FoxP3<sup>+</sup>-клеток (Treg) а также особенностей экспрессии PRR – TLR2, TLR4, NOD2 и RIG-I лимфоцитами кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани кишечника как ключевых параметров иммунной системы, определяющих направление развития иммуннопатофизиологического процесса при экспериментальном остром и хроническом илеите у крыс, а также на фоне введения симвастина и АРИЛ-1.

## Материалы и методы

Исследования проведены на 70 самцах-крысах линии Вистар весом 110-160 грамм. Экспериментальную часть работы выполняли в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985). Животные были разделены на десять групп по 10 крыс: группа 1 – контрольные животные; группа 2 – животные с экспериментальной патологией – острым индометацин-индуцированным илеитом (ОИ); группа 3 – животные с экспериментальной патологией – хроническим индометацин-индуцированным илеитом (ХИ); группа 4 – животные с ОИ, которым вводили симвастин; группа 5 – животные с ХИ, которым вводили симвастин; группа 6 – животные с ОИ, которым вводили АРИЛ-1 (производство ОАО «РЭСБИО», Санкт-Петербург, Россия); группа 7 – животные с ХИ, которым вводили АРИЛ-1. ОИ индуцировали однократным подкожным введением 0,15% раствора индометацина (Sigma, США) в дозе 15 мг/кг, ХИ индуцировали двукратным подкожным введением 0,15% раствора индометацина в дозе 10 мг/кг с интервалом между инъекциями 24 часа [11]. Симвастин вводили внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг через 24 часа после последней инъекции индометацина (при ОИ в течение 3 дней, при ХИ в течение 12 дней). АРИЛ-1 вводили подкожно в дозе 3 мг/кг через 24 часа после послед-

ней инъекции индометацина (при ОИ в течение 3 дней, при ХИ в течение 5 дней). Животных выводили из эксперимента декапитированием под наркозом (этаминал натрия 40 мг/кг внутрибрюшинно), извлекали участки подвздошной кишки и на 20 часов погружали в фиксатор Буэна.

Структуру популяции T-bet<sup>+</sup>, -GATA-3<sup>+</sup>, -FoxP3<sup>+</sup>, -ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, -TLR2<sup>+</sup>, -TLR4<sup>+</sup>, -NOD2<sup>+</sup> и RIGI<sup>+</sup> иммуннопозитивных лимфоцитов (T-bet<sup>+</sup>, GATA-3<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>, ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup>, NOD2<sup>+</sup>, RIGI<sup>+</sup>) изучали на основании анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы кишечника, которые затем депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) и окрашивали гематоксилином-эозином или инкубировали с первичными моноклональными антителами к T-bet, GATA-3, FoxP3, ROR, NOD2 или RIGI (Santa Crus Biotechnology, США). После этого срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным изотиоцианатом (FITC) в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °C. Либо инкубировали срезы с антителами к TLR-2 и TLR-4 (NucultBiotech, Нидерланды), уже конъюгированными с FITC в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °C. После инкубации все срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и помещали в смеси глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (NIH, США). Изображение, получаемое на микроскопе Primo Star (ZEISS, Германия), в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры Axio Cam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводили в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для лимфоидных клеток, экспрессирующих рецепторы. Вычислялись морфометрические и денситометрические характеристики иммуннопозитивных клеток. При окраске антителами исследовали иммуннопозитивные лимфоциты, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок (VILLUS) и в изолированных лимфоидных узелках (ILF) подвздошной кишки крыс. Визуально макроскопические изменения

при воспалении оценивали как специально описанные для индометацин-индуцированного илеита [22].

Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ EXCEL из пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001). Для всех показателей рассчитывали значение средней арифметической выборки ( $M$ ), ее дисперсии и ошибки средней ( $m$ ). Для выявления достоверности различий результатов исследований в опытных и контрольных группах животных определяли коэффициент Стьюдента ( $t$ ), после чего определяли возможность разницы выборок ( $p$ ) и доверительный интервал средней. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Развитие илеита сопровождается макроскопическими изменениями в тонком кишечнике: отек, гиперемия, множественные эрозии и язвы. При гистологическом исследовании тканей окрашенных гематоксилином-эозином мы наблюдали признаки воспаления, укорочение и исчезновение кишечных крипт, воспалительную инфильтрацию лимфоцитами и плазматическими клетками, нейтрофилами с примесью эозинофилов и утолщением стенки кишечника.

Анализ распределения TLR2<sup>+</sup> и TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов показал, что развитие как острого, так и хронического илеита влияло на суммарное количество этих клеток в обеих изученных морфофункциональных зонах подвздошной кишки крыс. Так, мы наблюдали одностороннее повышение количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов при развитии острого (в VILLUS на 19%, в ILF на 90% [ $p < 0,05$ ]) и хронического илеита (в VILLUS на 45%, в ILF в 2 раза [ $p < 0,05$ ]), а также снижение TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов при развитии острого (в VILLUS в 2,1 раз, в ILF на 45% [ $p < 0,05$ ]) и хронического илеита (в VILLUS в 2,1 раз, в ILF в 2 раза [ $p < 0,05$ ]), по сравнению с контрольной группой животных (рис. 1А, Б). Введение симвастатина животным с острым илеитом привело к снижению количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 11%, в ILF на 26% [ $p < 0,05$ ]) (рис. 1В, Д), но при введении препарата животным с хроническим илеитом это, наоборот, привело к повышению количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 25%, в ILF на 69% [ $p < 0,05$ ]) (рис. 1Г, Е). Введение симвастатина животным, как с острым, так и с хроническим илеитом, привело к повышению количества TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов только в ILF (на 20% и 31% соответственно [ $p < 0,05$ ]) (рис. 1В, Г, Д, Е). Введение АРИЛ-1 жи-

вотным с острым илеитом привело к снижению количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов в VILLUS на 24% ( $p < 0,05$ ) и повышению в ILF на 35% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1В, Д). Введение АРИЛ-1 животным с хроническим илеитом привело к снижению количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов только в ILF на 22% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1Е). Введение АРИЛ-1 животным как с острым, так и с хроническим илеитом привело к повышению количества TLR4<sup>+</sup> лимфоцитов в обеих зонах подвздошной кишки (в VILLUS на 21% и 24%, в ILF на 25% и в 2 раза [ $p < 0,05$ ]) (рис. 1В, Г, Д, Е).

Значение изменений уровня экспрессии TLR в развитии ВЗК показано в целом ряде исследований. В частности, Tanaka K. et al. при изучении экспрессии Toll-подобных рецепторов в слизистой оболочке кишечника пациентов с ВЗК обнаружили увеличение уровня TLR-2 и TLR-4 в подвздошной кишке по сравнению со здоровыми волонтерами [19]. Cario E. установила, что TLR-2 играет ключевую роль в поддержании целостности слизистой оболочки в модели повреждения эпителиального барьера кишечника у мышей [2]. Между тем большинство работ, касающихся изменения экспрессии PRR в условиях ВЗК, касаются в основном эпителиального компартмента, а не лимфоидных клеток. В то же время прямая экспрессия PRR лимфоцитами влияет на их активацию, пролиферацию, выживание и продукцию цитокинов. Экспрессия практически всех известных Toll-подобных рецепторов на CD4<sup>+</sup> Т-клетках была идентифицирована на уровне мРНК, а Myd88<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>Т-клетки показали пониженную пролиферацию в ответ на активацию TLR, не смогли продуцировать провоспалительные цитокины (IL-6, IL-17) и были не способны индуцировать колит. Стимуляция агонистами TLR2 способствует дифференцировке Th17 *in vitro* и приводит к пролиферации и продукции Th17-зависимых цитокинов, а сигнализация через TLR-4 влияет на функциональную активность Treg – введение LPS приводит к усилению их пролиферации и выживания *in vitro* и *in vivo*, а супрессивная активность Treg увеличивается в 10 раз [15]. Поэтому обнаруженные нами изменения уровня экспрессии TLR-2 и TLR-4 лимфоцитами при илеите могут напрямую влиять на их функциональную активность.

Анализ распределения RIG1<sup>+</sup> и NOD2<sup>+</sup> лимфоцитов показал, что развитие только хронического илеита и только в одной морфофункциональной зоне подвздошной кишки крыс влияло на суммарное количество этих клеток. В частности, наблюдалось снижение количества RIG1<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 18% [ $p < 0,05$ ]) и повышение NOD2<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 20% [ $p < 0,05$ ]) по сравнению с контрольной группой

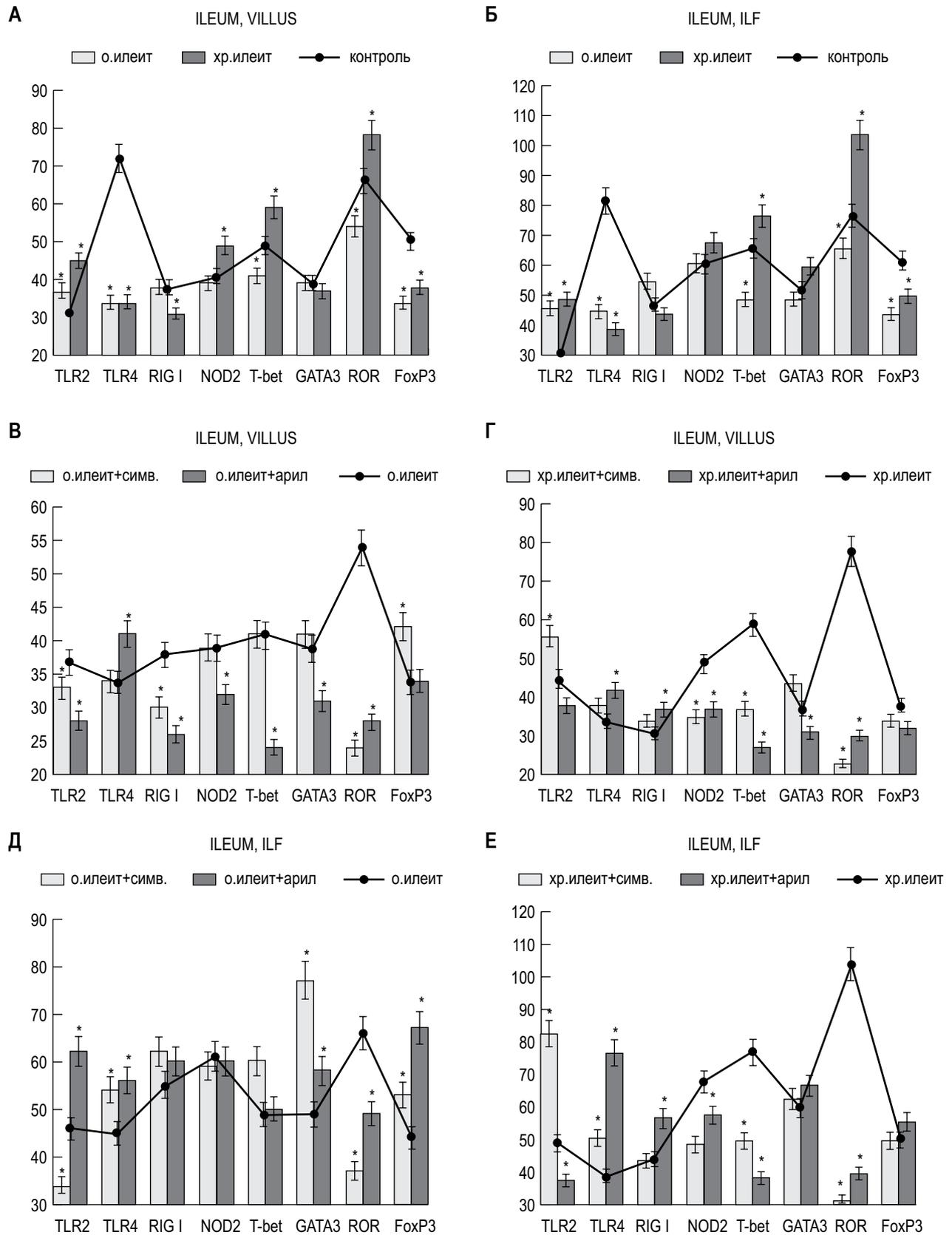


Рисунок 1. Суммарная плотность (количество на 1 мм<sup>2</sup>) TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup>, RIG1<sup>+</sup>, NOD2<sup>+</sup>, T-bet<sup>+</sup>, GATA-3<sup>+</sup>, RORγt<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> – клеток в собственной пластинке слизистой оболочки ворсинок подвздошной кишки (ILEUM, VILLUS) и в изолированных лимфоидных узелках подвздошной кишки (ILEUM, ILF) при развитии острого и хронического илеита (А, Б) и после введения симвастатина и АРИЛ-1 (В, Г, Д, Е) экспериментальным животным, \* – p < 0,05

животных (рис. 1А). Введение симвастатина животным с острым илеитом привело к снижению количества RIGI<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 21% [p < 0,05]) (рис. 1В), а при введении препарата животным с хроническим илеитом это привело к снижению количества NOD2<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 29% [p < 0,05]) (рис. 1Г). Введение АРИЛ-1 животным с острым илеитом привело к снижению количества как RIGI<sup>+</sup> так и NOD2<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 32% и 18% [p < 0,05]) (рис. 1В). Введение АРИЛ-1 животным с хроническим илеитом привело к повышению количества RIGI<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 19%, в ILF на 30% [p < 0,05]) и снижению количества NOD2<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 24%, в ILF на 15% [p < 0,05]) (рис. 1Г, Е).

Известно, что нарушение экспрессии RIG-I у мышей приводит к серьезным повреждениям и воспалительной инфильтрации в слизистой оболочке кишки [21]. Увеличение экспрессии RLR в структурах КАЛТ может приводить к избыточной продукции IFN, что в свою очередь является одним из факторов риска развития ВЗК. Кроме того, изменение уровня экспрессии RLR может влиять на баланс субпопуляций Т-хелперов, влияя на уровень образования провоспалительных Th17- и Th1-клеток [12].

Изучение распределения лимфоцитов, экспрессирующих транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-хелперов, показало, что развитие острого илеита сопровождалось снижением количества T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 16%, в ILF на 26% [p < 0,05]), RORγt<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 18%, в ILF на 14% [p < 0,05]) и FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 32%, в ILF на 29% [p < 0,05]) (рис. 1А, Б). Развитие хронического илеита сопровождалось снижением количества FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 24%, в ILF на 19% [p < 0,05]), но повышалось количество T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 20%, в ILF на 17% [p < 0,05]) и RORγt<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 18%, в ILF на 35% [p < 0,05]) (рис. 1А, В). Введение симвастатина животным с острым илеитом привело к снижению количества RORγt<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS в 2,3 раза, в ILF на 44% [p < 0,05]) и повышению количества GATA-3<sup>+</sup> лимфоцитов (в ILF на 57% [p < 0,05]), FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 24%, в ILF на 20% [p < 0,05]) (рис. 1В, Д). Введение симвастатина животным с хроническим илеитом привело к снижению количества RORγt<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS в 3,4 раза, в ILF в 3,2 раза [p < 0,05]) и T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 37%, в ILF на 35% [p < 0,05]) (рис. 1Г, Е). Введение АРИЛ-1 животным с острым илеитом привело к снижению количества T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 41% [p < 0,05]), GATA-3<sup>+</sup> лимфоци-

тов (в VILLUS на 21% [p < 0,05]), RORγt<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS в 2 раза, в ILF на 26% [p < 0,05]) и повышению количества GATA-3<sup>+</sup> лимфоцитов (в ILF на 18% [p < 0,05]) и FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов (в ILF на 52% [p < 0,05]) (рис. 1В, Д). Введение АРИЛ-1 животным с хроническим илеитом привело к снижению количества T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS в 2,2 раза, в ILF в 2 раза [p < 0,05]), GATA-3<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS на 16% [p < 0,05]) и RORγt<sup>+</sup> лимфоцитов (в VILLUS в 2,6 раз, в ILF в 2,6 раз [p < 0,05]) (рис. 1Г, Е).

Участие различных субпопуляций Т-хелперов в иммунопатогенезе ВЗК показано и в других многочисленных исследованиях. Так, Neurath et al. показали аккумуляцию Т-клеток, экспрессирующих T-bet в собственной пластинке кишечника у пациентов с болезнью Крона, а также более высокую экспрессию T-bet в этих клетках [13]. Перемещение дифференцированных Th17 в организм мышей с лимфопенией приводит к развитию колита. Эти данные доказывают, что Th17-клетки играют центральную роль в патогенезе ВЗК. Dambacher et al. показали, что пациенты с болезнью Крона имеют повышенный уровень IL-17A в слизистой оболочке кишечника, собственная пластинка содержит повышенное количество Th17, а фактор транскрипции RORγt экспрессирован на более высоких уровнях [5]. Ohtani et al. обнаружили значительное усиление экспрессии GATA-3 в слизистой оболочке кишечника у детей с этими заболеваниями [14], а Vamias G. et al. показали, что развитие хронического илеита ассоциировано со значительным увеличением экспрессии мРНК IL-5 и IL-13 — цитокинов Th2-типа в лимфоцитах кишечника [1].

Также следует отметить, что изучаемые нами транскрипционные факторы могут экспрессироваться, помимо классических Т-хелперов, и так называемыми врожденными лимфоидными клетками (innate lymphoid cells; ILCs), играющими важную роль в регулировании и поддержании кишечного гомеостаза [18]. ILC могут быть сгруппированы исходя из их селективной зависимости от специфических факторов транскрипции, необходимых для их развития и функционирования, и в настоящее время выделяют три основные группы: T-bet<sup>+</sup> ILCs (группа 1), GATA3<sup>+</sup> ILCs (группа 2) и RORγt<sup>+</sup> ILCs (группа 3). ILC играют важную роль в развитии и созревании КАЛТ, формировании изолированных лимфоидных фолликулов (ILF) [6]. Интересно, что этот процесс зависит от наличия синантропных бактерий в кишечнике, предполагая, что полученные от бактерий сигналы способствуют ILC-опосредованному образованию и созреванию вторичных лимфоидных структур

в кишечнике. Кроме того, группа 3 ILC также способствует восстановлению архитектоники вторичных лимфоидных органов вследствие нарушения гомеостаза иммунных клеток вирусными или патогенными бактериальными инфекциями. Секреция ILC3 клетками IL-22 способствует снижению проницаемости кишечного эпителия и анатомическому сдерживанию конкретных видов синантропных бактерий, а срыв этого пути приводит к транслокации и распространению бактерий в периферических тканях и началу провоспалительного ответа с участием клеток адаптивной иммунной системы [17]. Было показано снижение IL-22-продуцирующих NCR<sup>+</sup>RORγ<sup>+</sup> ILC3-клеток и реципрокное увеличение IFNγ-продуцирующих ILC1-клеток в толстой и подвздошной кишке у пациентов с болезнью Крона относительно здоровых пациентов контрольной группы [4], предопределяя гипотезу, что баланс между IFNγ-продуцирующими и IL-22-продуцирующими ILC клетками может влиять на тяжесть воспаления кишечника, влияя на проницаемость кишечника и его репарацию. Powrie et al. (2011) установили увеличение экспрессии генов Th17-ассоциированных цитокинов *IL17A* и *IL17F* в CD3 клетках кишечной ткани у пациентов с болезнью Крона [7]. Эти исследования подчеркивают необходимость лучшего понимания

того, как ILC регулируют адаптивный иммунитет с целью разработки новых терапевтических стратегий, направленных на лечение заболеваний, связанных с неадекватными воспалительными реакциями на синантропную микрофлору, аллергены или аутоантигены. Кроме того, развитие и прогрессирование ВЗК может быть связано не только с изменением уровня экспрессии PRR и дисбалансом адаптивных субпопуляций Th1, Th2, Th17 и Treg-клеток, а и с распределением в КАЛТ врожденных T-bet<sup>+</sup>, GATA3<sup>+</sup> и RORγ<sup>+</sup> лимфоцитов.

## Выводы

1. Развитие как острого, так и хронического илеита сопровождается однонаправленным увеличением количества TLR2<sup>+</sup> лимфоцитов на фоне снижения TLR4<sup>+</sup> и регуляторных FoxP3<sup>+</sup> клеток, тогда как число T-bet<sup>+</sup> и RORγ<sup>+</sup> клеток зависит от длительности течения патологического процесса – снижается при остром и возрастает при хроническом илеите.

2. Введение симвастатина и АРИЛ-1 экспериментальным животным влияет на уровень экспрессии PRR лимфоцитами, преимущественно снижает количество RORγ<sup>+</sup> и T-bet<sup>+</sup> лимфоцитов и увеличивает плотность супрессорных FoxP3<sup>+</sup> лимфоцитов.

## Список литературы / References

1. Bamas G., Martin C., Mishina M., Ross W.G., Rivera-Nieves J., Marini M., Cominelli F. Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 2005, Vol. 28, no. 3, pp. 654-656.
2. Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunol.*, 2008, Vol. 1, pp. 62-66.
3. Chao K., Zhong B.H., Zhang S.H., Gong X.R., Yao J.Y., Chen M.H. Imbalance of CD4(+) T cell subgroups in ulcerative colitis. *Zhonghua. Yi Xue Za Zhi.*, 2011, Vol. 91, no. 23, pp. 1605-1608.
4. Ciccia F., Accardo-Palumbo A., Alessandro R., Rizzo A., Principe S., Peralta S., Raiata F., Giardina A., De Leo G., Triolo G. Interleukin-22 and interleukin-22-producing NKp44<sup>+</sup> natural killer cells in subclinical gut inflammation in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.*, 2012, Vol. 64, no. 6, pp. 1869-1878.
5. Dambacher J., Beigel F., Zitzmann K., De Toni E.N., Göke B., Diepolder H.M., Auernhammer C.J., Brand S. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut*. 2009, Vol. 58, no. 9, pp. 1207-1217.
6. Eberl G. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 5, pp. 413-420.
7. Geremia A., Arancibia-Cárcamo C.V., Fleming M.P., Rust N., Singh B., Mortensen N.J., Travis S.P., Powrie F. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 6, pp. 1127-1133.
8. Grip O., Janciauskiene S. Atorvastatin reduces plasma levels of chemokine (CXCL10) in patients with Crohn's disease. *PLoS One.*, 2009, Vol. 4, no. 5, pp. 5263-5269.
9. Izcue A., Coombes J.L., Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 212, pp. 256-271.
10. Leung B.P., Sattar N., Crilly A., Prach M., McCarey D.W., Payne H., Madhok R., Campbell C., Gracie J.A., Liew F.Y., McInnes I.B. A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 3, pp. 1524-1530.
11. Nandi J., Saud B., Zinkievich J.M., Yang Z.J., Levine R.A. TNF-alpha modulates iNOS expression in an experimental rat model of indomethacin-induced jejunoileitis. *Mol. Cell Biochem.*, 2010, Vol. 336, no. 1-2, pp. 17-24.
12. Negishi H., Yanai H., Nakajima A., Koshiba R., Atarashi K., Matsuda A., Matsuki K., Miki S., Doi T., Aderem A., Nishio J., Smale ST., Honda K., Taniguchi T. Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 7, pp. 659-666.

13. Neurath M.F., Weigmann B., Finotto S., Glickman J., Nieuwenhuis E., Iijima H., Mizoguchi A., Mizoguchi E., Mudter J., Galle P.R., Bhan A., Autschbach F., Sullivan B.M., Szabo S.J., Glimcher L.H., Blumberg R.S. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 9, pp. 1129-1143.
14. Ohtani K., Ohtsuka Y., Ikuse T., Baba Y., Yamakawa Y., Aoyagi Y., Fujii T., Kudo T., Nagata S., Shimizu T. Increased mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 in pediatric ulcerative colitis. *Pediatr. Int.*, 2010, Vol. 52, no. 4, pp. 584-589.
15. Reynolds J.M., Pappu B.P., Peng J., Martinez G.J., Zhang Y., Chung Y., Ma L., Yang X.O., Nurieva R.I., Tian Q., Dong C. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 5, pp. 692-702.
16. Sartor R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, Vol. 3, no. 7, pp. 390-407.
17. Sonnenberg G.F., Monticelli L.A., Alenghat T., Fung T.C. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science*, 2012, Vol. 336, no. 6086, pp. 1321-1325.
18. Spits H., Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, pp. 647-675.
19. Tanaka K. Expression of Toll-like receptors in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2008, Vol. 2, no. 2, pp. 193-196.
20. Thompson R.C., Dripps D.J., Eisenberg S.P. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) as a probe and as a treatment for IL-1 mediated disease. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1992, Vol. 14, no. 3, pp. 475-480.
21. Wang X., Li M., Zheng H., Muster T., Palese P., Beg A.A., Garcia-Sastre A. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J. Virol.*, 2000, Vol. 74, no. 24, pp. 11566-11573.
22. Yamada T., Deitch E., Specian R.D., Perry M.A., Sartor R.B., Grisham M.B. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation*, 1993, Vol. 17, no. 6, pp. 641-662.

---

**Авторы:**

**Жеребятъев А.С.** — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

**Камышный А.М.** — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

**Камышная В.А.** — к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

---

**Authors:**

**Zherebiatiev A.S.**, Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

**Kamyshnyi A.M.**, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

**Kamyshnaya V.A.**, PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

---

Поступила 10.11.2014

Отправлена на доработку 22.11.2014

Принята к печати 11.03.2015

---

Received 10.11.2014

Revision received 22.11.2014

Accepted 11.03.2015