



Зміни експресії NLRP3 інфламасоми та IL-1 β при розвитку індукованого оксазолоном коліту в щурів і на тлі введень симвастатину та антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 β

О. С. Жеребят'єв  *A,B,C,F, Н. М. Поліщук  D,E

Запорізький державний медичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

коліт, NLRP3
інфламасома, IL-1 β .

Патологія. 2021.
Т. 18, № 1(51).
С. 58-65

*E-mail:
a.zherebatiyev@gmail.com

Мета роботи – вивчити експресію мРНК інфламасоми NLRP3 і прозапального цитокіну IL-1 β у запаленій товстій кишці щурів з експериментальним оксазолоновим колітом і на тлі введень симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1.

Матеріали та методи. Експерименти виконали на самцях щурів лінії Wistar віком 8 місяців (маса тіла – 120–150 г). Зразки тканин отримували від щурів з експериментальним індукованим оксазолоном колітом (n = 20), щурів з індукованим оксазолоном колітом, яким вводили симвастатин (n = 20), щурів з індукованим оксазолоном колітом, яким вводили антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (n = 20), та контрольних тварин (n = 10). Клінічні ознаки коліту оцінювали за клінічним індексом активності захворювання за такими параметрами: втрата ваги, консистенція випорожнень, поведінка тварин. Для макроскопічного оцінювання розвитку коліту досліджували ділянки запалення та виразки у товстому кишечнику. Для гістологічного оцінювання уражень ділянки кишечника забарвлювали гематоксиліном та еозинном, вивчали клітинні запальні інфільтрати, гіперплазію епітелію, виразки та втрату кишкових залоз. Експресію мРНК цитокіну IL-1 β і NLRP3 аналізували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу.

Результати. У тварин, яким вводили оксазолон, швидко розвинувся коліт, спостерігали втрату ваги та діарею, що досягла піку на другу добу після введення оксазолону та призвела до загибелі 40 % щурів на четверту добу. Гістологічне дослідження показало запальну інфільтрацію клітин, включаючи поліморфно-ядерні лейкоцити та множинні ерозивні ураження товстого кишечника. Встановили, що рівень експресії прозапального цитокіну IL-1 β підвищений у зразках товстої кишки щурів з оксазолоновим колітом. Експресія IL-1 β збільшується у 3,5 раза в запаленій товстій кишці порівняно з незапаленою тканиною. Введення симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 щурам із колітом призвело до зниження рівня експресії IL-1 β у зразках товстої кишки на 30 % і вдвічі. Вивчили також експресію NLRP3 у цих тканинах. Аналіз полімеразної ланцюгової реакції показав 71-разове підвищення експресії мРНК NLRP3 у досліджених зразках товстої кишки. Введення симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 щурам із колітом спричинило зниження рівня експресії мРНК NLRP3 у зразках товстої кишки у 2,5 і 3,0 раза.

Висновки. Рівні експресії мРНК IL-1 β і NLRP3 інфламасоми підвищені в запаленому товстому кишечнику щурів з експериментальним оксазолоновим колітом. Введення симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на тлі розвитку коліту викликало зменшення рівнів експресії мРНК IL-1 β та NLRP3 у тканинах товстого кишечника. Виявлення аномальної експресії мРНК IL-1 β та NLRP3 може дати розуміння патогенезу хвороби Крона, а також допомогти визначити майбутні потенційні мішені терапевтичних стратегій у людей із запальними захворюваннями кишечника.

Key words:

colitis, NLRP3
protein,
inflammasomes,
IL-1 β .

Pathologia
2021; 18 (1), 58-65

Changes in expression of NLRP3 inflammasome and IL-1 β in the development of oxazolone-induced colitis in rats and on the background of administration of simvastatin and interleukin-1 β receptor antagonist

O. S. Zherebatiyev, N. M. Polishchuk

The aim. To study the expression of mRNA of the NLRP3 inflammasome and proinflammatory cytokine IL-1 β in the inflamed colon of rats with experimental oxazolone-induced colitis and against the background of the introduction of simvastatin and antagonist of interleukin-1 receptors.

Materials and methods. Experiments were carried out on male Wistar rats aged 8 months (body mass 120–150 g). Tissue samples were obtained from rats with experimental oxazolone-induced colitis (n = 20), rats with oxazolone-induced colitis treated with simvastatin (n = 20); rats with oxazolone-induced colitis treated with interleukin-1 receptor antagonist (n = 20) and control animals (n = 10). Clinical signs of colitis were evaluated by the clinical index of disease activity on the following parameters: weight loss, stool consistency and animal behavior. For macroscopic assessment of the development of colitis areas of inflammation and ulceration were investigated. For histological evaluation of lesions, sections of the intestine were stained with hematoxylin and eosin and cellular inflammatory infiltrates, epithelial hyperplasia, ulceration and loss of intestinal glands were studied. IL-1 β and NLRP3 inflammasome mRNA expression was analyzed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

Results. Animals treated with oxazolone rapidly developed colitis marked by weight loss and diarrhea peaking by day 2 after oxazolone administration and leading to death of 40 % of the rats by day 4. The histological observation showed inflammatory

cell infiltration, including polymorphonuclear leukocytes and multiple erosive lesions in the large intestine. We determined that the expression level of the proinflammatory cytokine IL-1 β is increased in colon samples of rats with oxazolone-induced colitis. IL-1 β expression is increased 3.5-fold in inflamed colon compared to uninfamed tissue. Administration of simvastatin and an interleukin-1 receptor antagonist to rats with oxazolone-induced colitis resulted in a 30 % and 2-fold decrease expression of IL-1 β in colon samples. In addition, we examined NLRP3 expression in these tissues. RT-PCR analysis demonstrates a 71-fold increased expression of NLRP3 mRNA expression in colon samples tested. Administration of simvastatin and an interleukin-1 receptor antagonist to rats with oxazolone-induced colitis resulted in a 2.5- to 3.0-fold decrease expression of NLRP3 mRNA in colon samples.

Conclusions. IL-1 β and NLRP3 mRNA expression levels were elevated in the inflamed colon of rats with experimental oxazolone-induced colitis. Administration of simvastatin and an interleukin-1 receptor antagonist against the background of colitis caused a decrease in the expression levels of IL-1 β and NLRP3 mRNA in the tissues of the intestine. Detection of abnormal expression of IL-1 β and NLRP3 mRNA could provide insights into pathogenesis of Crohn's disease, and may help to identify future potential targets for therapeutic strategies in people with inflammatory bowel disease.

Изменения экспрессии NLRP3 инфламмосомы и IL-1 β при развитии индуцированного оксазолоном колита у крыс и на фоне введения симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 β

A. С. Жеребятъев, Н. Н. Полищук

Цель работы – изучить экспрессию мРНК инфламмосомы NLRP3 и провоспалительного цитокина IL-1 β в толстой кишке крыс с экспериментальным оксазолоновым колитом и на фоне введения симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1.

Материалы и методы. Эксперимент провели на самцах крыс линии Wistar в возрасте 8 месяцев (масса тела – 120–150 г). Образцы тканей получали от крыс с экспериментальным индуцированным оксазолоном колитом (n = 20), крыс с индуцированным оксазолоном колитом, которым вводили симвастатин (n = 20), крыс с индуцированным оксазолоном колитом, которым вводили антагонист рецепторов интерлейкина-1 (n = 20), и контрольных животных (n = 10). Клинические признаки колита оценивали по клиническому индексу активности заболевания по таким параметрам: потеря веса, консистенция стула, поведение животных. Для макроскопической оценки развития колита исследовали участки воспаления и язвы в толстом кишечнике. Для гистологической оценки поражений участки кишечника окрашивали гематоксилином и эозином, изучали клеточные воспалительные инфильтраты, гиперплазию эпителия, язвы и потерю кишечных желез. Экспрессию мРНК цитокина IL-1 β и NLRP3 инфламмосомы анализировали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени.

Результаты. У животных, которым вводили оксазолон, быстро развивался колит, отмечали потерю веса и диарею, которая достигла пика на вторые сутки после введения оксазолона и привела к гибели 40 % крыс на четвертые сутки. Гистологическое исследование показало воспалительную инфильтрацию клеток, включая полиморфно-ядерные лейкоциты и множественные эрозивные поражения толстого кишечника. Установили, что уровень экспрессии провоспалительного цитокина IL-1 β повышен в образцах толстой кишки крыс с оксазолоновым колитом. Экспрессия IL-1 β увеличивается в 3,5 раза в воспаленной толстой кишке по сравнению с невоспаленной тканью. Введение симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 крысам с колитом привело к снижению уровня экспрессии IL-1 β в образцах толстой кишки на 30 % и в 2 раза. Кроме того, исследовали экспрессию NLRP3 в этих тканях. Анализ полимеразной цепной реакции показал 71-кратное повышение экспрессии мРНК NLRP3 в исследованных образцах толстой кишки. Введение симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 крысам с колитом привело к снижению уровня экспрессии мРНК NLRP3 в образцах толстой кишки в 2,5 и 3,0 раза.

Выводы. Уровни экспрессии мРНК IL-1 β и NLRP3 инфламмосомы повышены в воспаленной толстой кишке крыс с экспериментальным оксазолоновым колитом. Введение симвастатина и антагониста рецепторов интерлейкина-1 на фоне развития колита вызвало уменьшение уровней экспрессии мРНК IL-1 β и NLRP3 в тканях толстого кишечника. Обнаружение аномальной экспрессии мРНК IL-1 β и NLRP3 может дать понимание патогенеза болезни Крона, а также помочь определить будущие потенциальные мишени терапевтических стратегий у людей с воспалительными заболеваниями кишечника.

Ключевые слова:
колит, NLRP3
инфламмосомы,
IL-1 β .

Патология. 2021.
Т. 18, № 1(51).
С. 58-65

Запальні захворювання кишечника (ЗЗК) – хронічні, рецидивні захворювання, що виникають унаслідок хронічної дисрегуляції імунної системи слизової оболонки у шлунково-кишковому тракті. Основними типами ЗЗК є виразковий коліт і хвороба Крона. Патогенез ЗЗК до кінця не зрозумілий, але відомо, що в ньому задіяні генетичні й екологічні фактори.

Експериментальні моделі ілеїту та коліту в щурів розроблені для дослідження молекулярних і клітинних механізмів, що спричиняють виникнення ЗЗК, і ці моделі часто використовують для розроблення нових протизапальних препаратів [1]. Модель індукованого

оксазолоном коліту в щурів викликає запалення товстої кишки, що характеризується діареєю, кров'янистими випорожненнями, втратою ваги, гістологічною картиною запалення, утворенням виразок, які спостерігають під час ЗЗК у людини. Модель гострої запальної реакції, що викликана оксазолоном, корисна для вивчення ролі механізмів вродженого імунітету в запаленні кишечника.

Сімейство NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing) включає групу рецепторів, що розпізнають молекулярні структури, пов'язані з патогенами. NOD2 і NLRP3 – два найкраще

вивчених рецептори NLR, і мутації цих рецепторів пов'язані з хворобою Крона. NOD2 може розпізнати бактеріальну молекулу мураміддипептиду (MDP) й активує ядерний фактор-кВ (NF-кВ) для наступної індукції запальних шляхів [2]. Мутації гена NOD2 асоційовані з хворобою Крона. NLRP3, також відома як кріопірин, утворює інфламасому, в якій відбувається утворення з попередників про-IL-1 β і про-IL-18 їхніх активних форм. Мутації NLRP3 призводять до хронічних аутозапальних синдромів. Повідомляли, що деякі окремі нуклеотидні поліморфізми гена NLRP3 пов'язані з хворобою Крона [3]. Розуміння патофізіологічних механізмів запалення в кишечнику дає змогу адресно впливати на основні ланки патогенезу і не діяти на органи та системи, що не залучені в цей процес.

Як засіб фармакологічної корекції обрали симвастатин, що, крім зниження рівня холестерину, чинить різні плейотропні ефекти, зокрема імуномодельовальні та протизапальні. Дослідження, здійснені на тваринних моделях, свідчать: статини інгібують і гостре, і хронічне запалення холестерин-незалежним способом [4]. Підвищений рівень прозапальних цитокінів, включаючи IL-1, IL-6, IL-18 і фактор некрозу пухлини альфа (TNF α), виявляють при ЗЗК, він корелює з тяжкістю запалення. Оскільки дія IL-1 – універсальна відповідь організму на пошкодження, потенційно антагоніст рецепторів IL-1 можна використовувати для лікування захворювань, у патогенезі яких цей цитокін відіграє важливу роль, наприклад ЗЗК.

Нашу увагу привернув оригінальний рекомбінантний антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (АРІЛ-1), мішенню якого є рецептори до цитокінів, як-от прозапальний IL-1 β . У фаховій літературі описано наявність в АРІЛ-1 потужних церебропротекторних, анксиолітичних, антидепресивних і ноотропних властивостей, фригопротекторної, протизапальної, хондропротекторної, кардіо-, нефро- та гепатопротекторної активностей, а також гіпоурикемічної та гіполіпідемічної дій [5,6]. Це експериментально обґрунтовує доцільність розширення показань до застосування АРІЛ-1, особливо при ЗЗК. Усе це підтверджує актуальність експериментального вивчення дії АРІЛ-1.

Мета роботи

Вивчити експресію мРНК інфламасоми NLRP3 і прозапального цитокіну IL-1 β у запаленій товстій кишці щурів з експериментальним оксазолоновим колітом і на тлі введень симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1.

Матеріали і методи дослідження

Восьмимісячних самців щурів лінії Wistar вагою 120–150 г на початку експерименту отримали з Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (м. Київ), а потім розмістили індивідуально в кімнати з контрольованою температурою (22 \pm 1 °C) з 12-годинним циклом світло-темрява, що починається о 8:00 ранку, та контрольованою вологістю (60–80 %). Їжа та вода були у вільному доступі тварин.

Усі експерименти на тваринах виконали згідно з міжнародними принципами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 18.03.1986) та «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001).

Для макроскопічного спостереження товсту кишки розтинали в повздожньому напрямі. Макроскопічні прояви запалення оцінювали, як описано в методиці спеціально для індукованого оксазолоном коліту [7].

Щурів поділили на експериментальні групи: 1 – контрольні тварини (10 щурів), яким інтраректально вводили 50 % розчин етанолу; 2 – тварини з індукованим оксазолоном колітом (20 щурів); 3 – тварини з індукованим оксазолоном колітом, яким вводили симвастатин (20 щурів); 4 група – тварини з індукованим оксазолоном колітом, яким вводили АРІЛ-1 (20 щурів).

Оксазолон (4-етоксиметилен-2-феніл-2-оксазолін-5-он) отримували від компанії Sigma-Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі). Для попередньої сенсibilізації щурам голили ділянку шкіри живота розміром 2 \times 2 см і наносили 200 мкл 3 % розчину оксазолону в 100 % етанолі. Через 7 днів після сенсibilізації щурам у пряму кишку вводили 0,1 % розчин оксазолону в 50 % етанолі в дозі 1,5 мг/кг маси тіла за допомогою поліуретанового катетера. Щурів утримували в положенні головою вниз протягом 30 с, а потім повертали у клітки. Етанол використовують, щоб допомогти оксазолону пройти через епітеліальний бар'єр кишечника [8].

Симвастатин вводили внутрішньочеревно в дозі 20 мг/кг із розрахунку 5 мл/кг маси. Введення здійснювали один раз на добу через 24 години після моделювання патології протягом 5 днів. Субстанцію АРІЛ-1 отримали у формі розчину для ін'єкцій (50 мг/мл) від Державного науково-дослідного інституту особливо чистих біопрепаратів Федерального медико-біологічного агентства Росії «ДНДІ ОЧБ» (м. Санкт-Петербург, РФ) на час дослідження на підставі договорів про науково-технічне співробітництво. Субстанція АРІЛ-1 – ліофільно висушений білок ІЛ-1 α , який отримали за допомогою генно-інженерних технологій із бактерії *E. coli* TG1 (pTAC-hIL-1 α) і складається зі 153 амінокислот із молекулярною масою 17906 кДа. АРІЛ-1 розчиняли у фізіологічному розчині, щоб отримати 0,03 % розчин (0,6 мл АРІЛ-1 у 99,4 мл фізіологічного розчину) та вводили підшкірно в дозі 3 мг/кг із розрахунку 10 мл/кг маси, тобто одній тварині вагою 150 г вводили 1,5 мл розчину. Вибір доз для введення визначали на підставі експериментальних даних, що наведені в літературі з дослідження цього препарату у тварин [5,9]. Оскільки дія АРІЛ-1 є залежність «ефект – доза», то обрали низьку дозу препарату, коли АРІЛ-1 діє як селективний блокатор IL-1 β . Введення здійснювали один раз на добу через 24 години після моделювання патології протягом 5 днів.

Щурів евтаназували передозуванням ефіру через 6 днів після індукції коліту й видаляли тканини товстого кишечника. Після видалення тканини промивали холодним сольовим розчином, забуференим фосфатом і поміщали в розчин Буена на 4–5 годин. Після фіксації

зразки зневоднювали, інкубували у ксилолі, заливали в парафін, надалі – за стандартними гістологічними протоколами. РНК вилучали зі зрізів фіксованих у розчині Буена тканин завтовшки 15 мкм [10].

Клінічні ознаки коліту оцінювали, обраховуючи клінічний індекс активності захворювання (disease activity index – DAI) за такими параметрами: втрата маси тіла, консистенція випорожнень, поведінка тварин [11]. Для макроскопічного оцінювання розвитку коліту кишечник щурів розрізали в поздовжньому напрямі й досліджували, враховуючи ділянки запалення та утворення виразок [12]. Для гістологічного оцінювання уражень зрізи кишечника забарвлювали гематоксиліном, еозином і досліджували, враховуючи наявність клітинних запальних інфільтратів, епітеліальну гіперплазію, утворення виразок і втрату кишкових залоз.

Загальну РНК виділяли з тканини товстої кишки за допомогою Trizol RNA Prep 100 (Isogen, РФ) за інструкціями виробника, кількісно визначали та піддавали реакції полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у режимі реального часу. Для цього використовували систему CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Усі необхідні праймери розроблені з використанням програмного забезпечення для проектування Primer-BLAST (NIN, США), синтезовані фірмою Metabion (ФРН). ЗТ-ПЛР здійснювали за параметрами: після початкової денатурації протягом 10 хв при 95 °С виконували 45–50 циклів послідовних етапів денатурації при 95 °С протягом 15 с, віджиг праймерів при 64 °С протягом 1 хв, елонгація при 72 °С протягом 30 с. Результати нормалізували за допомогою ампліфікації з еталонними генами GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогеназа). Результат ПЛР-аналізу наведений як відносна нормалізована експресія цієї мРНК.

Усі експериментальні дані опрацьовані на персональному комп'ютері з використанням прикладних і статистичних програм: Excel з пакета MS Office 2010 (Microsoft Corp., США), Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J), GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, США). Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної (M), її дисперсії та помилки середньої (m). Порівнюючи дані, використовували параметричний t -критерій Стюдента та непараметричний U -критерій Манна-Вітні, після цього визначали вірогідність різниці вибірок (p) і довірчий інтервал середньої. Статистичний аналіз даних ЗТ-ПЛР виконали за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США) Для вираження відносного рівня експресії генів використовували порівняльний C_t метод ($\Delta\Delta C_t$ метод) [13].

Результати

У тварин, яким інтравектально вводили оксазолон, швидко розвивається коліт, який супроводжується втратою маси тіла, діареєю та високим DAI, а також призводить до загибелі 40 % щурів на четвертий день захворювання (DAI – 9,1 бала). (рис. 1).

У тварин, яким вводили оксазолон, швидко розвивався коліт, спостерігали втрату ваги та діарею, що досягла піку до другого дня після введення оксазолону та призвела до загибелі 40 % щурів до четвертого

дня. Макроскопічне дослідження показало, що ділянки запалення та утворення виразок визначали передусім у дистальному відділі кишечника. Гістологічне спостереження показало запальну інфільтрацію клітин, включаючи поліморфно-ядерні лейкоцити та множинні ерозивні ураження в товстому кишечнику. Іноді у слизовій оболонці товстої кишки виявляли абсцес крипти та регенований епітелій (рис. 2).

У контрольних щурів, яким інтравектально вводили 50 % розчин етанолу, не розвивається патологія, і вони мали здоровий вигляд.

Введення симвастатину й АРІЛ-1 щурам із колітом призвело до істотного зниження клінічних параметрів коліту (DAI становив 5,7 та 5,1 бала відповідно). Також введення препаратів істотно поліпшувало макроскопічні й мікроскопічні ознаки експериментального коліту (рис. 1).

Дослідження ЗТ-ПЛР показало, що рівень експресії прозапального цитокіну IL-1 β підвищений у зразках товстої кишки щурів із колітом. Експресія IL-1 β збільшується у 3,5 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Введення симвастатину та АРІЛ-1 щурам із колітом спричинило зниження рівня експресії прозапального цитокіну IL-1 β у зразках товстої кишки на 30 % та вдвічі ($p < 0,05$). Крім того, дослідження експресії NLRP3 у цих тканинах показало 71-разове ($p < 0,05$) підвищення експресії мРНК NLRP3 у зразках товстої кишки щурів із колітом порівняно з контрольними тваринами. Введення симвастатину та АРІЛ-1 щурам із колітом призвело до зниження рівня експресії мРНК NLRP3 у зразках товстої кишки у 2,5 і 3,0 раза ($p < 0,05$).

Обговорення

У цьому дослідженні вивчали експресію мРНК IL-1 β і NLRP3 на експериментальній моделі запалення товстого кишечника. Надмірну експресію цих маркерів спостерігали в разі індукованого оксазолоном коліту в щурів. Дані, отримані від людини і на тваринних моделях коліту, свідчать: надмірна експресія IL-1 β відіграє ключову роль у патогенезі ЗЗК [14].

Bersudsky M. et al., вивчаючи роль агоністів IL-1, IL-1 α , який асоціюється передусім із клітинами, порівняно з IL-1 β , що здебільшого секретується, при запаленні товстої кишки, показали: IL-1 β бере участь у відновленні клітин епітелію кишечника та відновленні епітеліального бар'єра під час розвитку коліту [15]. У нашому дослідженні експресія IL-1 β збільшилась у 3,5 раза в запаленій тканині товстої кишки порівняно з нормальною тканиною. Це свідчить, що зміни експресії IL-1 β відіграють певну роль у патофізіології хвороби Крона.

Цитокін IL-1 β з'являється одним із перших під час запалення кишечника, а його проформи переробляються через мультипротеїновий комплекс – інфламасому NLRP3, що активує каспазу-1. Однак роль інфламасоми в гострому запаленні кишечника залишається суперечливою, а їхня участь в опосередкованому IL-1 β запаленні при хронічному коліті недостатньо вивчена. Через здатність викликати прозапальну реакцію та завдавати шкоди організму

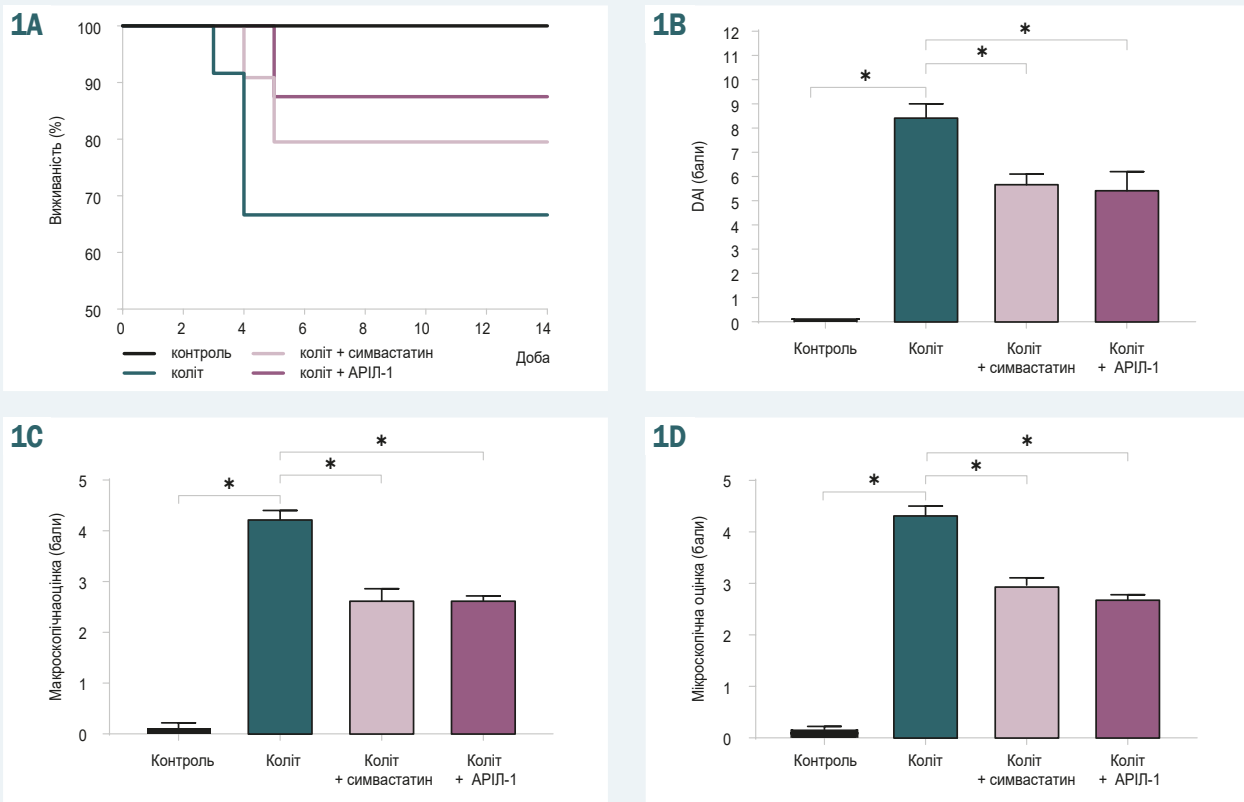


Рис. 1. Вживаність тварин (А), індекс активності захворювання (В), макроскопічне (С) та мікроскопічне (D) оцінювання змін у товстому кишечнику під час розвитку експериментального коліту та після введення симвастатину й АРІІ-1 експериментальним тваринам. *: $p < 0,05$. Для порівняння груп застосований U-критерій Манна-Вітні.

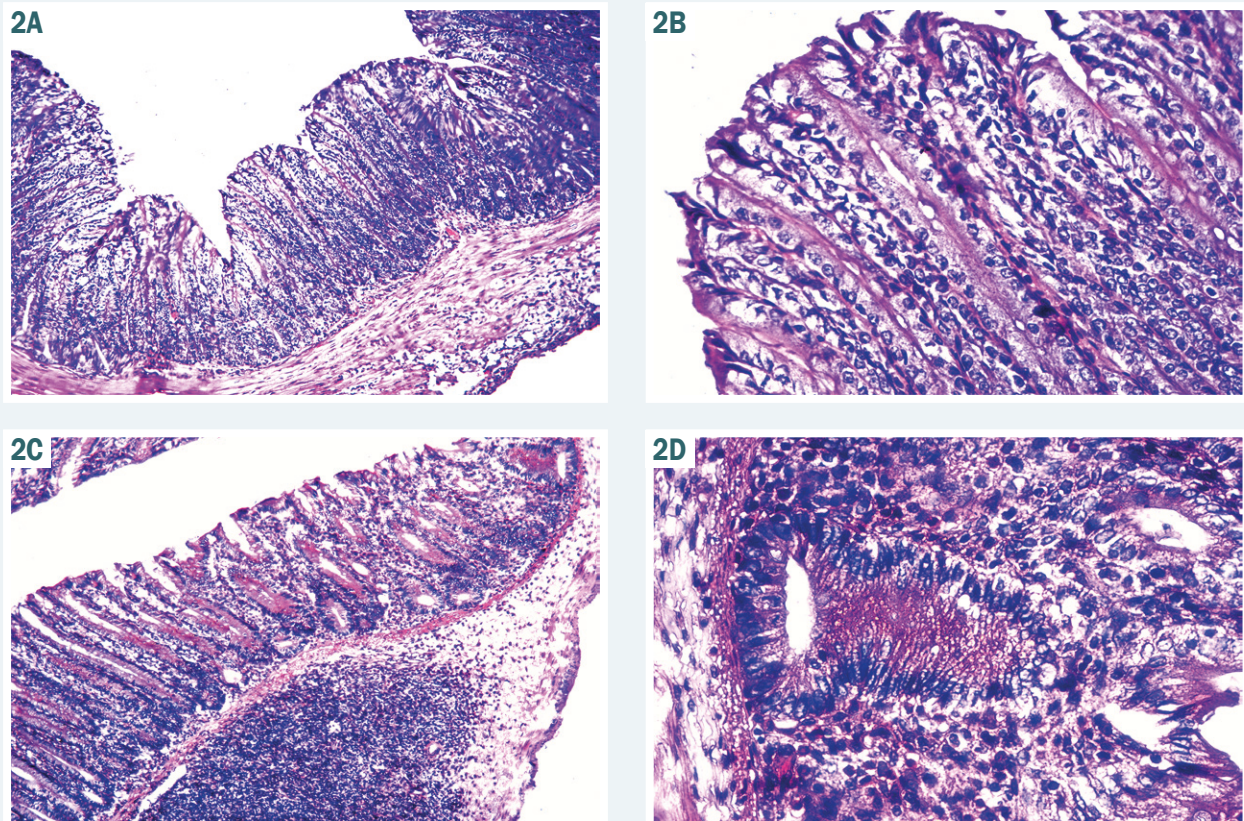


Рис. 2. Мікроскопічні зміни у проксимальному (А, В) та дистальному відділах (С, D) товстого кишечника щурів під час розвитку експериментального коліту. Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.: $\times 100$ (А, С), $\times 400$ (В, D).

продукція IL-1 β контролюється на багатьох рівнях. Для отримання зрілого цитокіну IL-1 β потрібні принаймні два сигнали: перший сигнал ініціюється лігандами TLR або ендогенними молекулами, які індують експресію гена pro-IL-1 β ; другий сигнал включає різні подразники, що активують запальний процес, спричиняючи дозрівання IL-1 β [16].

Інфламасоми – багатомолекулярний комплекс, що складається з білка NLR і каспази-1, який контролює обробку прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-18. Кілька досліджень показують: миші, в яких є дефіцит запальних компонентів, включаючи NLRP3 і каспазу 1, сприйнятливі до гострого коліту, що індукований декстраном сульфатом натрію. Але в одній роботі виявили протилежні результати: дефекти в запаленні, що опосередковане NLRP3, захищають мишей від експериментального коліту [17]. Є розбіжності щодо ролі інфламасоми в імунному захисті слизової оболонки та впливу мікробіоти кишечника, і для розв'язання цього питання необхідні подальші дослідження.

Оскільки ЗЗК – гетерогенне захворювання, можливо, в деяких хворих генетичні мутації чи фактори довкілля можуть спричинити знижену активацію запального процесу та продукцію IL-1 β , що порушує цілісність епітеліального клітинного бар'єра, робить його проникним до мікробіоти, зумовлюючи запалення кишечника. В інших хворих на ЗЗК генетичні фактори та комасальні мікроорганізми можуть спричинити тривалу або нерегульовану активацію запальних процесів і підвищену продукцію IL-1 β , викликаючи неконтрольоване запалення в кишечнику [18]. Отже, передбачається, що прозапальні цитокіни опосередковують захист організму проти мікробних патогенів і гомеостаз кишечника, а порушення їхньої регуляції може призводити до розвитку ЗЗК. Поглиблення знань про запальний процес може дати уявлення про потенційні терапевтичні цілі для пацієнтів із ЗЗК.

У цьому дослідженні встановили також, що введення симвастатину та антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на тлі розвитку коліту викликало зменшення рівнів експресії мРНК IL-1 β і NLRP3 у тканинах товстого кишечника. Балас IL-1 та антагоністів рецепторів інтерлейкіну-1 відіграє важливу роль у регуляції запалення та імунної відповіді. Maeda S. et al. вказали на дисбаланс між IL-1 β та антагоністами рецепторів інтерлейкіну-1, який може відігравати роль у патогенезі ЗЗК [19]. Birgit et al. показали, що блокада IL-1 β шляхом введення тваринам антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (Анакірна) пригнічує розвиток коліту [20].

У багатьох дослідженнях показано, що статини позитивно впливають на перебіг коліту в щурів, проте немає робіт, де акцентовано на вивченні впливу статинів на експресію мРНК IL-1 β і NLRP3 в кишечнику [21,22]. У нашому дослідженні підтвердили, що зниження рівня експресії мРНК IL-1 β і NLRP3 у кишечнику може відповідати за протизапальну дію статинів та антагоністів рецепторів інтерлейкіну-1. Зробили висновок, що антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 ефективніший при коліті, ніж симвастатин. Цей результат передбачає, що обидві активні речовини можуть бути альтернативною терапевтичною стратегією при ЗЗК.

Висновки

1. Рівні експресії мРНК IL-1 β і NLRP3 підвищені в запаленому товстому кишечнику щурів з експериментальним оксазолоним колітом.

2. Введення симвастатину й антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 на тлі розвитку коліту викликало зменшення рівнів експресії мРНК IL-1 β і NLRP3 у тканинах товстого кишечника.

3. Введення симвастатину й АПІЛ-1 тваринам з колітом зменшує їхню загибель і суттєво знижує вираженість запальних змін у кишечнику. Ці ефекти вираженіші для антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1, що підтверджує наявність в АПІЛ-1 протизапальних властивостей, що визначаються його здатністю під час запалення кишечника блокувати надлишкові кількості прозапальних IL-1 і його ефекти.

4. Виявлення аномальної експресії мРНК IL-1 β і NLRP3 може мати значення для з'ясування патогенезу хвороби Крона, а також може сприяти визначенню майбутніх потенційних цілей для терапевтичних стратегій у пацієнтів із ЗЗК.

Перспективи подальших досліджень. Плануємо вивчити зміни взаємодії мікробіоти кишечника та клітин ланки набутого імунітету в нормі та в разі розвитку гострого та хронічного ілеїту у тварин.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 07.12.2020

Після доопрацювання / Revised: 17.02.2021

Прийнято до друку / Accepted: 23.02.2021

Відомості про авторів:

Жереб'ятьєв О. С., канд. мед. наук, старший викладач каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: [0000-0002-1041-0084](https://orcid.org/0000-0002-1041-0084)

Поліщук Н. М., канд. мед. наук, доцент, зав. каф. мікробіології, вірусології та імунології, Запорізький державний медичний університет, Україна.
ORCID ID: [0000-0002-9791-5818](https://orcid.org/0000-0002-9791-5818)

Information about authors:

Zherebiatiev O. S., MD, PhD, Senior Lecturer of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Polishchuk N. M., MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Сведения об авторах:

Жереб'ятьев А. С., канд. мед. наук, старший преподаватель каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Полищук Н. Н., канд. мед. наук, доцент, зав. каф. микробиологии вирусологии, и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Список літератури

- [1] Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases / E. Tourkochristou, I. Aggeletopoulou, C. Konstantakis, C. Triantos. *World journal of gastroenterology*. 2019. Vol. 25, Iss. 33. P. 4796-4804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i33.4796>

- [2] A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents / P. K. Randhawa, K. Singh, N. Singh, A. S. Jaggi. *The Korean journal of physiology & pharmacology*. 2014. Vol. 18, Iss. 4. P. 279-288. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.279>
- [3] Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: A case-control study / S. Hanaei, M. Sadr, A. Rezaei et al. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2018. Vol. 42, Iss. 3. P. 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.09.003>
- [4] Jain M. K., Ridker P. M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nature reviews. Drug discovery*. 2005. Vol. 4, Iss. 12. P. 977-987. <https://doi.org/10.1038/nrd1901>
- [5] IL-1Ra stabilises the thiol-disulfide system in the brain tissues of rats with experimental diabetes and cerebral ischemia / O. Suprun, L. Gromov, I. Belenichev, E. Suprun. *European Neuropsychopharmacology*. 2014. Vol. 24, Suppl. 2. P. S236-S239. [https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(14\)70368-2](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(14)70368-2)
- [6] Щокіна К. Г. Органотропні ефекти рекомбінантного антагоніста рецепторів інтерлейкіну-1 (експериментальне дослідження) : автореф. дис. ... д-ра фармац. наук : 14.03.05 / Нац. фармац. ун-т. Харків, 2011. 38 с.
- [7] Chemically induced mouse models of intestinal inflammation / S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M. F. Neurath. *Nature protocols*. 2007. Vol. 2, Iss. 3. P. 541-546. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.41>
- [8] Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins / Y. Wang, J. Tong, B. Chang et al. *Molecular medicine reports*. 2014. Vol. 9, Iss. 6. P. 2352-2356. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2126>
- [9] Pharmacological correction of thiol-disulphide imbalance in the rat brain by intranasal form of IL-1b antagonist in a model of chronic cerebral ischemia / I. F. Belenichev, A. M. Ishchenko, A. S. Simbirsev et al. *Neurochemical Journal*. 2021. Vol. 15, Iss. 1. P. 30-36.
- [10] Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? / C. Seiler, A. Sharpe, J. Barrett et al. *BMC clinical pathology*. 2016. Vol. 16, Iss. 17. P. 30-35. <https://doi.org/10.1186/s12907-016-0039-3>
- [11] 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. Vol. 132, Iss. 3. P. 944-954. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.029>
- [12] 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. Vol. 96, Iss. 3. P. 795-803.
- [13] Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 2002. Vol. 29, Iss. 1. P. 23-39. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- [14] Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations / J. Li, T. Moran, E. Swanson et al. *Human molecular genetics*. 2004. Vol. 13, Iss. 16. P. 1715-1725. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh182>
- [15] Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice / M. Bersudsky, L. Luski, D. Fishman et al. *Gut*. 2014. Vol. 63, Iss. 4. P. 598-609. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303329>
- [16] Latz E., Xiao T. S., Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology*. 2013. Vol. 13, Iss. 6. P. 397-411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
- [17] NLRP3 inflammasome has a protective effect against oxazolone-induced colitis: a possible role in ulcerative colitis / S. Itani, T. Watanabe, Y. Nadatani et al. *Scientific reports*. 2016. Vol. 6. P. 390-395. <https://doi.org/10.1038/srep39075>
- [18] Петрина В. О. Ефективність терапії неспецифічного виразкового коліту з урахуванням способу введення лікарських засобів. *Запорозький медичний журнал*. 2017. Т. 19, №. 4. С. 446-450. <http://doi.org/10.14739/2310-1210.2017.4.105030>
- [19] Mucosal imbalance of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in canine inflammatory bowel disease / S. Maeda, K. Ohno, K. Nakamura et al. *Veterinary journal*. 2012. Vol. 194, Iss. 1. P. 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.026>
- [20] Loss of TLR2 worsens spontaneous colitis in MDR1A deficiency through commensally induced pyroptosis / B. Ey, A. Eyking, M. Klepak et al. *Journal of immunology*. 2013. Vol. 190, Iss. 11. P. 5676-5688. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201592>
- [21] Rea W. E., Durrant D. C., Boldy D. A. Ulcerative colitis after statin treatment. *Postgraduate medical journal*. 2002. Vol. 78, Iss. 919. P. 286-287. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.919.286>
- [22] Protective effect of simvastatin and rosuvastatin on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats / R. A. Maheshwari, R. Balaraman, G. U. Sailor, D. B. Sen. *Indian journal of pharmacology*. 2015. Vol. 47, Iss. 1. P. 17-21. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.150311>

References

- [1] Tourkochristou, E., Aggeletopoulou, I., Konstantakis, C., & Triantos, C. (2019). Role of NLRP3 inflammasome in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 25(33), 4796-4804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i33.4796>
- [2] Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *The Korean journal of physiology & pharmacology*, 18(4), 279-288. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.279>
- [3] Hanaei, S., Sadr, M., Rezaei, A., Shahkarami, S., Ebrahimi Daryani, N., Bidoki, A. Z., & Rezaei, N. (2018). Association of NLRP3 single nucleotide polymorphisms with ulcerative colitis: A case-control study. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*, 42(3), 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2017.09.003>
- [4] Jain, M. K., Ridker, P. M. (2005). Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms. *Nature reviews. Drug discovery*, 4(12), 977-987. <https://doi.org/10.1038/nrd1901>
- [5] Suprun, O., Gromov, L., Belenichev, I., & Suprun, E. (2014). IL-1Ra stabilises the thiol-disulfide system in the brain tissues of rats with experimental diabetes and cerebral ischemia. *European Neuropsychopharmacology*, 24(Suppl 2), S236-S237. [https://doi.org/10.1016/s0924-977x\(14\)70368-2](https://doi.org/10.1016/s0924-977x(14)70368-2)
- [6] Shchokina, K. G. (2011). *Orhanotropni efekty rekombinantnoho antahonista retseptoriv interleukinu-1* (eksperymentalne doslidzhennia) [Organotropic effects of recombinant receptor antagonist of interleukin-1 (experimental research) (Doctoral dissertation)]. National Pharmaceutical University. [in Ukrainian].
- [7] Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., & Neurath, M. F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature protocols*, 2(3), 541-546. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.41>
- [8] Wang, Y., Tong, J., Chang, B., Wang, B., Zhang, D., & Wang, B. (2014). Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Molecular medicine reports*, 9(6), 2352-2356. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2126>
- [9] Belenichev, I. F., Ishchenko, A. M., Simbirsev, A. S., Burlaka, B. S., Bukhtiyarova, N. V. & Suprun, E. V. (2021). Pharmacological correction of thiol-disulphide imbalance in the rat brain by intranasal form of IL-1b antagonist in a model of chronic cerebral ischemia. *Neurochemical Journal*, 15(1), 30-36.
- [10] Seiler, C., Sharpe, A., Barrett, J. C., Harrington, E. A., Jones, E. V., & Marshall, G. B. (2016). Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality?. *BMC clinical pathology*, 16, 17. <https://doi.org/10.1186/s12907-016-0039-3>
- [11] Khalil, P. N., Weiler, V., Nelson, P. J., Khalil, M. N., & Moosmann, S. (2007). Nonmyeloablative stem cell therapy enhances microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 132(3), 944-954. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.12.029>
- [12] Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., & Wallace, J. L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96(3), 795-803.
- [13] Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29(1), 23-39. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- [14] Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D. K., Hedl, M., Nicolae, D. L., Abraham, C., & Cho, J. H. (2004). Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human molecular genetics*, 13(16), 1715-1725. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh182>
- [15] Bersudsky, M., Luski, L., Fishman, D., White, R. M., Ziv-Sokolovskaya, N., Dotan, S., Rider, P., Kaplanov, I., Aychek, T., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Voronov, E. (2014). Non-redundant properties of IL-1 α and IL-1 β during acute colon inflammation in mice. *Gut*, 63(4), 598-609. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303329>
- [16] Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature reviews. Immunology*, 13(6), 397-411. <https://doi.org/10.1038/nri3452>
- [17] Itani, S., Watanabe, T., Nadatani, Y., Sugimura, N., Shimada, S., Takeda, S., Otani, K., Hosomi, S., Nagami, Y., Tanaka, F., Kamata, N., Yamagami, H., Tanigawa, T., Shiba, M., Tominaga, K., Fujiwara, Y., & Arakawa, T. (2016). NLRP3 inflammasome has a protective effect against oxazolone-induced colitis: a possible role in ulcerative colitis. *Scientific reports*, 6, 39075. <https://doi.org/10.1038/srep39075>
- [18] Petryna, V. O. (2017). *Efektivnist terapii nespetsyfnogo vyr-azkovoho kolitu z urakhuvanniam sposobu vvedennia likarskykh zasobiv* [The effectiveness of ulcerative colitis treatment depending on the route of medical drug usage]. *Zaporozhye medical journal*, 19(4), 446-450. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2017.4.105030>

- [19] Maeda, S., Ohno, K., Nakamura, K., Uchida, K., Nakashima, K., Fukushima, K., Tsukamoto, A., Goto-Koshino, Y., Fujino, Y., & Tsujimoto, H. (2012). Mucosal imbalance of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in canine inflammatory bowel disease. *Veterinary journal*, 194(1), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.026>
- [20] Ey, B., Eyking, A., Klepak, M., Salzman, N. H., Göthert, J. R., Rünzi, M., Schmid, K. W., Gerken, G., Podolsky, D. K., & Cario, E. (2013). Loss of TLR2 worsens spontaneous colitis in MDR1A deficiency through commensally induced pyroptosis. *Journal of immunology*, 190(11), 5676-5688. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201592>
- [21] Rea, W. E., Durrant, D. C., & Boldy, D. A. (2002). Ulcerative colitis after statin treatment. *Postgraduate medical journal*, 78(919), 286-287. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.919.286>
- [22] Maheshwari, R. A., Balaraman, R., Sailor, G. U., & Sen, D. B. (2015). Protective effect of simvastatin and rosuvastatin on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Indian journal of pharmacology*, 47(1), 17-21. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.150311>