

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт морфологии человека»**

На правах рукописи

Чернышева Мария Борисовна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБОДОЧНОЙ
КИШКИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
АЛИМЕНТАРНОМ ОЖИРЕНИИ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель
д.м.н., профессор О.В. Макарова**

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	2
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Ожирение и метаболический синдром	10
1.2. Жировая ткань в норме и при ожирении	15
1.3. Модели ожирения	34
1.4. Гистофизиология тонкой и толстой кишки в норме и при ожирении...	40
1.5. Экспериментальные исследования морфологических, функциональных и молекулярно-биологических изменений толстой кишки при ожирении	55
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	62
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	72
3.1. Характеристика модели алиментарного ожирения по массометрическим, биохимическим, иммунологическим параметрам и морфологическим проявлениям	72
3.2. Морфофункциональная характеристика эпителиального барьера и локального компартмента иммунной системы ободочной кишки у крыс Спрейг-Доули при алиментарном ожирении	106
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	123
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	141
6. ВЫВОДЫ	144
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	146
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Ожирение широко распространено среди населения всего мира и часто сопровождается повышением частоты развития хронических эндокринных, воспалительных и онкологических заболеваний – сахарного диабета второго типа, рака толстой кишки, желчевыводящих путей, эндометрия, молочной железы и других [Ройтберг Г.Е., 2007; Kyrgiou M. et al., 2017]. По данным ВОЗ, во всем мире с 1980 по 2008 год число людей, страдающих ожирением, увеличилось более чем в 2 раза, и в настоящий момент в европейских странах более 30% населения имеют избыточный вес, а от 10 до 30% страдают ожирением [Проблема ожирения: краткие статистические данные: euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics]. В США от ожирения страдают от 20,2 до 36,2% населения [Adult Obesity in the United States: stateofobesity.org/adult-obesity]. В России избыточный вес наблюдается у 32%, а ожирение - у 25% взрослого населения [Козырева П.М. и соавт., 2014].

Избыточное накопление триглицеридов в жировой ткани при ожирении развивается при сочетании таких факторов, как высококалорийное питание, превышающее энергетические затраты организма, гиподинамия и генетическая предрасположенность [Дедов И.И. и соавт., 2004; Романцова Т.И., 2011]. При ожирении в жировой ткани и других органах наблюдается активация иммунных и воспалительных реакций [Lumeng C.N., 2013; McLaughlin T. et al., 2017]. Провоспалительное действие оказывают бактериальные эндотоксины и свободные жирные кислоты, содержание которых при ожирении в крови увеличивается [Divella R. et al., 2016]. Они являются лигандами для толл-подобных рецепторов, расположенных на поверхности адипоцитов и макрофагов, и запускают сложные сигнальные молекулярные каскады, приводящие к экспрессии транскрипционного ядерного фактора каппа-би (NF-κB) и, как следствие, активации

провоспалительных генов цитокинов, хемокинов и адгезинов и других [Lumeng C.N., 2013]. Одним из важных триггеров развития воспалительного процесса в жировой ткани является локальная гипоксия адипоцитов, вызванная их гипертрофией, снижением плотности микроциркуляторного русла и интенсивности кровотока [Blüher M., 2009]. При гипоксии в жировой ткани наблюдается активация транскрипционного гипоксией-индуцируемого фактора HIF и NF-κB, что в конечном итоге приводит к активации провоспалительных генов [Choe S.S. et al., 2016]. В активации иммунных и воспалительных реакций в жировой ткани при ожирении участвуют клетки врожденного и адаптивного иммунитета – макрофаги и лимфоциты [McLaughlin T. et al., 2017].

Механизмы ожирения интенсивно изучаются, и большое число посвященных этой проблеме работ выполнено на экспериментальных животных. Одной из основных стратегий моделирования ожирения является изменение рациона лабораторных животных - повышение содержания в нем жиров и/или углеводов [Лещенко Д.В. и соавт., 2015; Nilsson C. et al., 2012]. По данным литературы, сроки воспроизведения ожирения и метаболических нарушений в эксперименте значительно варьируют - от 4 до 48 недель [Kennedy A.J. et al., 2010; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. Однако большинство исследований непродолжительны и ограничиваются длительностью использования адипогенного рациона от 4 до 15 недель. В эти сроки у экспериментальных животных увеличивается масса тела и содержание в сыворотке крови глюкозы, инсулина и триглицеридов. Следует отметить, что представленные в литературе относительно короткие сроки моделирования ожирения недостаточны для реализации метаболических нарушений на структурном уровне с характерными для ожирения изменениями внутренних органов и выраженной активацией иммунного и воспалительного ответа.

При длительном патологическом ожирении, особенно висцерального типа, жировая ткань продуцирует провоспалительные адипокины и цитокины, что ассоциировано с развитием воспалительных реакций в барьерных органах и кровеносных сосудах [Caní P.D. et al., 2007;]. Так, известно, что ожирение является фактором риска для развития атеросклероза, бронхиальной астмы, неалкогольного стеатогепатита, хронического панкреатита и воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, включая колиты [Acosta A., Camilleri M., 2014]. По сравнению с другими барьерными органами толстая кишка заселена максимальным количеством микроорганизмов. Один из механизмов, вызывающий увеличение частоты воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта при ожирении, очевидно, связан с сопутствующим ожирению дисбиозом [Devkota S. et al., 2012; Silva F.A.R. et al., 2016].

Степень разработанности темы исследования. Данные литературы по морфологическим, функциональным и молекулярно-биологическим изменениям толстой кишки при ожирении немногочисленны и фрагментарны [De La Serre C.B. et al., 2010; Teixeira L.G. et al., 2011; Reichardt F. et al., 2013]. В большинстве работ сроки эксперимента относительно небольшие – 6-12 недель. Очевидно, поэтому морфологические изменения толстой кишки при высокожировой диете авторами не выявлены. Однако по данным литературы при ожирении возрастает частота заболеваний органов пищеварения, таких как синдром раздраженного кишечника, язвенный колит, рак толстой кишки [Long M.D. et al., 2011; Acosta A., Camilleri M., 2014; Pickett-Blakely O., 2014; Kyrgiou M. et al., 2017]. Для оценки морфологических изменений ободочной кишки при ожирении необходимо проведение более длительного эксперимента с использованием рациона, содержащего избыточное количество жиров и углеводов. В связи с вышеизложенным проблема изучения морфологических изменений ободочной кишки при ожирении является актуальной задачей.

Цель исследования. Изучить морфологические изменения эпителиального барьера и локальный компартмент иммунной системы ободочной кишки на модели экспериментального алиментарного ожирения, верифицированного по массометрическим, морфологическим, биохимическим и иммунологическим параметрам.

Задачи исследования.

1. Воспроизвести модель алиментарного ожирения у половозрелых самцов крыс Спрейг-Дуули, основанную на длительном (40 недель) потреблении рациона, содержащего избыточное количество жиров и углеводов
2. Определить с помощью методов иммуноферментного анализа в сыворотке крови концентрацию инсулина, общего и свободного тестостерона, эстрадиола, кортикостерона и эндотоксина, а в культуральной жидкости клеток селезенки - уровень интерлейкинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, фактора некроза опухолей (ФНО- α), интерферона- γ (ИНФ- γ) и факторов роста IGF-1 и EGF у крыс контрольной группы и с ожирением
3. Оценить в периферической крови с помощью методов проточной цитофлуориметрии абсолютное и относительное содержание субпопуляций лимфоцитов, а в окружающей придаток семенника жировой ткани - относительное количество макрофагов у крыс контрольной группы и с ожирением
4. Охарактеризовать морфологические изменения ободочной кишки, печени, поджелудочной железы, сердца и жировой ткани, окружающей придаток семенника у крыс с ожирением
5. Оценить изменения состава пристеночной и просветной микрофлоры толстой кишки методом ПЦР в реальном времени у крыс с ожирением
6. С помощью морфометрических, гистохимических и иммуногистохимических методов изучить изменения секреторных эпителиальных клеток ободочной кишки у крыс с ожирением

7. Провести количественную оценку изменений состава клеток, а также зрелого и незрелого коллагена в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) ободочной кишки у крыс с ожирением

Научная новизна.

Впервые разработана воспроизводимая у 85% животных модель алиментарного ожирения, развивающегося при длительном (в течение 40 недель) использовании адипогенного рациона с повышенным содержанием пальмового масла и фруктозы.

При ожирении у крыс в сыворотке крови возрастает уровень эндотоксина, провоспалительный эффект которого нивелируется за счет повышения содержания кортикостерона, в связи с чем баланс уровня про- и противовоспалительных цитокинов не нарушается.

В ободочной кишке у крыс с ожирением развиваются реактивные изменения, обусловленные активацией локального компартмента иммунной системы. Количество клеток в собственной пластинке слизистой оболочки повышается, и среди них возрастает относительное содержание лимфоцитов, нейтрофилов и CD68-положительных макрофагов. В собственной пластинке слизистой оболочки нарушаются процессы ремоделирования соединительной ткани с увеличением в ней доли незрелых и зрелых коллагеновых волокон.

Впервые показано, что при ожирении активация локального компартмента иммунной системы ободочной кишки сочетается с цитофизиологическими изменениями бокаловидных клеток, в которых снижается содержание нейтральных и высокосульфатированных гликопротеинов. В составе микрофлоры уменьшается содержание бактерий вида *Akkermansia muciniphila*.

Положения выносимые на защиту.

1. При длительном 40-недельном адипогенном рационе у половозрелых самцов крыс Спрейг-Доули развивается ожирение с метаболическими нарушениями и выраженными морфологическими изменениями внутренних органов – жировой дистрофией печени, липоматозом поджелудочной железы и гипертрофией адипоцитов жировой ткани, окружающей придаток семенника.
2. При ожирении у экспериментальных животных наблюдается повышение уровня эндотоксина, сочетающееся с увеличением содержания кортикостерона, который препятствует развитию системных проявлений воспаления, что подтверждается отсутствием нарушений баланса про- и противовоспалительных цитокинов.
3. В слизистой оболочке ободочной кишки при алиментарном ожирении у крыс наблюдаются реактивные изменения, обусловленные активацией локального компартмента иммунной системы - повышается содержание клеточных элементов и среди них лимфоцитов, нейтрофилов и CD68-положительных макрофагов, что сочетается с изменением процессов ремоделирования соединительной ткани с увеличением доли зрелых и незрелых коллагеновых волокон.
4. При ожирении снижается объемная доля ШИК-позитивных бокаловидных клеток и содержание в них нейтральных и высокосульфатированных гликопротеинов, что сочетается со снижением количества бактерий типа *Bacteroidetes* и вида *Akkermansia muciniphila* в составе микрофлоры.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные на экспериментальной модели ожирения данные о цитофизиологических изменениях бокаловидных клеток, активации локального компартмента иммунной системы и изменениях состава микрофлоры ободочной кишки следует учитывать при разработке алгоритма исследования

морфофункциональных изменений ободочной кишки при ожирении у человека.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 - клеточная биология цитология гистология согласно пунктам 5, 6, 7.

Методология и методы исследования. Методологической основой работы являлся системный подход и комплексный анализ научных трудов как отечественных, так и зарубежных авторов, которые изучали механизмы ожирения и сопутствующие ему метаболические, иммунологические и морфологические изменения у человека и лабораторных животных, и их сравнении с данными, полученными в результате диссертационного исследования. В работе использован комплекс методов, позволивший детально охарактеризовать метаболические нарушения и изменения слизистой оболочки ободочной кишки при длительном алиментарном ожирении: массометрические, биохимические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические, культуральные, проточная цитофлуориметрия, иммуноферментный анализ (ИФА), количественная ПЦР в реальном времени и статистические методы.

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании и проведении исследования, оценке полученных результатов и их статистической обработке, подготовке публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных методов исследования, корректным применением статистических методов анализа, критической оценкой результатов исследования и сопоставлением их с литературными данными.

Материалы диссертации доложены на 19 международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2015), Всероссийской научной конференции "Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016) и XV Всероссийском совещании с международным участием по эволюционной экологии (Санкт-Петербург, 2016).

Объем и структура работы. Работа изложена на 171 листе машинописного текста и дополнена иллюстративным материалом в количестве 28 рисунков и 15 таблиц. Она содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (208 источников).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОЖИРЕНИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

По данным ВОЗ в европейском регионе 30-70% населения страдают избыточным весом, а 10-30% - ожирением [Проблема ожирения: краткие статистические данные: <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>]. В США в разных штатах от ожирения страдают от 20,2 до 36,2% населения, причем в 29 из 50 штатов распространённость ожирения превышает 30% [Adult obesity in the United States: <http://stateofobesity.org/adult-obesity>].

Ожирение - хроническое полиэтиологическое заболевание, характеризующееся избыточным накоплением триглицеридов в жировой ткани, метаболическими нарушениями, повышением частоты развития сахарного диабета второго типа (на 27%), хронических воспалительных и онкологических заболеваний [Al Mushref M., Srinivasan S., 2013; Acosta A., Camilleri M., 2014]. Показано, что при ожирении повышение индекса массы тела (ИМТ) на каждые 5 единиц увеличивает риск развития онкологических заболеваний (рака толстой кишки, желчевыводящих путей, эндометрия, молочной железы, пищевода, поджелудочной железы, печени, почек и предстательной железы) на 9–56% [De Pergola G., Silvestris F., 2013; O'Flanagan C.H. et al., 2015; Brown J.C., Meyerhardt J.A., 2016; Kyrgiou M. et al., 2017]. По данным M. Kyrgiou et al. (2017) риск развития колоректального рака у мужчин увеличивается на 30% с ростом ИМТ на каждые 5 кг/м². В целом, риск развития колоректального рака у мужчин при ожирении повышается на 30-70% [Bardou M. et al., 2013]. У женщин риск развития рака груди возрастает на 11% при повышении массы тела на каждые 5 кг, а эндометрия - на 21% при увеличении индекса отношения объёма талии и бедер на 0.1 единицу [Kyrgiou M. et al., 2017].

Согласно международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем (International Statistical Classification of

Diseases and Related Health Problems 10th Revision, ICD-10), выделяют следующие виды ожирения: 1) ожирение, обусловленное избыточным поступлением энергетических ресурсов; 2) ожирение, вызванное приемом лекарственных средств; 3) крайняя степень ожирения с альвеолярной гиповентиляцией (синдром Пиквика); 4) избыточный вес; 5) другие формы ожирения и болезненное ожирение; 6) неуточненное ожирение [Международная классификация болезней (МКБ-10): <http://мкб-10.рф/ozhirenie>]. Данная классификация является стандартом для организации здравоохранения, эпидемиологии, медицины, а также анализа общего состояния здоровья населения.

Всемирной организацией здравоохранения была принята классификация ожирения по ИМТ, который рассчитывается как отношение массы тела в килограммах и величины роста человека в метрах, возведенной в квадрат [Ройтберг Г.Е., 2007]. Величина $ИМТ \geq 25 \text{ кг/м}^2$ свидетельствует о наличии избыточной массы тела, $\geq 30 \text{ кг/м}^2$ – ожирения. Причем, ИМТ от 30.00 до 34.99 кг/м^2 соответствует первой степени ожирения, от 35.00 до 39.99 кг/м^2 – второй, $\geq 40.00 \text{ кг/м}^2$ – третьей. Следует отметить, что между ИМТ и рисками заболеваемости и смертности существует прямая зависимость [Ройтберг Г.Е., 2007; Tchernof A., Després J.P., 2013]. Данная классификация является общепринятой и применяется в практической медицине, однако она не учитывает количество жировой ткани в организме [Sharma A.M., Kushner R.F., 2009].

Важными показателями развития ожирения является распределение жира. Ожирение можно классифицировать как абдоминальное (центральное, андроидное), когда основная масса жира расположена в брюшной полости, на передней брюшной стенке шее и лице, или как гиноидное - с преимущественным отложением жира в области бедер и таза [Ройтберг Г.Е., 2007; Tchernof A., Després J.P., 2013]. Для оценки количества и распределения жира необходимо дополнительное измерение окружности

талии, либо определения отношения окружности талии к окружности бедер. Центральное ожирение диагностируется по индексу отношения окружности талии и бедер, если он превышает 0,8 для женщин или 0,95 у мужчин [World Health Organisation "Waist Circumference and Waist-Hip Ratio, Report of a WHO Expert Consultation": http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/].

Основные причины развития ожирения - высококалорийное питание, превышающее энергетические затраты организма, избыточное потребление жиров и углеводов, гиподинамия, а также генетическая предрасположенность [Дедов И.И. и соавт., 2004.; Романцова Т.И., 2011]. Следует отметить, что структура питания населения многих регионов мира, включая Россию, не сбалансирована по макро- и микронутриентам. В рационе питания взрослого населения и детей содержание жиров по калорийности превышает рекомендуемые ВОЗ уровни на 20%. Особенно высокий вклад жиров в калорийность рациона питания (37%) наблюдается у мужчин. При этом расчетные показатели потребления витаминов и минеральных веществ оказываются ниже рекомендуемых величин [Козырева П.М. и соавт., 2014].

Согласно данным Российского мониторинга экономического положения и здоровья населения НИУ-ВШЭ, избыточный вес наблюдается у 32%, а ожирение - у 25% взрослого населения РФ старше 18 лет. У мужчин чаще встречается избыточный вес, чем ожирение (их процентное соотношение составляет 36,8 и 17,7% соответственно), а у женщин их доля практически равна (29,0 и 30,4% соответственно).

Наибольшее число мужчин с избыточным весом (41%) отмечается в возрасте 35-55 лет. В возрастной группе 45–55 лет выявляется максимальное число (23%) мужчин, имеющих первую и вторую степень ожирения. Доля женщин с избыточным весом достигает 32% и более, начиная с возраста 35–45 лет, а с первой и второй степенью ожирения - 35% в возрасте 45-55 лет и 48% в возрасте 55-65 лет. Ожирение третьей степени чаще встречается у

женщин, чем у мужчин и его процентное соотношение достигает 5% у женщин в возрастной категории 45-55 лет, и в дальнейшем оно увеличивается до 7,2% [Козырева П.М. и соавт., 2014].

На фоне ожирения развивается метаболический синдром - совокупность метаболических, гормональных и клинических нарушений, являющихся факторами высокого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Основным механизмом развития метаболического синдрома является инсулинорезистентность и компенсаторная гиперинсулинемия [Ройтберг Г.Е., 2007]. Основным критерием метаболического синдрома у европеоидов служит ожирение абдоминального типа, диагностируемое по окружности талии у женщин выше 80 и у мужчин - 94 см. К дополнительным критериям метаболического синдрома относятся: 1) повышенный уровень триглицеридов (>1.7 ммоль/л); 2) снижение липопротеинов высокой плотности (<1.0 ммоль/л у мужчин и <1.3 ммоль/л у женщин); 3) повышенное артериальное давление: (систолическое АД >130 или диастолическое АД >85 мм рт.ст.); 4) повышенный уровень глюкозы в плазме крови натощак (>5.6 ммоль/л) или ранее диагностированный сахарный диабет второго типа [Ройтберг Г.Е., 2007].

По эпидемиологическим данным в настоящее время распространенность метаболического синдрома в популяции колеблется от 10 до 30%. В России метаболический синдром, диагностируемый в соответствии с критериями ВОЗ, выявляется у 18,6 % мужчин до 40 лет и у 44,4 % мужчин от 40 до 55 лет. У женщин метаболический синдром встречается реже — у 7,3 % до 40 лет и у 20,8 % женщин от 40 до 55 лет [Ройтберг Г.Е., 2007].

Известно, что ожирение и, особенно ожирение центрального типа, характеризуется резистентностью к инсулину, гипергликемией, дислипидемией и артериальной гипертензией, которые способствуют развитию воспалительных реакций в кровеносных сосудах и барьерных

органах. Например, ожирение ассоциировано с повышением частоты такого заболевания как атеросклероз [Дедов И.И. и соавт., 2004; Ройтберг Г.Е., 2007]. Показано, что развитию дисфункции эндотелия и формированию атеросклеротических поражений способствуют провоспалительные адипо- и цитокины, продуцируемые жировой тканью [Денисенко А.Д., 2010]. Кроме того, с ожирением ассоциированы воспалительные заболевания ряда барьерных органов: бронхиальная астма, неалкогольный стеатогепатит, хронический панкреатит и воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта [Ройтберг Г.Е., 2007; Singh S. et al., 2013; Mohanan S. et al., 2014; Acosta A., Camilleri M., 2014]. Эти заболевания связывают с активацией иммунных и воспалительных реакций в жировой ткани [Karrasch T, Schaeffler A., 2016; Mancuso P. 2016]. Однако вопрос о механизмах, вызывающих увеличение частоты воспалительных заболеваний, сопутствующих ожирению, изучен недостаточно [Manna P., Jain S.K., 2015].

Таким образом, ожирение широко распространено среди населения многих стран. Основной причиной его развития является нарушение энергетического баланса организма, связанное с потреблением избыточного количества калорий в условиях низкой физической активности. Ожирение характеризуется избыточным развитием жировой ткани и повышением частоты развития сахарного диабета второго типа и хронических воспалительных и онкологических заболеваний.

1.2. ЖИРОВАЯ ТКАНЬ В НОРМЕ И ПРИ ОЖИРЕНИИ

Жировая ткань, ее виды и функции

Жировая ткань относится к группе соединительных тканей в которой определяются скопления адипоцитов [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Она повсеместно распределена в организме и в норме составляет около 15-20% массы тела у мужчин и 20-25% у женщин. Основными компартментами жировой ткани являются подкожная жировая клетчатка, сальник, брыжейка, забрюшинное пространство и средостение [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. У грызунов жировая ткань окружает придатки семенников. В распределении подкожной жировой клетчатки есть половые различия, обусловленные влиянием половых гормонов. Так, у мужчин жир накапливается преимущественно в верхней половине тела, а у женщин - в нижней [Ройтберг Е.Г., 2007]. Жировая ткань полностью или частично окружает различные органы (почки, глазные яблоки, лимфатические узлы, сосудисто-нервные пучки, суставы и др.) и заполняет пространства между ними. Она может замещать ткани некоторых органов после их инволюции (тимус, молочная железа, костный мозг). Известны два типа жировой ткани - белая и бурая. Однако в последние годы выделен третий тип - бежевая жировая ткань [Wu J. et al., 2012].

Белая жировая ткань у человека преобладает, она нередко имеет желтоватый оттенок из-за высокого содержания каротиноидов, растворенных в жировой капле адипоцитов. Белая жировая ткань развивается из мезенхимы, ранними предшественниками адипоцитов служат малодифференцированные фибробласты, лежащие по ходу кровеносных сосудов [Cornelius P. et al., 1994; Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Преадипоциты накапливают гликоген и липидные капли, которые сливаясь, образуют одну крупную каплю, оттесняющую цитоплазму и ядро на периферию. Поэтому адипоциты белой жировой ткани называют однокапельными [Cornelius P. et al., 1994]. Клетки белой жировой ткани имеют характерную перстневидную

форму. В первые годы жизни у человека наблюдается рост количества адипоцитов и их размеров. Окончательно число адипоцитов формируется к 10-12 годам жизни [Cornelius P. et al., 1994]. Ядро зрелого адипоцита уплощено и содержит умеренно конденсированный хроматин. Цитоплазма характеризуется наличием одной крупной жировой капли, развитой агранулярной эндоплазматической сетью, многочисленными пиноцитозными пузырьками, комплексом Гольджи, небольшим количеством митохондрий и промежуточных филаментов [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Плазмолемма содержит многочисленные инвагинации как следствие отделения эндоцитозных пузырьков. Снаружи клетки окружены ретикулярными (коллаген 3 типа) волокнами [Ross M.H., Pawlina W., 2016].

Белая жировая ткань состоит из долек (компактных скоплений адипоцитов), разделенных тонкими прослойками рыхлой соединительной ткани. Между жировыми клетками располагаются ориентированные во всех направлениях тонкие коллагеновые волокна. Кровеносные и лимфатические капилляры, располагаясь в прослойках рыхлой соединительной ткани между жировыми клетками, тесно охватывают петлями группы жировых клеток. Размеры адипоцитов и их количество у каждого человека существенно варьируют, как и количество жировой ткани в подкожном жировом слое и висцеральных полостях. Хотя адипоциты занимают основную часть объема жировой ткани, в ней также присутствуют в небольших количествах преадипоциты, макрофаги и лимфоциты [Ross M.H., Pawlina W., 2016].

Если белая жировая ткань широко распространена в организме человека, то бурая встречается в основном у новорожденных детей и животных, впадающих в зимнюю спячку [Мяделец О.Д. и соавт., 2014]. Бурый жир составляет от 2 до 6% массы тела у новорожденных, он расположен под кожей между лопатками, в шейной области, средостении, воротах почек, вдоль аорты и позвоночного столба, между скелетными мышцами и между щёчной мышцей и мимическими мышцами лица с каждой

стороны (комочки Биша), а также в большом количестве в подмышечных впадинах [Мяделец О.Д. и др., 2014; Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Характерный вид бурой жировой ткани определяют цитохромы, содержащиеся в многочисленных митохондриях.

По сравнению с белой жировой тканью васкуляризация бурой в 4–6 раз выше. Она очень хорошо иннервирована, в ней много симпатических норадренергических нервных волокон. На мембранах бурых адипоцитов находится большое количество норадреналиновых рецепторов. Несколько адипоцитов с окружающими их капиллярами и нервными волокнами составляют дольку, ограниченную соединительнотканными волокнами [Яглова Н.В., Яглов В.В., 2015; Ross M.H., Pawlina W., 2016].

Окислительная способность адипоцитов бурой жировой ткани примерно в 20 раз выше, чем адипоцитов белой жировой ткани [Мяделец О.Д. и др., 2014]. При этом большая часть энергии идет не на синтез АТФ, а на образование тепла. В бурой жировой ткани активен белок термогенин - UCP1 (Thermogenin Uncoupling Protein 1), составляющий 10% мембранных белков адипоцита [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. UCP1 разобщает процессы окисления и фосфорилирования на мембранах митохондрий, позволяя протонам возвращаться из межмембранного пространства в матрикс митохондрий [Harms M., Seale P., 2013].

Недавно открытый бежевый жир располагается у взрослого человека подкожно около ключиц и вдоль позвоночного столба [Wu J. et al., 2012]. Ранее его описывали как остатки бурого жира у взрослых, так как бежевый жир имеет в цитоплазме много митохондрий, а также не одну крупную жировую каплю, как адипоциты белой жировой ткани, а множество мелких, как адипоциты бурого жира [Яглова Н.В., Яглов В.В., 2015]. К тому же, паттерны генной экспрессии адипоцитов бежевой жировой ткани отличаются от таковых в белом и буром жире. Бежевый жир в норме характеризуется низкой экспрессией UCP1, но при повышении уровня цАМФ она

значительно увеличивается. Клетки бежевого жира также чувствительны к понижению температуры и гормону иризину и реагируют на них повышенной теплопродукцией [Harms M., Seale P., 2013; Wu J. et al., 2013].

Предшественниками бурых и белых адипоцитов являются myf5-позитивные клетки, соответственно дермальной и латеральной (периваскулярные клетки) мезодермы. Белые адипоциты могут претерпевать трансдифференцировку в промежуточную между белыми и бурыми форму – так называемые бежевые адипоциты [Harms M., Seale P., 2013]. Предполагают также, что превращению белого жира в бурый или бежевый способствует гормон иризин, выделяемый скелетной мышечной тканью при физической нагрузке [Wu J. et al., 2013; Яглова Н.В., Яглов В.В. 2015; Harms M., Seale P., 2013].

Жировая ткань как эндокринный орган

В течение длительного времени жировая ткань рассматривалась как относительно пассивное депо энергии, запасенной в виде триглицеридов. Однако жировая ткань это не только энергетическое депо, но и активный эндокринный и паракринный орган, и ее роль выходит далеко за рамки энергетического обмена [Tilg H., Moschen A.R., 2006; Ouchi N. et al., 2011]. В настоящее время известно более 100 гормонов, медиаторов и факторов роста, секретируемых жировой тканью, называемых адипокинами, которые регулируют широкий спектр метаболических и иммунных процессов [Choe S.S. et al., 2016; Ross M.H., Pawlina W., 2016]. К ним относятся лептин, адипонектин, фактор некроза опухолей α (ФНО- α), интерлейкин-6 (ИЛ-6), трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), ингибитор-1 активатора плазминогена PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor), фактор хемотаксиса моноцитов MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 или CCL2), инсулиноподобный фактор роста ИФР (Insulin-like growth factor 1, IGF-1), ангиотензиноген, эстрогены, андрогены, кортикостероиды, факторы системы

комплемента, простагландины и др. [Tilg H., Moschen A.R., 2006]. Эндокринные и метаболические свойства жировой ткани отличаются в зависимости от морфологии адипоцитов и их локализации (Шварц В., 2009). Адипоциты висцеральной жировой ткани характеризуются большей плотностью кортикостероидных и андрогенных рецепторов и относительно меньшей – рецепторов к инсулину. Это определяет высокую чувствительность висцеральной жировой ткани к липолитическому действию катехоламинов и низкую — к антилиполитическому действию инсулина [Ройтберг Е.Г., 2007]. Висцеральный жир гораздо более активен в эндокринологическом плане, чем подкожный.

Важнейшим гормоном, регулирующим метаболизм жировой ткани, является инсулин. Он оказывает влияние на секрецию адипокинов и преобразование глюкозы в триглицериды жировой капли адипоцита. Обратным действием обладает гормон глюкагон. При воздействии инсулина на инсулиновые рецепторы клеток белой жировой ткани начинается каскад дефосфорилирования, который ведет к инактивации гормонально-чувствительных липаз, кроме того, под действием инсулина активируются белки-переносчики глюкозы - ГЛЮТ-4. Кроме продуктов распада глюкозы для синтеза триглицеридов используются жирные кислоты, поступающие в адипоциты из крови. В основном это жирные кислоты, освободившиеся при гидролизе жиров из хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Жирные кислоты поступают в адипоциты, превращаются в производные КоА и взаимодействуют с глицерол-3-фосфатом, образуя сначала лизофосфатидную кислоту, а затем фосфатидную. Фосфатидная кислота после дефосфорилирования превращается в диацилглицерол, который ацилируется с образованием триглицерола [Нельсон Д., Кокс М., 2014].

Другими важными гормонами жировой ткани, участвующими в регуляции энергетического гомеостаза, являются лептин и адипонектин

[Ройтберг Е.Г., 2007; Choe S.S. et al., 2016; Divella R. et al., 2016; Mancuso P., 2016]. Лептин - пептидный гормон, отвечающий за насыщение. Он обнаружен Джеффри Фридманом [Friedman J.M. et al., 1991]. Рецепторы к лептину найдены в вентромедиальном ядре гипоталамуса, регулирующем баланс энергии в организме и аппетит, а также в печени, поджелудочной железе, надпочечниках и других органах и тканях [Ройтберг Е.Г., 2007]. Лептин стимулирует симпатическую нервную систему, что ведёт к повышению артериального давления, частоты сердечных сокращений и процессов термогенеза в жировой ткани [Divella R. et al., 2016]. В гипоталамусе лептин блокирует синтез и высвобождение нейропептида NPY (neuropeptide Y), а также угнетает синтез инсулина в поджелудочной железе. В условиях голода пониженный уровень лептина стимулирует выработку NPY, который увеличивает потребление пищи, накопление жира в адипоцитах и повышение уровня инсулина в крови. Инсулин же, связываясь с рецепторами адипоцитов, стимулирует продукцию лептина и, соответственно, снижает NPY [Wang Q. et al., 1997]. Врожденная недостаточность лептина или его рецепторов у грызунов (линии мышей ob/ob и db/db) и у человека приводит к развитию тяжёлой формы ожирения [Choe S.S. et al., 2016]. При резистентности к лептину в адипоците прекращается депонирование жирных кислот и уровень свободных жирных кислот в крови возрастает. В жировой ткани ингибируется липолиз и снижется поступление жирных кислот в кровь. В результате триглицериды аккумулируются в адипоцитах в возрастающих количествах. Разрастание жировой ткани приводит к адаптивной резистентности к инсулину и потере контроля над активностью гормон-чувствительной липазы. Процессы липолиза активируются и создаются условия для непрерывного высвобождения жирных кислот в кровь [Ройтберг Е.Г., 2007].

Адипонектин – второй важнейший гормон жировой ткани, регулирующий энергетический гомеостаз. В норме он синтезируется адипоцитами висцерального жира [Tilg H., Moschen A.R., 2006; Ross M.H.,

Pawlina W., 2016]. Уровень адипонектина в плазме крови обратно пропорционален массе жировой ткани. Адипонектин способствует поддержанию чувствительности к инсулину гепатоцитов, миоцитов и адипоцитов [Divella R. et al., 2016].

Жировая ткань тесно связана с метаболизмом стероидных гормонов, она способна их накапливать, метаболизировать и синтезировать [Ройтберг Е.Г, 2007; Ross M.H., Pawlina W., 2016]. При этом сами стероидные гормоны активно влияют на процессы липолиза и липогенеза в жировых клетках, на количество и распределение жира в организме, а также способны воздействовать на процессы пролиферации преадипоцитов [Берштейн Л.М., 1998]. Андрогены увеличивают липолитическую активность адипоцитов, а эстрогены повышают активность ферментов липогенеза. В жировой ткани ароматаза превращает андростендион и тестостерон в эстрон и эстрадиол. Особенно важен этот процесс во время менопаузы, когда продукция этих гормонов в яичниках существенно снижается [Берштейн Л.М., 1998; Ройтберг Е.Г., 2007].

Воспалительные реакции в жировой ткани при ожирении

По данным литературы при ожирении наблюдается локальная активация иммунных и воспалительных реакций, что морфологически характеризуется увеличением в жировой ткани макрофагов и лимфоцитов [Cinti S. et al., 2005; Lumeng C.N. et al., 2007; Murano I. et al. 2008; Altintas M.M. et al., 2011]. Пусковыми механизмами воспалительного процесса в жировой ткани могут быть гипоксия, обусловленная гипертрофией адипоцитов и нарушениями кровотока, бактериальные липополисахариды (ЛПС) и избыток свободных жирных кислот [Lucas S. et al., 2009; Ye J., 2011; Divella R. et al., 2016; McLaughlin T. et al., 2017].

Инициальные механизмы воспалительных реакций реализуются путем активации сложных сигнальных молекулярных каскадов, включающие

транскрипционные факторы HIF (Hypoxia-Inducible Factor, гипоксией-индуцируемый фактор) и NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, Ядерный фактор «каппа-би»), что в свою очередь приводит к повышению продукции провоспалительных цитокинов и резистентности к инсулину [McLaughlin T. et al., 2017]. На мембранах адипоцитов и макрофагов есть NOD-подобные (NOD-like receptors; NLR) и толл-подобные TLR (Toll-Like Receptors) рецепторы, которые относятся к системе врожденного иммунитета [Lumeng C.N., 2013; McLaughlin T. et al., 2017]. TLR - трансмембранные гликопротеиды, которые распознают образы патогенности PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) и эндогенные сигналы опасности DAMP (Danger-Associated Molecular Pattern) – алармины [Ярилин А.А., 2010]. В адипоцитах обнаружены почти все известные TLR от TLR-1 до TLR -9 , кроме TLR -5 [Шварц В., 2009; Karrasch T., Schaeffler A., 2016].

При ожирении высококалорийное питание, богатое жирами и углеводами, вызывает изменения состава микробиоты и повышение уровня бактериального ЛПС [Lumeng C.N., 2013; Everard A., Cani P.D., 2013]. Концентрация ЛПС в крови повышается сразу после приема пищи, богатой жирами до уровня, способного активировать макрофаги и эндотелиальные клетки [Erridge C. et al., 2007]. У мышей потребление в течение четырех недель корма с высоким содержанием жиров приводит к увеличению содержания ЛПС в сыворотке крови. Подкожные инъекции ЛПС в течение того же срока вызывают у животных повышение концентрации в крови глюкозы и инсулина, увеличение массы тела, жировой ткани и печени. Причем в обоих случаях усиливается инфильтрация жировой ткани макрофагами [Cani P.D. et al., 2007]. У людей высокий уровень ЛПС в сыворотке крови коррелирует с выраженностью висцерального ожирения и инсулинорезистентностью [Moreira A.P.B. et al. 2015; Lassenius M.I. et al. 2016].

В литературе обсуждается роль эндотоксинов, в частности ЛПС, в активации иммунных и воспалительных реакций при ожирении [Lumeng C.N. et al., 2013; Tambo A., et al., 2016]. При связывании лигандов с толл-подобными рецепторами на поверхности адипоцитов и макрофагов, например, TLR-4, запускается сигнальный путь внутриклеточных киназ (MyD88- или Trif-зависимый), что приводит к экспрессии транскрипционного фактора NF-κB и активации провоспалительных генов – цитокинов, хемокинов и многих других [Ярилин А.А., 2010; Cani P.D. et al., 2007; Lumeng C.N., 2013]. Активация киназ вызывает фосфорилирование субстрата рецептора инсулина IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) по остатку серина, а не тирозина, блокируя передачу инсулинового сигнала, что способствует развитию инсулинорезистентности [Николаев А.Я., Осипов Е.В., 2012; Choe S.S. et al., 2016; McLaughlin T. et al., 2017].

Кроме ЛПС лигандом TLR-4 могут быть свободные жирные кислоты (СЖК) и их метаболиты [Вельков В.В., 2010; Shi H. et al., 2006; McLaughlin T. et al., 2017]. Другим рецептором для СЖК могут быть TLR-2 [Donath M.Y., Shoelson S.E., 2011]. СЖК представляют собой главный энергетический субстрат организма. Они образуются в процессе липолиза триглицеридов тканевой липазой в адипоцитах. Активация липазы осуществляется через аденилатциклазную систему. Важным источником СЖК в крови служит гидролиз липопротеиновой липазой триглицеридов, содержащихся в липопротеинах [Вельков В.В., 2010; Шварц В., 2013; Shi H. et al., 2006]. При ожирении вследствие избыточного поступления в организм энергетических субстратов, их накопления, хронического стресса и недостатка физической активности повышается уровень метаболитов жирных кислот и глюкозы. Метаболиты жирных кислот включают диацилглицерин, церамиды, стеариновые кислоты и реактивные формы кислорода [Вельков В.В., 2010; Choe S.S. et al., 2016]. Они реализуют провоспалительное действие несколькими путями: 1) взаимодействуя непосредственно с внутриклеточными киназами, такими как протеинкиназы C - PKCs (Protein

Kinase C), c-Jun-N-терминальная киназа - JNK (c-Jun N-terminal Kinase), ингибитор киназы каппа В - IKK (Inhibitor of Kappa B Kinase); 2) активируя рецепторы клеток, например TLR4; 3) вызывая оксидативный стресс и стресс эндоплазматического ретикулума, что также приводит к активации воспалительных киназ JNK и IKK [McMurray F. et al., 2016; Шварц В., 2013; Choe S.S. et al, 2016]. Активация IKK, JNK, PKC приводит к высвобождению нуклеарного фактора транскрипции NF-κB [Ярилин А.А., 2010; Шварц В., 2013].

Ядерный фактор «каппа-би» (NF-κB) – ключевой провоспалительный транскрипционный регулятор. Он относится к семейству провоспалительных транскрипционных факторов, играющих роль в многочисленных клеточных процессах и развитии воспалительных заболеваний у человека [Lin N., Simon M.C., 2016]. Члены семейства NF-κB могут формировать несколько комбинаций гомо- и гетеродимеров, в соответствии с которыми активируется комплекс регуляторных механизмов, что приводит к активации или репрессии сотни генов [Corcoran S.E., O'Neill L.A., 2016]. Многие из этих генов вовлечены в иммунный ответ. Это гены адипокинов и цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1, ИЛ-6), хемокинов MCP-1 и MIF (macrophage migration inhibition factor), мембранных рецепторов, ингибиторов и активаторов апоптоза и др. [Lucas S. et al., 2009; Ye J., 2011; Choe S.S. et al., 2016].

При ожирении избыточное накопление триглицеридов в составе жировой капли адипоцита приводит к значительному увеличению объема клетки. В связи с гипертрофией адипоцитов плотность микроциркуляторного русла и интенсивность кровотока снижается, что сопровождается развитием локальной гипоксии [Hosogai N., 2007; Blüher M., 2009]. При гипоксии в жировой ткани наблюдается активация транскрипционных факторов HIF и NF-κB [Ye J., 2011; Choe S.S. et al., 2016].

Семейство транскрипционных факторов HIF играет ключевую роль в регуляции экспрессии генов и механизмов молекулярного ответа на

гипоксию, и они обнаруживаются во всех клетках и тканях [Semenza G.L., 2009]. Установлено свыше 100 HIF-1 зависимых генов, контролирующих транспорт и метаболизм глюкозы, ангиогенез, тонус сосудов, эритропоэз, клеточный цикл и дифференцировку [Semenza G.L., 2009]. Известно, что экспрессия HIF-1 усиливается в жировой ткани у пациентов с ожирением. В культуре адипоцитов при гипоксии нарушается продукция адипокинов [Hosogai N. et al., 2007, Ye J., 2011; Choe S.S. et al., 2016]. Локальная гипоксия жировой ткани активирует транскрипционный фактор HIF-1, что приводит к повышению образования лептина и провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-6, ингибитора активатора плазминогена PAI-1, фактора ангиогенеза VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), угнетению продукции адипоцитами адипонектина и повышению генерации свободных радикалов, повреждающих адипоциты [Corcoran S.E., O'Neill L.A.J., 2016; Divella R. et al., 2016]. При дальнейшем развитии гипоксии возможен индуцированный ишемией некроз адипоцитов (Corcoran S.E., O'Neill L.A.J., 2016; Divella R. et al., 2016]. Таким образом, гипоксия является одним из важных триггеров развития воспалительного процесса в жировой ткани.

Одним из основных противовоспалительных адипокинов является адипонектин [Divella R. et al., 2016; Choe S.S. et al., 2016]. Его активность и количество снижается при висцеральном ожирении в отличие от лептина, резистина, интерлейкинов, ФНО- α и других адипокинов [Ouchi N. et al., 2011; Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Показано, что снижение экспрессии адипонектина коррелирует с инсулинорезистентностью [Choe S.S. et al., 2016]. Адипонектин тормозит дифференцировку преадипоцитов и оказывает противовоспалительный и антиатерогенный эффекты [Divella R. et al., 2016]. Также известно, что адипонектин угнетает TLR-зависимое высвобождение NF- κ B и ингибирует продукцию ФНО- α , стимулированную ЛПС [Divella R. et al., 2016; Choe S.S. et al., 2016].

Следует отметить, что количество продуцируемых жировой тканью провоспалительных цитокинов прямо пропорционально размеру адипоцитов, и увеличивается по мере прогрессирования ожирения [Choe S.S. et al, 2016; Mancuso P., 2016]. На начальной стадии воспалительного процесса в жировой ткани источником провоспалительных цитокинов являются гипертрофированные адипоциты, далее они секретируются в основном макрофагами, количество которых в жировой ткани значительно увеличивается в процессе развития ожирения [Cinti S. et al. 2005; Lumeng C.N., 2007; Murano I. et al., 2008; Altintas M.M. et al., 2011].

Лептин это основной провоспалительный адипокин, продукция которого возрастает пропорционально увеличению массы белой жировой ткани [Choe S.S. et al., 2016; Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Лептиновые рецепторы экспрессируются практически всеми иммунными клетками. При их активации запускается внутриклеточный сигнальный путь с участием тирозинкиназы JAK2 (Janus kinase 2), активатора транскрипции STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) и митоген-активируемой протеинкиназы MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), которые активируют ответ системы врожденного иммунитета. Лептин способствует продукции провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18 и ФНО- α), хемокинов (MCP1) и липидных медиаторов - простагландина E2 (PGE2), цистеинил лейкотриена (CysLTs) и лейкотриена B4 (LTB4) - моноцитами периферической крови и резидентными тканевыми макрофагами у мышей и людей [Mancuso P., 2016]. Лептин индуцирует дифференцировку моноцитов в макрофаги и продукцию макрофагами, нейтрофилами и эндотелиальными клетками реактивных форм кислорода, а также усиливает экспрессию синтазы оксида азота, индуцированную ИФН- α [Mancuso P., 2016]. Также, показано, что лептин активирует сигнальный путь TLR-4 и повышает экспрессию рецепторов TLR-2 и TLR-4 и их внутриклеточные сигнальные пути [Шварц В., 2009; Ouchi N. et al., 2011].

R. Divella и соавт. (2016) назвали группу цитокинов, включающую ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6, «триадой воспаления». Это провоспалительные цито- и адипокины с широким спектром активности. Они продуцируются адипоцитами, активированными моноцитами и макрофагами. Их концентрация в крови увеличивается пропорционально нарастанию массы висцеральной жировой ткани и инсулинорезистентности [Tilg H., Moschen A.R., 2006; Ouchi N. et al., 2011]. Основной ролью ИЛ-1 и ИЛ-6 является мобилизация воспалительного ответа. Они индуцируют усиление кислородного метаболизма клеток, экспрессию цитокинов, их рецепторов и других факторов воспаления [Ярилин А.А., 2010]. ФНО- α снижает активность тирозинкиназы инсулинового рецептора и тормозит экспрессию внутриклеточных переносчиков глюкозы ГЛЮТ-4 в мышечной и жировой ткани [Ouchi N. et al., 2011; Tilg H., Moschen A.R., 2006]. В жировой ткани NF- κ B снижает экспрессию адипонектина и стимулирует секрецию лептина [Divella R. et al., 2016].

Эффекты «воспалительной триады» включают: 1) блокирование инсулиновых рецепторов адипоцитов, что способствует развитию инсулинорезистентности; 2) снижение синтеза липопротеиновой липазы капилляров, которое приводит к невозможности ферментативного разрушения липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и повышает содержание триглицеридов и холестерина в крови; 3) увеличение чувствительности гормонально-зависимой липопротеиновой липазы адипоцитов и увеличение продукции адипоцитами СЖК, что приводит к повышению содержания СЖК в кровотоке; 4) сосудистые воспалительные реакции, с повышением экспрессии эндотелиоцитами молекул клеточной адгезии - внутриклеточной ICAM (Inter-Cellular Adhesion Molecule) и васкулярной VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) и факторов ангиогенеза VEGF [Divella R. et al., 2016].

Резистин и сходные с ним молекулы представляют собой семейство белков, принимающих участие в процессах воспаления и развития устойчивости к действию инсулина. Резистин – гормон жировой ткани, который является антагонистом инсулина и подавляет сигнала от рецепторов инсулина и, соответственно, всасывание глюкозы [Tilg H., Moschen A.R., 2006; Ouchi N. et al., 2011]. Провоспалительный эффект резистина реализуется через его рецептор CAR1 (Cyclase-associated Adenylyl Protein 1) что приводит к активации цАМФ-зависимой протеинкиназы А - PKA (protein Kinase A) и транскрипции провоспалительных цитокинов через NF-κB сигнальный путь [Mancuso P., 2016].

Другим провоспалительным адипокином, продуцируемым жировой тканью, является PAI-1, который относится к семейству ингибиторов сериновых протеаз и является основным регулятором фибринолитической системы [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Он связывает и тормозит активатор плазминогена тканевого типа и активатор плазминогена урокиназы, регулирующих эндогенный фибринолиз, и оказывает влияние на процессы ангио- и атерогенеза [Дедов И.И. и соавт., 2006].

Фактор хемотаксиса моноцитов MCP-1 (CCL2) является одним из основных провоспалительных хемокинов, обеспечивающих миграцию макрофагов в очаг воспаления [Deshmane S.L., 2009]. Он синтезируется адипоцитами и макрофагами. Индукторами экспрессии MCP-1 через активацию NF-κB являются различные провоспалительные агенты: ФНО-α, ЛПС, ИЛ-1, ИНФ-γ [Mancuso P., 2016]. Сходным действием обладает CXCL5 (C-X-C Motif Chemokine 5), экспрессируемый макрофагами жировой ткани [Mancuso P., 2016; McLaughlin T. et al., 2017]. Фактор, ингибирующий миграцию моноцитов (MIF), также является провоспалительным цитокином и проявляет свойства хемокина. Он секретируется широким спектром клеток, в том числе и адипоцитами. MIF вовлечен в процессы аккумуляции макрофагов в жировой ткани, активации киназ JNK и IKKβ, высвобождении

NF-κB и активации провоспалительных цитокинов [Mancuso P., 2016; McLaughlin T. et al., 2017].

В жировой ткани при ожирении меняется состав клеток: увеличивается количество провоспалительных макрофагов M1 типа, CD8+ Т-лимфоцитов, Th1 Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных киллеров и нейтрофилов, а содержание противовоспалительных макрофагов M2 типа, регуляторных Т-клеток и эозинофилов снижается [Mancuso P., 2016; Winer D.A. et al., 2016]. В норме жировая ткань содержит 4% макрофагов у людей и 10-15% у мышей, но при ожирении их доля увеличивается до 12% и 40-60% соответственно, так как наряду с резидентными макрофагами, в жировую ткань мигрируют моноциты, циркулирующие в кровотоке [Schipper H.S., 2012; McLaughlin T. et al., 2017]. Причем известно, что у человека и грызунов количество макрофагов в жировой ткани коррелирует с инсулинорезистентностью [Weisberg S.P. et al., 2003; Lumeng C.N et al., 2007; Lumeng C.N et al., 2014].

Макрофаги представляют собой крупные полиморфные клетки. Их основной ролью является поддержание тканевого гомеостаза. Они выполняют роль главных тканевых фагоцитов, являются источником разнообразных цитокинов, участвуют в реакциях воспаления, выполняют роль антиген-презентирующих клеток адаптивного иммунитета [Ярилин А.А., 2010]. Среди макрофагов различают две фенотипические группы – «классически активированные» провоспалительные M1 и «альтернативно активированные» противовоспалительные M2-макрофаги [Lumeng C.N. et al., 2014; McLaughlin T. et al., 2017]. Однако показано, что при ожирении существуют макрофаги смешанного M1/M2 фенотипа, по экспрессии поверхностных рецепторов сходные с M2 фенотипом, но вырабатывающие большое количество провоспалительных цитокинов -ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-1 и MCP-1 [Лямина С.В., Малышев И.Ю. 2014; Sica A, Mantovani A., 2012; McLaughlin T. et al., 2017].

«Классически активированные» провоспалительные M1 макрофаги связаны с Tх1-поляризованным иммунным ответом, повреждением тканей и воспалением [Mancuso P., 2016]. В культуре активация макрофагов по M1 типу развивается в ответ на стимуляцию ИФН- γ , ФНО- α и ЛПС. Активированные макрофаги образуют большое количество активных форм кислорода и оксида азота, которые обуславливают их цитотоксическую активность [Монастырская Е.А., 2008]. Кроме этого, в них увеличивается экспрессия многочисленных генов, ответственных за синтез провоспалительных хемокинов и цитокинов, включая «триаду воспаления». Другой способ активации макрофагов связан с действием цитокинов, выделяемых Т-хелперами 2 типа [Mancuso P., 2016]. После такой активации макрофаги приобретают фенотип, отличающийся от фенотипа классически активированных макрофагов. «Альтернативно активированные» противоспалительные M2-макрофаги ассоциируют с ангиогенезом и заживлением ран [Монастырская Е.А., 2008; Lumeng C.N. et al., 2007; Oliveira A.G. et al., 2013]. M2 макрофаги ингибируют Tх1-ответ, усиливают антиген-презентирующую функцию и эндоцитоз, а также ингибируют Т-клеточную пролиферацию, стимулируют пролиферацию фибробластов и их способность к синтезу коллагена. Выделяют 3 типа «альтернативно активированных» макрофагов: M2a, M2b, M2c, среди которых M2a (индуцируемые ИЛ-4 и ИЛ-13) и M2b (индуцируемые ЛПС и ИЛ-1) выполняют регуляторные функции, а M2c (индуцируемые ИЛ-10 и TGF β) играют главную роль в процессах восстановления тканей и подавления воспалительных реакции [Шишкина В.С. и соавт., 2015].

Макрофаги у людей и животных с нормальной массой тела рассеяны в жировой ткани диффузно, а при ожирении - образуют скопления [Murano I. et al., 2008]. Скопления макрофагов и экстрацеллюлярного матрикса, окружающие гибнущие адипоциты, описывают как «crown-like structures» (CLS) – короноподобные структуры [Weisberg et al., 2003; Murano I. et al., 2008; Divella R. et al., 2016]. Появление CLS характерно для процессов

воспаления в жировой ткани у человека и грызунов [Cinti S., 2005; Spencer M. et al., 2010]. В коронеподобных структурах преобладают макрофаги M1 типа [Sica A., Mantovani A., 2012; McLaughlin T. et al., 2017]. Однако показано, что кроме макрофагов в этих структурах в жировой ткани при ожирении могут присутствовать также В- и Т-лимфоциты [Oishi Y., Manabe I., 2016; McLaughlin T. et al., 2017].

Соотношение различных типов Т-лимфоцитов является важным регулятором гомеостаза жировой ткани и воспалительных реакций [Oishi Y., Manabe I., 2016]. Количество Т-лимфоцитов фенотипа CD8⁺ и CD4⁺ увеличивается у мышей и людей с ожирением в жировой ткани, а количество провоспалительных Th17 лимфоцитов повышается при сахарном диабете 2 типа и у людей с метаболическими нарушениями при ожирении. В висцеральной жировой ткани у мышей с ожирением повышается содержание провоспалительных Т-хелперов 1, количество Т-хелперов 2 и натуральных киллеров (NK) снижается, а Т-хелперов 17 (Th17) и регуляторных Т-клеток (Treg) либо снижается, либо не изменяется [Ip B.C. et al., 2015]. Количество В-лимфоцитов в жировой ткани у мышей при ожирении также повышается [Arai S., 2013; Ip B.C. et al., 2015]. У мышей на рационе с высоким содержанием жиров в жировой ткани в коронеподобных структурах обнаруживаются как В-лимфоциты, так и иммуноглобулины -IgG и IgM [Capasso M. et al., 2015].

Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов в системной циркуляции при ожирении недостаточно изучены. Однако известно, что у пациентов с ожирением, и метаболическими нарушениями и при сахарном диабете 2 типа повышается содержание провоспалительных Т-хелперов 1 и 17. У людей с высоким ИМТ - количество Т-лимфоцитов CD4⁺, Т-хелперов 2 и регуляторных Т-клеток (Treg) так же увеличивается, а число В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов CD8⁺ не изменяется [Ip B.C., 2015]. Однако в сыворотке

крови у мышей с ожирением показано повышение концентрации IgM и IgG [Arai S., 2013].

Таким образом, при ожирении иммунные и воспалительные реакции в жировой ткани инициируются активацией рецепторов системы врожденного иммунитета и сигнальных каскадов NF- κ B и HIF с последующей секрецией огромного количества регуляторных молекул: адипокинов, цитокинов, хемокинов, факторов роста и других, и миграцией и активацией клеток врожденного и адаптивного иммунитета – макрофагов и лимфоцитов (рис. 1).

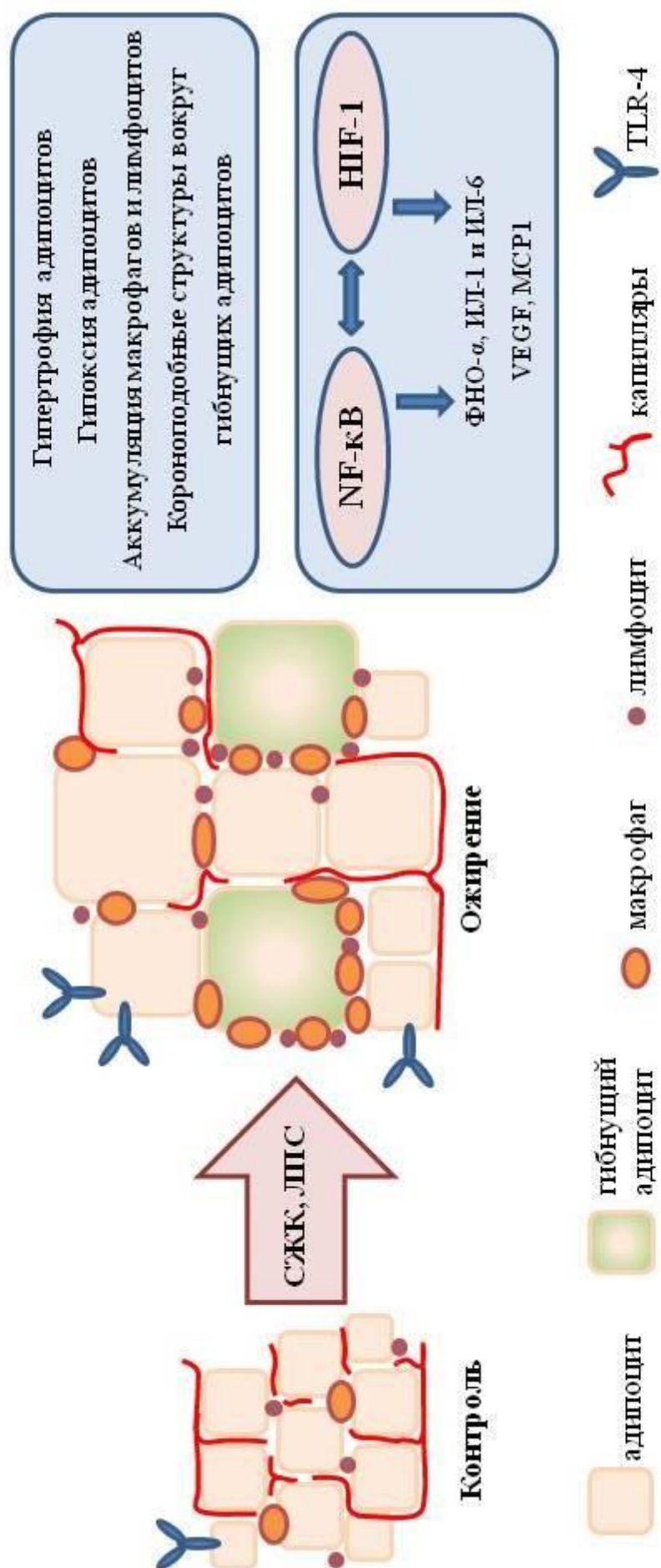


Рисунок 1. Основные механизмы активации воспалительных реакций при ожирении.

1.3. Модели ожирения

Существуют различные стратегии моделирования ожирения у лабораторных животных, которые можно разделить на 2 основные группы – генетические и основанные на изменении рациона. К наиболее распространенным генетическим моделям относится ожирение у мышей ob/ob с дефектом гена лептина и животных с недостатком или дефектом лептиновых рецепторов – мышей db/db и крыс Цукера [Gajda A.M. et al., 2007; Nilsson C. al., 2012; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. Эти моногенные модели удобны для исследования генетических аспектов заболеваний, связанных с нарушением энергетического гомеостаза - ожирения, сахарного диабета и метаболического синдрома, а также доклинической оценки эффективности лекарственных препаратов для коррекции гиперинсулинемии, инсулинорезистентности и гиперфагии. У человека генетические нарушения, связанные с дефектом гена лептина или его рецепторов, встречаются крайне редко [Nilsson C. et al., 2012].

Модели алиментарного ожирения основаны на увеличении калорийности рациона экспериментальных животных и изменении его состава по макронутриентам, что, в целом, соответствует основной причине развития ожирения у человека - несбалансированному высококалорийному питанию [Лещенко Д.В. и соавт., 2015; Nilsson C. et al., 2012]. Для моделирования ожирения у экспериментальных животных используют рационы с высоким содержанием углеводов и жиров по отдельности или в сочетании, а также рационы, имитирующие пищевые предпочтения человека, например, «диета кафетерия» [Kennedy A.J. et al., 2010; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. Для обогащения рациона экспериментальных животных углеводами используют сахарозу, глюкозу и фруктозу. Многие исследователи для моделирования ожирения у грызунов применяют рационы, обогащенные только углеводами, например, фруктозой [Решетняк М.В. и соавт., 2011; Sleder J. et al., 1980] или сахарозой [Toida S. et al., 1996;

Boqué N. et al., 2009; Malafaia A.B. et al., 2013]. Высокое потребление рафинированных углеводов, и в особенности фруктозы, способствует развитию инсулинорезистентности, гипертриглицеридемии и жировой дистрофии печени, а также стимулирует липогенез и повышение уровня свободных жирных кислот в плазме крови [Gajda A.M. et al., 2007; Лещенко Д.В. и соавт., 2015]. Моносахарид фруктоза и содержащие ее продукты (дисахарид сахароза, глюкозо-фруктозный «кукурузный» сироп) входят в состав многих пищевых продуктов, причем потребление фруктозы за период с 1986 по 2007 год возросло на 16% [Rippe J.M., Angelopoulos T.J., 2012]. Метаболические пути фруктозы и глюкозы в печени различаются [Марри Р. И соавт., 1993; Sievenpiper J.L. et al., 2014]. Фруктоза попадает в клетки печени с помощью переносчиков ГЛЮТ-2 и ГЛЮТ-5, где фосфорилируется фруктокиназой, за счет чего минует характерную для метаболизма глюкозы лимитирующую стадию, на которой осуществляется контроль скорости катаболизма глюкозы. Дальнейшие производные фруктозы могут вступить в гликолиз либо стать субстратом для *de novo* липогенеза. В результате фруктоза усиливает в печени метаболические процессы, ведущие к синтезу жирных кислот, их эстерификации и образованию липопротеинов очень низкой плотности; в итоге это приводит к увеличению концентрации триглицеридов в плазме крови [Марри Р.И соавт., 1993; Sievenpiper J.L. et al., 2014]. Таким образом, хотя потребление фруктозы напрямую не вызывает повышения секреции инсулина и лептина, фруктоза в большей степени чем глюкоза усиливает синтез триглицеридов и холестерина в гепатоцитах, оказывает значительное влияние на обмен глюкозы и липидов и активирует липогенез в печени [Windemuller F. et al., 2016].

Другой стратегией моделирования ожирения является использование рациона с высоким содержанием жиров [Chang S. al., 1990; Dobrian A.D. et al., 2000; Ghibaudi L. et al., 2002; Buettner R. et al., 2006; De La Serre C.B. et al., 2010; Teixeira L.G. et al., 2011; Lutz T.A., Woods S.C., 2012]. Обычный рацион крыс и мышей включает 20-30% белка, 60-70% углеводов и всего 3-

10% жира [Лещенко Д.В. и соавт., 2015]. При моделировании ожирения рацион экспериментальных животных обогащают жирами на 10-60% (по калорийности), но наиболее распространенным вариантом считается высокожировой рацион, содержащий 30-50% жира [Gajda A.M. et al., 2007; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. У большинства млекопитающих диета с высоким содержанием жира приводит к увеличению массы тела и вызывает развитие ожирения [Buettner R. et al., 2006]. Кроме того, потребление избыточного количества жиров обуславливает снижение экспрессии инсулиновых рецепторов, ингибирование окисления жирных кислот, уменьшение количества клеточных переносчиков глюкозы и нарушение их транслокации через мембрану, что приводит к развитию инсулинорезистентности, гиперинсулинемии и нарушения толерантности к глюкозе. Морфологические изменения внутренних органов при использовании рациона с высоким содержанием жиров характеризуются гипертрофией и фиброзом миокарда и жировой дистрофией печени [Лещенко Д.В. и соавт., 2015]. При обогащении рациона жирами различного происхождения развитию ожирения, инсулинорезистентности и стеатоза печени в большей степени способствуют такие источники насыщенных жиров, как сало, кокосовое и пальмовое масло [Buettner R. et al, 2006; Gajda A.M. et al., 2007; Angelova P., Boyadjiev N., 2013].

Наиболее адекватными и имитирующими особенности питания человека являются комбинированные рационы с высоким содержанием и углеводов, и жиров [Gajda A.M. et al., 2007; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. Для создания высококалорийной комбинированной диеты используют разные виды углеводов/жиров и их разное процентное соотношение [Греков Е.А. и соавт., 2012; Карповец Т.П. и соавт, 2013; Boqué N. et al., 2009; Axelsen L.N. et al., 2010; Sampey B.P. et al., 2011]. «Диета кафетерия», имитирующая «западную диету» («Western diet»), предполагает дополнение к стандартному корму лабораторных животных или его полную замену на разнообразные продукты питания человека, богатые жирами и углеводами – сыр, чипсы,

шоколад, печенье и др. в неограниченном количестве [Li H. et al., 2008; Lutz T.A., Woods S.C., 2012]. Использование такого рациона, более разнообразного, чем пеллетированный корм, провоцирует у лабораторных животных гиперфагию, и как следствие, приводит к значительному увеличению массы тела, нарушению обмена глюкозы и провоспалительной активации клеток белой жировой ткани [Sampey B.P. et al., 2011]. «Диета кафетерия» в отличие от комбинированных рационов, основанных на пеллетированном корме коммерческого производства, несбалансирована по составу макро- и микроэлементов и витаминов, что соответствует особенностям питания человека (например, «фаст-фуд»), способствующего развитию таких многофакторных заболеваний, как ожирение и метаболический синдром.

Виды и линии лабораторных животных, используемых для моделирования ожирения и метаболического синдрома, разнообразны. Однако чаще всего используют мелких лабораторных грызунов - мышей или крыс – в связи с их доступностью и относительно дешевым содержанием [Gajda A.M. et al., 2007; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. Ряд авторов моделировали ожирение на мышах, потреблявших корм с высоким содержанием жиров в течение 8-14 недель [Li H. et al., 2008; Akagiri S. et al., 2008; Teixeira L.G. et al., 2011; Reichardt F.H. et al., 2013]. Другие авторы моделировали ожирение на крысах линии Вистар и использовали различные рационы питания в течение 4-15 недель [Chang S. et al., 1990; Toida S. et al., 1996; Boqué N. et al., 2009; De La Serre C.B. et al., 2010; Sampey B.P. et al., 2011; Malafaia A.B. et al., 2013; Leopoldo A.S. et al., 2016].

В работах, выполненных на крысах линии Спрейг-Доули, авторы применяли рационы с высоким содержанием жиров (от 32 до 45%), декстрозы или фруктозы (66%) и комбинированный рацион, обогащенный углеводами (фруктозой) и жирами. Длительность эксперимента варьировала от 12 до 15 недель [Sleder J. et al., 1980; Dobrian A.D. et al., 2000; Deng J-Y. et

al., 2007; De La Serre C.B. et al. 2010]. Только в двух работах авторы использовали более длительные сроки эксперимента - 24 и 48 недель [Ggibaudi L. et al., 2002; Axelsen L.N. et al., 2010].

При моделировании ожирения на крысах линии Спрейг-Доули традиционно проводится отбор животных, устойчивых к высококалорийному рациону (“Resisters” или “Diet Resistant”, DR rats) и неустойчивых - крыс с ожирением (“Gainers” или “Diet Induced Obesity”, DIO rats). Показано, что ожирение развивается только у 50% крыс линии Спрейг-Доули, в то время как у остальных экспериментальных животных (DR-фенотипа) на высококалорийном рационе масса тела и биохимические показатели увеличивались не больше, чем в контрольной группе [Lauterio T.J. et al., 1994; Levin B.E. et al., 1997; Dobrian A.D. et al., 2000; De La Serre C.B. et al., 2010]. Ожирение у крыс Спрейг-Доули DIO-фенотипа характеризуется значительным увеличением массы тела, полигенной природой, резистентностью к инсулину, повышением концентрации глюкозы и лептина в сыворотке крови. Эта модель адекватна алиментарному ожирению у человека. Крысы линии Вистар, потребляющие рацион с высоким содержанием жиров, так же как крысы Спрейг-Доули и люди реагируют на высококалорийный рацион полиморфно и имеют разную чувствительность к инсулину и массу тела [Chang S. et al., 1990; Leopoldo A.S. et al., 2016].

Таким образом, в работах, выполненных на экспериментальных моделях, сроки воспроизведения ожирения и метаболического синдрома значительно варьируют от 4х до 48 недель [Sleder J. et al., 1980; Axelsen L.N. et al., 2010]. Однако даже при небольшой длительности эксперимента (10-15 недель) авторам удавалось воспроизвести у крыс и мышей метаболический синдром, характеризующийся ожирением, гипертриглицеридемией, гипергликемией, нарушением толерантности к глюкозе и артериальной гипертензией [Dobrian A.D. et al., 2000; Boqué N. et al., 2009; Leopoldo A.S. et al., 2016]. Следует отметить, что только в нескольких работах проводилось

морфологическое исследование некоторых внутренних органов – почек, сердца, печени или поджелудочной железы, причем в основном в кратковременных исследованиях длительностью не более 15 недель [Dobrian A.D. et al., 2000; Deng J-Y. et al., 2007; Axelsen L.N. et al., 2010; Teixeira et al. L.G., 2011; Sampey B.P. et al., 2011]. Ни в одном из исследований не было проведено комплексного морфологического исследования, включающего жировую ткань, печень, поджелудочную железу, предстательную железу, почки, легкие и толстую кишку при длительном применении рациона с высоким содержанием жиров и углеводов.

С целью моделирования ожирения используются рационы с повышенным содержанием жиров, углеводов или их сочетанием. Наиболее адекватным рационом для моделирования ожирения является сочетание повышенного содержания в рационе углеводов и жиров, что соответствует западной «фаст-фуд» диете у человека.

Ожирение моделируется на разных линиях мышей и крыс, но среди них наиболее предпочтительной является линия крыс Спрейг-Доули, которые в процессе развития ожирения делятся на два фенотипа - устойчивые (DR-фенотип) и неустойчивые (DIO-фенотип). В большинстве работ сроки воспроизведения ожирения небольшие и составляют 8-15 недель. В эти сроки развиваются, главным образом, отдельные изменения характерные для метаболического синдрома – инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, триглицеридемия и увеличение массы тела. Относительно короткие сроки моделирования ожирения недостаточны для развития патологических изменений внутренних органов.

1.4. ГИСТОФИЗИОЛОГИЯ ТОНКОЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ В НОРМЕ И ПРИ ОЖИРЕНИИ

Гистофизиология тонкой и толстой кишки как барьерных органов в норме

Кишечник — это барьерный орган, который находится на границе внутренней и внешней среды организма [Roda G. et al., 2010; Mowat A.M., Agace W.W., 2014]. В тонкой кишке питательные вещества подвергаются ферментативной обработке и всасываются. Толстая кишка выполняет функцию абсорбции воды из химуса, формирование каловых масс и экскрецию различных веществ [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Кишечник, и особенно толстая кишка, заселены большим количеством микроорганизмов. Микрофлора кишечника способствует поддержанию биохимического, метаболического и иммунного равновесия организма [Yang J.Y., Kweon M.N., 2016]. Кишечник является не только физиологическим препятствием на пути поступления антигенов в кровь и ткани организма, но в нем также активно функционирует локальный компартмент системы врожденного и приобретенного иммунитета [Silva F.A.R. et al., 2016; Winer D.A. et al., 2017].

Стенка полых органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), включая тонкую и толстую кишку, состоит из внутренней слизистой оболочки (*tunica mucosa*), подслизистой основы (*tela submucosa*), мышечной (*tunica muscularis*) и наружной оболочки, которая представлена либо серозной (*tunica serosa*), либо адвентициальной оболочкой (*tunica adventitia*). Слизистая оболочка в свою очередь состоит из эпителия, собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО) и мышечной пластинки слизистой оболочки [Mowat A.M., Agace W.W., 2014; Ross M.H., Pawlina W., 2016].

Эпителий тонкой и толстой кишки однослойный призматический, он содержит несколько основных популяций эпителиальных клеток и межэпителиальные лимфоциты. Столбчатые эпителиоциты в тонкой кишке и

колоноциты в толстой составляют основную массу эпителиального пласта и обеспечивают всасывание и транспорт питательных веществ, воды и электролитов. Секреторные эпителиальные клетки представлены бокаловидными клетками, клетками Панета и энтероэндокринными клетками. В зонах лимфоэпителиальных фолликулов эпителиальная выстилка образована М-клетками [Roda G. et al., 2010, Mowat A.M., Agace W.W., 2014].

Бокаловидные клетки (экзокриноциты) секретируют нейтральные и кислые гликопротеины (муцины), являющиеся основными компонентами кишечной слизи. Число их увеличивается по направлению от двенадцатиперстной кишки к толстой, где они составляют около 50% всех эпителиальных клеток [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Бокаловидные клетки формируют на поверхности слизистой оболочки покровный вязко-эластический слой слизи, который способствует продвижению химуса, участвует в процессах пристеночного пищеварения, препятствует повреждению эпителия и составляет основу биопленки для пристеночной микрофлоры. В тонком кишечнике слизь образует один, а в толстом - два слоя [Золотова Н.А., Макарова О.В., 2014; Roda G. et al., 2010; Peterson L.W., Artis D., 2014].

Клетки Панета или апикально-зернистые экзокриноциты с ацидофильными гранулами секретируют лизоцим, α -дефенсины, фосфолипазу A2 и многие другие молекулы, которые оказывают антибактериальное и провоспалительное действие и регулируют рост бактериальной флоры тонкой кишки [Mowat A.M., Agance W.W., 2014]. У человека клетки Панета присутствуют только в тонком кишечнике.

Энтероэндокринные клетки входят в состав диффузной эндокринной эпителиальной системы и присутствуют во всех отделах кишечника. Они выделяют биогенные амины и пептидные гормоны, реализуя широкий диапазон биологических реакций. К ним относятся серотонин, холецистокин,

секретин, глюкозозависимый инсулиотропный пептид, мотилин и др. [Яглов В.В., Яглова Н.В., 2012].

М-клетки располагаются на поверхности пейеровых бляшек и одиночных лимфоидных узелков тонкой кишки. Они захватывают различные антигены из просвета кишки и участвуют в их презентации макрофагам, дендритным клеткам и В-лимфоцитам [Peterson L.W., Artis D., 2014].

Межэпителиальные лимфоциты (МЭЛ) являются одним из компонентов мукозальной иммунной системы MALT (mucosa associated lymphoid tissue). Для них характерна экспрессия Т-клеточных рецепторов TCR двух типов – TCR $\gamma\delta$ и TCR $\alpha\beta$ [Mowat A.M., Agance W.W., 2014; Peterson L.W., Artis D., 2014; Qiu Y. et al., 2014]. Лимфоциты, экспрессирующие $\alpha\beta$ Т-клеточные рецепторы, преобладают и характеризуются фенотипом CD8 $\alpha\beta$ или CD4. Другая популяция межэпителиальных лимфоцитов не экспрессирует CD8 $\alpha\beta$, но для нее характерны коэкспрессия CD8 $\alpha\alpha$ и TCR $\gamma\delta$ или TCR $\alpha\beta$ [Mowat A.M., Agance W.W., 2014]. МЭЛ могут продуцировать ИФН- γ и различные интерлейкины, способствуя развитию воспалительных реакций в слизистой оболочке кишечника [Cheroutre H. et al., 2011].

Прилежащая к эпителиальной выстилке СПСО представлена рыхлой соединительной тканью, содержащей кровеносные и лимфатические капилляры и нервные волокна [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. Среди клеточных элементов в СПСО преобладают фиброциты, фибробласты, лимфоциты, плазматические клетки, в небольшом количестве встречаются макрофаги, нейтрофилы и тучные клетки. Лимфоциты в СПСО – это В-клетки, Т-клетки (CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ в соотношении 2:1) и небольшое количество НК-клеток - естественных киллеров [Mowat A.M., Agance W.W., 2014]. CD4 $^{+}$ Т-клетки в СПСО очень разнообразны и включают подклассы Т-хелперов-1 ИЛ-2 $^{+}$, ИЛ-2 $^{+}$ ИФН γ^{+} , ИФН γ^{+} и Т-хелперов 17, а также ИЛ-10 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ и FOXP3 $^{-}$ регуляторные Т-клетки. Количество T γ 17 лимфоцитов у мышей снижается в направлении от тонкой кишки к толстой, а число регуляторных

Т-лимфоцитов – возрастает и достигает наибольших значений в толстой кишке. В толстом кишечнике преобладают CD4 положительные лимфоциты, экспрессирующие ИЛ-10. У людей в подвздошной и толстой кишке по сравнению с тощей преобладают Т-клетки фенотипа CD4+ИЛ-17+ [Mowat A.M., Agance W.W., 2014].

Лимфоциты могут образовывать скопления и лимфоидные узелки. Последние в слизистой оболочке тонкой и толстой кишки представлены солитарными (одиночными) и агрегированными (пейеровыми бляшками) лимфоидными узелками [Ross M.H., Pawlina W., 2016]. В ответ на присутствие антигенов В-клетки в СПСО дифференцируются в плазмочиты, секретирующие IgA, IgM, IgG [Mowat A.M., Agance W.W., 2014]. Причем, среди секретируемых антител преобладают димеры иммуноглобулина А (dIgA), состоящие из двух мономеров IgA и соединяющего их полипептида J. Димер взаимодействует с молекулой-транспортером pIgR, расположенной на базальной мембране энтероцитов, которая путем эндоцитоза транспортирует иммуноглобулин к апикальной поверхности клетки, откуда dIgA попадает в просвет кишки. Однако часть молекулы-транспортера pIgRp («секреторный компонент») остается связанной с димером IgA, защищая его от действия протеолитических ферментов в слизи. Такой иммуноглобулин называют секреторным иммуноглобулином А (sIgA). Он является ключевой молекулой иммунитета, ассоциированного со слизистой оболочкой, связывает антигены, токсины, микроорганизмы и вирусные частицы, способствует их фагоцитозу и препятствует инвазии бактерий через слой слизи и их адгезии к эпителию [Ross M.H., Pawlina W., 2016].

В развитии иммунных реакций в кишечнике важную роль играют клетки врожденного иммунитета – дендритные клетки и макрофаги. Дендритные клетки обнаруживаются в лимфоидных узелках, кроме того они диффузно рассеяны в СПСО. Взаимодействие толл-подобных рецепторов (TLR) дендритных клеток с различными лигандами микробного

происхождения индуцирует в этих клетках сигнальные пути, приводящие к экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов, ретиноевой кислоты, фактора активации тромбоцитов, лейкотриенов и других молекул. Эти вещества участвуют в поляризации Т-клеток в Т-хелперы 1, 2, 9, 17, 22 типов или по пути регуляторных Т-клеток [Smolinska S. et al., 2017].

Важными компонентами кишечного барьера, защищающими внутреннюю среду организма от бактерий и повреждающих агентов, является слой муцинов, эпителиальная выстилка и СПСО [Konig J. et al., 2016]. Слизь и гликокаликс на поверхности колоноцитов это первый защитный барьер толстой кишки. Их основным структурным компонентом являются муцины, секретируемые бокаловидными клетками. В толстой кишке в норме преобладают кислые муцины, которые, как предполагается, лучше, чем нейтральные, защищают от бактериальной транслокации, так как первые, особенно сульфатированные, менее подвержены разрушению бактериальными гликозидазами [Золотова Н.А., Макарова О.В., 2014]. Слизь, покрывающая эпителиальную выстилку толстой кишки у человека, состоит из полимеризованного гелеобразующего муцина MUC2 и представлена двумя слоями. Внутренний слой слизи плотно связан с эпителиальной выстилкой и в нем в норме отсутствуют микроорганизмы, так как он содержит антимикробные пептиды [Winer D.A., 2016]. Внешний слой слизи более рыхлый, легко удаляется и обильно заселен бактериями. Под слоем слизи в толстой кишке расположен гликокаликс, в состав которого входят мембрано-ассоциированные муцины. Гликокаликс препятствует адгезии и инвазии бактерий, а также участвует в передаче клеточных сигналов [Золотова Н.А., Макарова О.В., 2014; Devkota O. et al., 2012; Silva F.A.R., 2016].

Следующей линией защиты организма от инвазии патогенных агентов является эпителий. За счет наличия плотных контактов (tight junctions) эпителиоциты формируют надежный барьер (zonula occludens) между содержимым кишечника и внутренней средой организма [Roda G. et al., 2010;

Peterson L.W., Artis D., 2014]. Плотные контакты образованы белками плотных контактов ZO1 (Zonula Occludens-1), оклюдинами и клаудинами. На стабильность плотных контактов влияют многие цитокины, например, ФНО- α , ИНФ- γ и ИЛ-13, и киназы, включая семейство протеинкиназ C, а также молекулы оксидативного стресса, цАМФ и кальций. Многие бактериальные патогены способны нарушать стабильность плотных контактов, в результате чего бактериальные антигены проникают в СПСО и способствуют развитию воспалительных заболеваний кишечника [Konig J. et al., 2016]. При ожирении проницаемость кишечного эпителия увеличивается, о чем свидетельствует повышение уровня бактериального ЛПС в плазме крови [Lumeng C.N., 2013; Everard A., Cani P.D., 2013].

Кишечная микробиота в норме

В желудочно-кишечном тракте у здорового человека плотность бактериальных клеток существенно больше, чем в других биотопах организма, таких как кожа, дыхательные пути, урогенитальный тракт. Наиболее плотно заселена толстая кишка, где количество бактерии в 1 г содержимого составляет 10^{11} - 10^{13} . Бактерии составляют около 50-60% сухой массы фекалий [Шварц В., Ногаллер А., 2014]. Микробиота желудочно-кишечного тракта - это филогенетически сложившаяся совокупность микроорганизмов. Нормальная кишечная микробиота (КМБ) подразделяется на облигатную (резидентную) – 90%, факультативную – 9,5% и транзиторную – 0,5% [Smolinska S. et al., 2017].

КМБ выполняет следующие важнейшие функции: 1) метаболическую, переваривание различных пищевых ингредиентов и синтез новых, оказывающих влияние на метаболизм макроорганизма в целом; 2) защитную - поддержание кишечного барьера за счет воздействия на межклеточные контакты, увеличение синтеза муцина и усиление процессов регенерации эпителия; 3) иммуногенную - взаимодействие с иммунной системой

кишечника через систему TLR и NOD-рецепторов, регуляция иммунного ответа и формирование иммунологической толерантности [Корниенко Е.А., Нетребенко О.К., 2012]. К функциям микрофлоры относится стимуляция перистальтики кишечника, продукция короткоцепочных жирных кислот, биотрансформация желчных кислот и инактивация ксенобиотиков. Кроме того, КМБ влияют на метаболизм глюкозы и участвует в активации ряда ферментов, способствующих липогенезу и отложению жира в адипоцитах и регуляции уровня гастроинтестинальных гормонов и лептина [Backhed F. et al., 2007; Шварц В., Ногаллер А., 2014].

Более 90% микрофлоры дистального отдела толстой кишки у здоровых людей составляют микроорганизмы рода *Bacteroidetes* и *Firmicutes*. *Firmicutes* это преимущественно грамположительные бактерии, в том числе лактобациллы. Тип *Bacteroidetes* представлен грамотрицательными бактериями [Silva F.A.R. et al., 2016]. Оставшиеся 10% популяции представлены - таксонами *Proteobacteri* (*Escherichia* и *Helicobacter*), *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* и *Spirochaetes*, а также грибами, одноклеточными микроорганизмами и вирусами. Кишечный микробиоценоз является высокоорганизованной системой, реагирующей качественными и количественными сдвигами на динамическое состояние организма человека в различных физиологических условиях жизнедеятельности и патологии [Корниенко Е.А., Нетребенко О.К., 2012].

Таким образом, у здоровых людей кишечный барьер препятствует инвазии патогенов с помощью слоя муцинов, плотных контактов между эпителиоцитами, антимикробных пептидов и иммуноглобулинов. TLR и NOD рецепторы эпителиальных клеток кишечника распознают молекулярные паттерны, ассоциированные с нормальной микрофлорой кишечника, инициируют реакции иммунной системы и формирование процессов толерантности, которые обеспечивают нормальное функционирование кишечного барьера и формирование иммунологической толерантности.

Анатомия, гистофизиология и микробиота толстой кишки у крыс

Данные по анатомии и гистофизиологии толстой кишки у крыс представлена лишь в нескольких работах [Петренко В.М., 2011; Овсянко Е.В. и соавт., 2014; Андреева Е.В. и соавт., 2015; Тихонов Е.А., 2015; Тихонов Е.А. и соавт., 2016; Kararli T.T., 1995; Hatton G.B. et al., 2015; Vdoviakova K. et al., 2016]. Длина ободочной кишки у крыс составляет в среднем 9-11 см., длина прямой кишки – 7,5-8 см, а слепой - 4,5-6,5 см [Kararli T.T., 1995; Hatton G.B. et al., 2015; Vdoviakova K. et al., 2016]. По данным Е.А. Тихонова (2015) длина ободочной кишки у половозрелых крыс Вистар в возрасте 2-3 месяцев составляет в среднем 18 см. Время транзита содержимого толстой кишки у крыс варьирует от 5,8 до 15,6 часов, а у человека от 8 до 72 часов [Hatton G.B. et al., 2015]. Кислотность (рН) содержимого ободочной кишки у крыс достигает 6,2, у человека – 6,4, а у мыши – 5,0 [Kararli T.T., 1995; Hatton G.B. et al., 2015].

В.М. Петренко (2011) описал форму и топографию ободочной кишки у крыс, она напоминает «растянутую спираль» и образует 2 петли – ventральную и дорсальную. В ней определяются три части – восходящая (проксимальная), поперечная (медиальная) и нисходящая (дистальная). Длинная и изогнутая восходящая кишка занимает большую часть ventральной ветви ободочной кишки и проходит среди петель тонкой кишки. Короткая и почти прямая поперечная часть подвешена на брыжейке к головке и телу поджелудочной железы. Нисходящая часть представляет дорсальную ветвь ободочной кишки. Сигмовидная кишка у крыс отсутствует и только намечается как слабый ventральный изгиб при переходе ободочной кишки в расширение прямой. Слепая кишка у крысы не имеет червеобразного отростка и представлена изогнутым конусом, тело слепой кишки лежит поперечно на ventральной поверхности петель тонкой кишки [Петренко В.М., 2011].

Толщина слоя муцинов у крыс в восходящей ободочной кишке составляет 65,2 мкм, а в нисходящей - 48,4 мкм [Hatton G.B. et al., 2015]. По

данным Е.В. Овсянко и соавт. (2014) у интактных крыс-самцов линии Wistar высота слизистого слоя стенки толстой кишки крыс в среднем составляет 27 мкм. Среди эпителиальных клеток определяются межэпителиальные лимфоциты, а у основания и в средней части крипт определяются митозы эпителиоцитов. Незначительная лейкоцитарная инфильтрация представлена единичными в поле зрения лимфоцитами и гранулоцитами [Овсянко Е.В. и соавт., 2014]. Е.В. Андреева и соавт. (2015) описали морфологические особенности слизистой оболочки ободочной кишки у половозрелых самцов крыс Вистар. Глубина крипт ободочной кишки составляет 0,15 мм. В эпителиальной выстилке объемная доля колоноцитов составляет – 41%, а бокаловидных клеток – 23%. В эпителии также обнаружены немногочисленные митозы, межэпителиальные лимфоциты и эндокринные клетки – серотониноциты. В составе клеток СПСО присутствуют сегментоядерные лейкоциты (7%), лимфоциты (3,6%) и другие клетки (89,4%). По данным Тихонова Е.А. и соавт. (2016) в эпителиальной выстилке проксимального и дистального отделов ободочной кишки число энтероэндокринных клеток на 1 мм² у половозрелых крыс Вистар составило 231 и 91 соответственно, а у старых крыс Вистар в возрасте 16-18 месяцев – 318 и 93 соответственно [Тихонов Е.А. и соавт., 2016]. Кроме того, Е.А. Тихонов (2015) проводил количественную оценку агрегированных лимфоидных узелков у самцов крыс Вистар разных возрастов и установил, что доля агрегированной лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой ободочной кишки, увеличивается в процессе постнатального онтогенеза, что обусловлено увеличением площади лимфоидных бляшек и числа одиночных лимфоидных узелков. В толстой кишке у половозрелых животных общее количество лимфоидных узелков достигает 62, а бляшек – 3-4. Средняя площадь бляшки в дистальном отделе ободочной кишки составила – 0,29 см², причем, в состав одной бляшки входит в среднем 10 узелков [Тихонов Е.А., 2015].

Состав кишечной микрофлоры у крыс по составу близок к таковому у человека [Макарова М.Н. и соавт., 2016]. У крыс, также как у человека преобладают 4 основных типа бактерий: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* [Queipo-Ortuño M.I. et al., 2013; Lecomte V. et al., 2015; Marques C. et al., 2016].

Важными представителями типа *Firmicutes* являются классы *Bacilli* и *Clostridia*, порядки *Lactobacillales* и *Clostridiales*, роды *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* и *Blautia*. В типе *Bacteroidetes* преобладает класс *Bacteroidia*, порядок *Bacteroidales*, роды *Bacteroides* и *Prevotella*. В типе *Proteobacteria* – класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Enterobacteriales*, род *Morganella*, а в типе *Actinobacteria* – класс *Actinobacteria*, порядок *Bifidobacteriales*, род *Bifidobacterium* [Lecomte V. et al., 2015].

По данным V. Lecomte et al. (2015) у самцов крыс Спрейг-Доули в возрасте 6 недель преобладают следующие виды бактерий: *Lactobacillus spp.*, *Blautia producta*, *Morganella morganii*, *Phascolarctobacterium un.*, *Bacteroides fragilis* и *vulgatus*, *Clostridium spiroforme* и *sordellii* и *Escherichia fergusonii*.

Взаимосвязь кишечной микробиоты, диеты и иммунной системы кишечника при ожирении

Состав рациона является ключевым фактором, влияющим на состав КМБ [DiBaise J.K. et al., 2012]. Систематические изменения в составе пищевого рациона могут приводить к изменению кишечного микробиома. По данным ряда авторов для ожирения характерно увеличение количества представителей рода *Firmicutes* и уменьшение *Bacteroidetes* [Корниенко Е.А., Нетребенко О.К., 2012; McPhee J.B., Schertzer J.D., 2015; Winer D.A., 2016]. У мышей с ожирением число микроорганизмов рода *Firmicutes* увеличивается с 60 до 80% по отношению ко всей КМБ, а рода *Bacteroidetes* уменьшается с 40 до 20%. Аналогичное изменение соотношения *Firmicutes/Bacteroidetes* наблюдалось у людей с ожирением [Baothman O.A.

et al., 2016]. Однако в других работах продемонстрированы противоположные сдвиги в составе микрофлоры, в том числе увеличение представителей рода *Bacteroidales* [Hamilton M.K. et al., 2015; Boulange C.L. et al., 2016]. Кроме того, количество некоторых представителей *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Akkermansia* ассоциировано с нормализацией массы тела и резистентности к инсулину [McPhee J.B. Schertzer J.D., 2015].

Кишечная микрофлора питается за счет остатков непереваренной и не усвоенной в кишке пищи, в первую очередь, крахмалов и определенных полисахаридов, устойчивых к пищеварительным ферментам. Пищевые волокна метаболизируются бактериями в короткоцепочечные жирные кислоты - SCFA (short-chain fatty acids), среди которых выделяют муравьиную (C1) и уксусную кислоты или ацетат (C2), пропионовую кислоту или пропионат (C3), масляную кислоту или бутират (C4) и валериановую кислоту или валераты (C5) [Kim C.H. et al., 2014]. SCFA являются важным энергетическим субстратом для колоноцитов, оказывают влияние на организацию плотных контактов в эпителии, синтез муцина бокаловидными клетками, синтез иммуноглобулинов А плазмócитами и дифференцировку регуляторных Т-клеток. SCFA супрессируют сигнальный путь NF-κB и продукцию провоспалительных цитокинов [Kim C.H. et al., 2014]. Ацетат и пропионат продуцируются в основном представителями *Bacteroidetes*, а бутират - *Firmicutes* [Baotherman O.A. et al., 2016]. Бутират, в большей степени, чем пропионат или ацетат, оказывает иммуномодулирующие эффекты. Бутират ингибирует активность деацетилазы гистонов в дендритных клетках и макрофагах и активирует рецепторы, сопряжённые с G-белком (G-protein-coupled receptors, GPCR). В результате снижается синтез цитокинов (ИЛ-12 и ИЛ-6), с помощью которых дендритные клетки могут стимулировать регуляторные Т-клетки. Пропионат обладает сходным действием. Ацетат, наоборот, может стимулировать продукцию провоспалительных цитокинов

макрофагами и усиливать воспалительные процессы в печени, например, при алкоголизме [Smolinska S. et al., 2017].

Изменения рациона и дисбиоз влияют на синтез и состав SCFA, что отражается на барьерной и иммунной функциях кишечника. Кроме того, SCFA оказывают нормализующее воздействие на массу тела, концентрацию глюкозы в крови и чувствительность к инсулину у экспериментальных животных с ожирением. Концентрация SCFA повышается в кишечном содержимом у мышей линии ob/ob с мутацией гена лептина и людей с ожирением, что, возможно, связано со снижением всасывания в толстой кишке [Baotherman O.A. et al., 2016].

Кишечная микрофлора влияет на метаболизм липидов, улучшает усвоение питательных веществ из пищи и липогенез в жировой ткани [Turnbaugh P.J. et al., 2006]. Так у мышей гнотобиотов не развивается ожирение, даже при рационе, с высоким содержанием жиров, а пересадка микробиоты от людей с ожирением, вызывает у мышей увеличение веса и жировой массы, а также повышает резистентность к инсулину [Backhed F. et al., 2004]. Существует несколько механизмов, регулирующих эту взаимосвязь [Winer D.A., 2016; Boulange C.L. et al., 2016]. Изменения состава КМБ влияют на всасывание моносахаридов и SCFA и последующий липогенез в печени. Также, они оказывают супрессирующее влияние на АМФ-активируемую протеинкиназу и фактор FIAF (Fasting-Induced Adipose Factor) - фактор жировой ткани, индуцируемый голоданием, ангиопоэтин-подобный белок 4. АМФ-активируемая протеинкиназа контролирует энергетический баланс клетки при физической нагрузке, стрессе, гипоксии и гипогликемии. Ингибирование этого фермента коррелирует с усилением липогенеза и снижением окисления жирных кислот в митохондриях [Boulange C.L. et al., 2016]. FIAF играет роль в гомеостазе глюкозы, чувствительности к инсулину и метаболизме липидов, ингибируя тканевую липопротеинлипазу [Winer D.A., 2016]. Супрессия FIAF стимулирует накопление триглицеридов адипоцитами [Boulange C.L. et al., 2016]. Кроме того, данные механизмы

включают взаимодействие короткоцепочечных жирных кислот и рецепторов, сопряжённых с G-белком. Эти рецепторы экспрессируются энтероэндокринными клетками эпителиальной выстилки и их активация приводит к снижению экспрессии пептида YY и, как следствие, усилению перистальтики ЖКТ, что способствует уменьшению длительности нахождения химуса в кишечнике и гипоталамус-ассоциированному увеличению аппетита [DiBaise J.K. et al., 2012].

Кишечная микрофлора также оказывает влияние на функциональное состояние эпителиальной выстилки кишечника и иммунную систему, ассоциированную со слизистой оболочкой. Большинство клеток кишечника (колоноциты, бокаловидные клетки, энтероэндокринные клетки, клетки Панета, миофибробласты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты и другие) экспрессируют TLR и NOD рецепторы [Roda G. et al., 2010]. Существуют механизмы, предотвращающие активацию этих рецепторов компонентами КМБ в норме, регулируя иммунный ответ и способствуя формированию иммунологической толерантности. При появлении патогенных микроорганизмов TLR активируются и инициируют развитие иммунного ответа. Однако для некоторых воспалительных заболеваний кишечника характерна гиперактивация TLR, которая может привести к хронизации воспалительного процесса [Silva F.A.R. et al., 2016; Devkota S. et al., 2012]. Ключевым лигандом для TLR является эндотоксин (ЛПС) – основной компонент клеточной мембраны грамм-отрицательных бактерий. Причем, повышение концентрации ЛПС в крови ассоциировано с потреблением пищи, богатой жирами и коррелирует с выраженностью висцерального ожирения и инсулинорезистентностью [Erridge C. et al., 2007; Lumeng C.N., 2013; Everard A., Cani P.D., 2013].

Высокое содержание жиров в рационе изменяет состав желчных кислот и значительно влияет на состав КМБ, во многом определяя, какая микробная популяция будет доминировать в кишечнике [Silva F.A.R. et al., 2016; Devkota S. et al., 2012]. Насыщенные жирные кислоты, кроме того,

связываются с рецепторами TLR2 и TLR4, способствуя активации макрофагов и секреции ими провоспалительных цитокинов [Winer D.A. et al., 2017].

Важным компонентом питания для человека являются фрукты и овощи, количество которых в рационе людей с ожирением, как правило, недостаточное. Кроме нерастворимых волокон овощи содержат полифенолы и флаваноиды, которые являются лигандами арил-гидрокарбонового рецептора AhR (Aryl hydrocarbon Receptor). AhR это транскрипционный фактор межэпителиальных лимфоцитов (Т-хелперов 17), который влияет на их миграцию и процессы дифференцировки. У мышей, нокаутных по гену AhR или потреблявших рацион без лигандов AhR, наблюдалась редукция структур лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником, и число межэпителиальных лимфоцитов, что несомненно оказывает влияние на функционирование кишечного барьера [Winer D.A. 2016, Winer D.A. et al., 2017].

В тонком и толстом кишечнике при ожирении у мышей и человека повышается число $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1 типа, CD8⁺ $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов, а число регуляторных FoxP3⁺ Т-клеток снижается. Кроме того, в тонкой кишке у мышей снижается число эозинофилов и Т-хелперов 17, а в биоптатах тонкой кишки у человека выявлено увеличение количества CD68⁺ макрофагов, зрелых дендритных клеток и натуральных киллеров. В толстой кишке при ожирении у мышей снижается число межэпителиальных лимфоцитов, экспрессирующих ИЛ-22. Именно эта популяция лимфоцитов поддерживает целостность эпителиального барьера кишечника и защищает от эндотоксинемии [Winer D.A. et al., 2017].

Таким образом, при ожирении и сопутствующем дисбиозе нарушается равновесие между кишечным барьером и микрофлорой, что приводит к снижению продукции муцина, антимикробных пептидов и влияет на организацию плотных контактов эпителиальной выстилки. Бактериальные антигены, ЛПС и свободные жирные кислоты взаимодействуют с TLR и

NOD рецепторами клеток эпителия, макрофагов и дендритных клеток, которые начинают секретировать широкий спектр провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию воспалительного ответа [Winer D.A. 2016]. Воспаление может приводить к развитию фиброза, характеризуемого избыточным синтезом экстрацеллюлярного матрикса фибробластами [Silva F.A.R. et al., 2016]. Иммунологические изменения кишечника характеризуются активацией рецепторов системы врожденного иммунитета и изменениями в составе клеток врожденного и адаптивного иммунитета: увеличением числа секретирующих ИНФ- γ Th1 и CD8⁺ Т-клеток и снижением числа регуляторных Т-клеток, Th17, межэпителиальных лимфоцитов, секретирующих ИЛ-22, и эозинофилов.

1.5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПРИ ОЖИРЕНИИ

Данные литературы по гистофизиологии толстой кишки при ожирении у человека и лабораторных животных практически отсутствуют. В некоторых работах авторы оценивали проницаемость кишечного барьера, развитие воспалительных реакций в толстой кишке на молекулярном уровне и лишь в единичных работах были описаны морфологические особенности толстой кишки.

Н. Li et al. (2008) моделировали ожирение на самках мышей в течение 14 недель и оценивали влияние «диеты кафетерия» на развитие воспалительных реакций в толстой кишке и других органах. Они выявили в гомогенате ободочной кишки повышение уровня ИЛ-1 β и ИЛ-12p40, но не ИЛ-6 и ФНО- α . В печени, наоборот, увеличивалась продукция ИЛ-6 и ФНО- α , а в жировой ткани - ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α . Морфологическое исследование толстой кишки авторы не проводили [Li H. et al., 2008].

C.B. De La Serre et al. (2010) исследовали влияние рациона с высоким содержанием жира в течение 12 недель на эпителий кишки и микробиоту у крыс Спрейг-Доули. Они делили животных на две группы: с максимальной массой тела - DIO-P (diet induced obesity prone,) и крыс, устойчивых к высококалорийному рациону - DIO-R (diet induced obesity resistant). У DIO-P крыс выявлено повышение концентрации ЛПС в плазме крови, а в гомогенате слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки - снижение содержания щелочной фосфатазы, которая разрушает ЛПС. При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено увеличение экспрессии окклюдина и активированных TLR4 рецепторов в апикальных зонах энтероцитов. Кишечная проницаемость у DIO-P крыс увеличилась, о чем свидетельствовало повышение в плазме крови концентрации меченного FITC декстрана, раствор которого вводили через зонд в ЖКТ. При изучении КМБ у DIO-P и DIO-R крыс было выявлено снижение общего числа

микроорганизмов и увеличение доли бактерий порядков *Bacteroidales* и *Clostridiales*. Содержание бактерий отряда *Enterobacteriales* увеличилось только у DIO-P крыс [De La Serre C.B. et al., 2010].

L.G. Teixeira et al. (2011) оценивали влияние 8-недельного рациона с высоким содержанием жиров на развитие воспалительных реакций в толстой кишке у мышей, а также сравнивали развитие декстран-индуцированного колита у мышей с нормальным весом и ожирением. Морфологическое исследование не выявило различий в слизистой оболочке по количеству бокаловидных клеток у мышей контрольной группы и с ожирением. В слизистой оболочке и подслизистой основе не было обнаружено признаков воспалительной инфильтрации. В группах мышей с колитом и колитом на фоне ожирения выявлено уменьшение числа бокаловидных клеток, неравномерное утолщение мышечной оболочки и воспалительная инфильтрация. В группе мышей с колитом на фоне ожирения изменения мышечной оболочки и воспалительная инфильтрация были сильнее выражены, чем у мышей с колитом без ожирения. Методом проточной цитофлюориметрии авторы оценили состав инфильтрата в СПСО толстой кишки у всех групп. Изменений по относительному количеству регуляторных Т-клеток (CD4+CD25+LAP+), активированных и неактивированных В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+) выявлено не было. Однако у мышей с ожирением повышалось относительное количество нейтрофилов (GR1+), моноцитов и макрофагов (MOMA+) и активированных макрофагов (MOMA+ CD80+). У мышей с колитом на фоне ожирения по сравнению с группой с колитом без ожирения увеличилось относительное количество активированных Т-лимфоцитов (CD4+ CD69+). Таким образом, после 8 недель потребления рациона с высоким содержанием жиров у мышей в толстой кишке не было выявлено каких-либо морфологических изменений, но обнаружено повышение относительного количества нейтрофилов и макрофагов в СПСО. Кроме того, ожирение

ухудшало течение декстран-индуцированного колита [Teixeira L.G. et al., 2011].

F. Reichardt et al. (2013) установили, что у мышей, получавших корм с высоким содержанием жиров в течение 12 недель, в толстой кишке ускорялся транзит содержимого и отмечалась более интенсивная активация миентеральных нейронов при стимуляции никотином и 2-метил-5-гидрокситриптамиином, а также повышалась концентрация ИЛ-6 и ФНО- α в гомогенате стенки толстой кишки. Однако авторы не выявили различий между группами сравнения при морфологическом исследовании толстой кишки по ряду критериев: инфильтрация СПСО моноцитами, гиперплазия эпителия крипт, уменьшение числа бокаловидных клеток и изменения гистоархитектоники. Таким образом, у мышей в толстой кишке после 12 недель потребления рациона с высоким содержанием жиров авторами выявлены только некоторые функциональные, но не морфологические изменения [F. Reichardt et al., 2013].

K.M. Hamilton et al. (2015) оценивали проницаемость кишечного барьера и состава микробиоты в разных отделах тонкой и толстой кишки у крыс, получавших корм с высоким содержанием жиров в течение 1-6 недель. Они выявили уменьшение длины толстого кишечника и усиливающиеся нарушения транс- и параклеточной проницаемости. Авторы оценивали морфологические изменения в тонкой и слепой кишке. После первой недели эксперимента в них уменьшилась глубина крипт, а в слепой кишке снизилось число бокаловидных клеток на крипту, но в более отдаленные сроки (6 недель) эти параметры не отличались от таковых у животных контрольной группы [Hamilton K.M. et al., 2015].

В целом, анализ литературных данных показал, что число работ по морфологическим, функциональным и молекулярно-биологическим изменениям толстой кишки при ожирении небольшое, а их данные фрагментарны. Во всех работах сроки эксперимента относительно небольшие – 6-12 недель. Очевидно, что морфологические изменения в толстой кишке

при высокожировой диете в эти сроки практически отсутствуют или являются адаптивными. В литературе нет данных о морфологических изменениях эпителиально-слизистого барьера и соединительной ткани слизистой оболочки при ожирении в экспериментах, продолжавшихся более 12 недель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

Ожирение является актуальной медико-биологической проблемой, так как оно широко распространено среди населения всех стран. Это заболевание характеризуется повышением на его фоне частоты развития сахарного диабета второго типа, хронических воспалительных и онкологических заболеваний. Риск развития колоректального рака у мужчин при ожирении увеличивается на 30-70%. Ожирение центрального типа является обязательным критерием метаболического синдрома, и оно часто ассоциировано с резистентностью к инсулину, гипергликемией, дислипидемией и артериальной гипертензией.

Жировая ткань участвует в регуляции метаболических и иммунных процессов, продуцируя большое количество различных гормонов, медиаторов и факторов роста. При ожирении в ней наблюдается активация воспалительных реакций. Пусковыми механизмами воспалительного процесса в жировой ткани являются гипоксия, обусловленная гипертрофией адипоцитов и нарушениями кровотока, бактериальные липополисахариды и свободные жирные кислоты. При ожирении иммунные и воспалительные реакции в жировой ткани характеризуются активацией рецепторов системы врожденного иммунитета и сигнальных каскадов NF- κ B/HIF, а также секрецией огромного количества сигнальных молекул: адипокинов, цитокинов, хемокинов, факторов роста и других.

С целью моделирования ожирения и метаболического синдрома используются рационы с повышенным содержанием жиров, углеводов и их сочетанием. Сроки воспроизведения ожирения и метаболического синдрома в экспериментальных моделях, представленных в литературе, значительно варьируют от 4х до 48 недель. Морфологическое исследование внутренних органов с целью выявления характерных для ожирения патологических процессов, как правило, не проводилось, но в единичных исследованиях длительностью до 15 недель авторы выявили начальные стадии жировой

дистрофии печени, гипертрофии и фиброза миокарда и слабовыраженная гипертрофия островков Лангерганса в поджелудочной железе. Относительно короткие сроки моделирования ожирения недостаточны для развития патологических изменений внутренних органов. Необходимо проведение морфологического исследования, включающего оценку патологических изменений в печени, поджелудочной железе, жировой ткани и других органах при длительном применении адипогенного рациона, что в большей мере соответствует ожирению у человека.

Кишечник это барьерный орган, который находится на границе внутренней и внешней среды организма и является не только физиологическим препятствием на пути поступления антигенов в кровь и ткани организма, но в нем также активно функционирует локальный компартмент системы врожденного и приобретенного иммунитета. При ожирении и сопутствующем ему дисбиозе нарушается равновесие между кишечным барьером и микрофлорой, что приводит к увеличению проницаемости кишечного эпителия в связи со снижением продукции муцина, антимикробных пептидов и изменениями организации плотных контактов эпителиальной выстилки. Бактериальные антигены, ЛПС и свободные жирные кислоты взаимодействуют с TLR и NOD рецепторами клеток эпителия, макрофагов и дендритных клеток, которые начинают секретировать широкий спектр провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию воспалительного ответа.

Число работ по морфологическим, функциональным и молекулярно-биологическим изменениям толстой кишки при ожирении небольшое, а их данные фрагментарны. Во всех работах сроки эксперимента относительно небольшие – 6-12 недель. Поэтому в эти ранние сроки морфологические изменения в толстой кишке при высокожировой диете практически не проявляются. Данные о морфологических изменениях эпителиально-слизистого барьера и локального компартмента иммунной системы слизистой оболочки при ожирении в экспериментах, продолжавшихся более 12 недель,

в литературе отсутствуют. Для оценки морфологических изменений ободочной кишки при ожирении необходимо проведение более длительного эксперимента с использованием рациона, содержащего большое количество жиров и углеводов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА

В работе использованы половозрелые самцы крыс Спрейг-Доули ($n=50$), массой тела 204 ± 30 г. (питомник “Пушино”). При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР №577 от 12.08.1977. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ “НИИ морфологии человека” (протокол № 15 от 16.12.2014). Экспериментальных животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму.

Животные были случайным образом разделены на две группы: контрольная группа ($n = 20$; масса тела - $198,5\pm 42,2$ г.) получала стандартный корм ПК-120-1 (ООО “Лабораторснаб”, сертификат соответствия № РОССТУ.П081.В00113, ГОСТ Р50258-92); опытная группа ($n = 30$; масса тела - $208,3\pm 15,6$ г, $p = 0,2$) – рацион, обогащенный углеводами (фруктоза и белый хлеб) и жирами (пальмовое масло рафинированное дезодорированное отбеленное; ТУ 9141-064-57710951-2013; ООО “ЭФКО Пищевые Ингредиенты”; табл. 1). Энергетическая ценность корма у животных опытной группы была в 1,5 раза выше, чем у контрольной, причем почти 50% калорий крысы опытной группы получали за счет жиров. Содержание жиров в рационе у крыс опытной группы было увеличено в 20 раз по сравнению с рационом контрольной. Длительность эксперимента составила 40 недель.

На протяжении эксперимента у крыс контрольной и опытной групп определяли массу и длину тела. Вычисляли индекс массы тела (ИМТ) – отношение массы тела в граммах к квадрату длины тела в сантиметрах. После взвешивания и измерения длины тела в конце эксперимента крысы обеих групп были ранжированы по ИМТ в соответствии с алгоритмом, описанным рядом авторов [Lauterio T.J. et al., 1994; Levin B.E. et al., 1997; Dobrian A.D. et al., 2000; De La Serre C.B. et al., 2010]. Для дальнейшего исследования в контрольной группе были использованы 9 крыс со средними

по группе значениями ИМТ. В опытной группе были отобраны 11 животных с максимальным ИМТ. Крысы устойчивые к высококалорийному рациону, для дальнейших исследований не были использованы (табл. 2). Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира.

Схема эксперимента



Таблица 1

Характеристика рациона животных контрольной и опытной групп

Характеристика рациона		Группа наблюдения	
		Контрольная	Опытная
Энергетическая ценность (ккал/г)		2,7	4,1
Соотношение макронутриентов по весу (в %)	Белки	15	8,5
	Жиры	1,1	22
	Углеводы	49	43
Соотношение макронутриентов по ккал (в %)	Белки	23	8
	Жиры	4	49
	Углеводы	73	42

Таблица 2

Группы наблюдения и количество животных, использованных в эксперименте

Группы наблюдений	Количество животных	
	В начале эксперимента	Отобранные по ИМТ*
Контрольная	20	9
Ожирение	30	11

*ИМТ – индекс массы тела

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Массометрические

Определяли массу и длину тела у крыс контрольной и опытной групп на разных сроках и перед выведением из эксперимента. Под легким эфирным наркозом в вертикальном положении животного проводили измерение длины тела от кончика носа до основания хвоста в соответствии с рекомендациями Б.А. Кузнецова (1975). При вскрытии животных определяли массу жировой ткани, окружающей придаток правого и левого семенника, сердца и печени.

2. Гистологические

Дистальный отдел ободочной кишки, кусочки печени, поджелудочной железы, сердца и жировой ткани, окружающей придаток семенника, фиксировали в жидкости Буэна. Материал проводили по спиртам восходящей концентрации и ксилолам в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (“Sakura”, США). Обезвоженные образцы заключали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (“Sakura”, США). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме модели Microm HM340E (“Thermo Scientific”, США) и окрашивали их гематоксилином и эозином.

3. Гистохимические

Для выявления в бокаловидных клетках высокосульфатированных и нейтральных муцинов проводили окраску соответственно альциановым синим pH 1.0 по Моури (Гистолайн, ООО “Элемент”, Россия) и ШИК-реакцию (“БиоВитрум”, Россия; Саркисов Д.С. и Перов Ю.Л., 1996). Окрашивание препаратов опытной и контрольной группы проводили одновременно. Для выявления нейтральных жиров в печени материал фиксировали в забуференном растворе 10% формалина “Biovitrum” (Россия), получали криосрезы толщиной 7 мкм и окрашивали их суданом III. Для выявления коллагеновых волокон проводили окраску пикросириусом красным (Polisciencences, США) и выявляли их в поляризованном свете.

4. Иммуногистохимические

Энтероэндокринные клетки выявляли с помощью антител к хромогранину А (Rabbit polyclonal to Chromogranin A, “Abcam”, Великобритания) в титре 1:400, инкубацию проводили в течение 18 ч. (при температуре 12°C). Вторые антитела (HRP-Goat Anti-Rabbit IgG, Invitrogen) использовали в титре 1:200, срезы инкубировали 1 ч. при комнатной температуре. Макрофаги в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки и жировой ткани, окружающей придаток семенника, выявляли с помощью антител к CD68 (Mouse monoclonal [ED1], “Abcam”, Великобритания) в титре 1:800, инкубацию проводили в течение 18 ч. (при температуре 12°C). Вторые антитела (HRP- Goat Anti-Mouse IgG, Abcam) использовали в титре 1:200, срезы инкубировали 1 ч. при комнатной температуре. Для визуализации реакции применяли набор Dako (DAB) EnVision-HRP (“Agilent Technologies”, США). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

5. Морфометрические

При морфометрическом исследовании подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) ободочной кишки на стандартной площади среза (1000 мкм²). Проводили дифференцированный подсчет клеточных элементов (на 1000 клеток) в СПСО с определением относительного количества нейтрофилов, лимфоцитов, плазмоцитов, фиброцитов и фибробластов при увеличении 600. Подсчитывали абсолютное количество энтероэндокринных клеток, выявленных при реакции с антителами к хромогранину А, на стандартной единице площади эпителия (10000 мкм²). Проводили оценку содержания CD68-положительных макрофагов в СПСО. Определяли абсолютное количество бокаловидных клеток на крипту. Для определения их объёмной плотности измеряли процент площади СПСО, занимаемый окрашенными структурами (ШИК-реакция). Содержание

высокосульфатированных и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках определяли, соответственно, по интенсивности окрашивания альциановым синим и ШИК-реакции. Для нивелирования различий гистохимической реакции ее нормировали по интенсивности окрашивания расположенных рядом участков соединительной ткани.

В стенке дистального отдела ободочной кишки в поляризованном свете оценивали распределение и относительную площадь коллагеновых волокон, окрашенных пикросириусом красным.

На препаратах жировой ткани, окружающей придаток семенника, определяли абсолютные показатели площади срезов адипоцитов. Для морфометрического исследования фотографировали Axioplan 2 imaging (“Carl Zeiss”, Германия) и использовали программы ImageJ (Fiji; freeware, разработчик W. Rasband, rsb.info.nih.gov/ij/) и PhotoM 1.21 (freeware, разработчик А. Черниговский, 2000–2001, http://t_lambda.chat.ru/).

6. Культуральные

Для изучения цитокинового профиля из селезенки выделяли клетки с помощью гомогенизатора Поттера. Выделенные клетки центрифугировали в среде для отмывки (среда 199) 10 мин при 1000 об/мин. Суспензию клеток селезенки в количестве 1×10^6 /мл культивировали 24 часа в 1 мл полной ростовой среды в 24-луночных культуральных панелях при 37°C в атмосфере 5% CO₂ без добавления и с добавлением конканавалина А в конечной концентрации 5 мкг/мл для индукции синтеза и секреции цитокинов. По окончании инкубации отбирали надосадочную жидкость, которую хранили при – 70°C. Среда для культивирования лимфоцитов состояла из RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 5% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки (GE Healthcare, Австрия), 2 mM глутамина и 50 мкг/мл гентамицина.

Для определения относительного содержания макрофагов в жировой ткани, окружающей придаток семенника, использовали методику, описанную

B. Weigmann et al. (2007). Ткань измельчали на фрагменты 1-2 мм³ и инкубировали 45 минут (37⁰С) в ферментном растворе. Ферментный раствор состоял из среды 199 с солями Хэнкса (ПанЭко, Россия) с 5% инактивированной телячьей эмбриональной сывороткой (GE Healthcare, Австрия), 0.5мг/мл коллагеназы Д (Sigma-Aldrich, США), 0.5мг/мл диспазы II (Sigma-Aldrich, США) и 3мг/мл дезоксирибонуклеазы I (Thermo Scientific, США). Полученную суспензию пропускали через фильтр с диаметром отверстий 250 мкм и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Надосадок, содержащий адипоциты, удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды для лизиса эритроцитов, добавляли среду 199 до 10 мл и центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в среде 199. Полученную клеточную суспензию фиксировали по протоколу Chow S. et al. (2005) в 4% формальдегиде, центрифугировали в растворе PBS (ПанЭко, Россия) с 4% BSA (Intergren company, США) 10 минут при 1000 об/мин. Осадок ресуспендировали в растворе PBS с 50% метанолом и хранили в течение 1 мес при -70⁰С.

7. Биохимическое исследование

Кровь получали из шейной вены у животных, наркотизированных диэтиловым эфиром. Сыворотку крови хранили при температуре -70⁰С в течение 1 мес. В ней определяли уровень аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), глюкозы, α-амилазы, триглицеридов, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и холестерина (наборы “Human GmbH” 12011, 12012, 10260, 12018, 10720P, 10094, 10084, 10017, соответственно) на автоматическом биохимическом анализаторе Mindray BS 200 (КНР).

8. Иммуноферментный анализ

В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли уровень общего и свободного тестостерона, эстрадиола и кортизола, инсулина и факторов роста – инсулиноподобного (IGF-1) и

эпидермального (EGF) с помощью микропланшетного фотометра Anthos 2010 Standart Plus (“Biochrom”, Великобритания). Использовали коммерческие наборы “Diagnostics BioChem” (Канада) для общего и свободного тестостерона и эстрадиола, “IBL international” (Германия) для инсулина, “Immunodiagnostic Systems” (Австрия) для IGF-1 и “RayBiotech” (США) для EGF.

В культуральной жидкости стимулированных и нестимулированных клеток селезенки методом ИФА (“eBioscience”, Австрия) определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-2, ИЛ-4, интерферона- γ (ИНФ- γ) и фактора некроза опухолей α (ФНО- α). В сыворотке крови у крыс контрольной и опытной групп с помощью хромогенного LAL-теста определяли уровень эндотоксина («Nycult Biotech», Нидерланды).

9. Проточная цитофлуориметрия

Для цитофлуориметрического исследования кровь забирали в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА-К3 “Vacuette” объемом 2 мл (“Greiner Bio-one”, Австрия). Субпопуляционный состав лимфоцитов у животных контрольной и опытных групп определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе CITOMICS FC 500 (“Beckman Coulter”, США). В качестве антикоагулянта использовали ЭДТА (5 мг/мл).

Для иммунофенотипического анализа основных субпопуляций лимфоцитов использовали антитела фирмы “eBioscience” (США), конъюгированные с FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), PE-Cy7 (phycoerythrin-Cyanine 7), PE-Cy5 (phycoerythrin-Cyanine 5): anti-Rat CD3 (маркер Т-лимфоцитов); anti-Rat CD4 (маркер Т-хелперов); anti-Rat CD8 (маркер цитотоксических Т-лимфоцитов); anti-Rat CD45R (маркер В-лимфоцитов); anti-Mouse/Rat Foxp3 (маркер регуляторных Т-клеток); anti-rat CD25 (маркер активированных Т-лимфоцитов). Лизис эритроцитов в образцах цельной крови проводили с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution (“Beckman Coulter”, США). Для выявления субпопуляций

регуляторных Т-лимфоцитов использовали набор Foxp3 Staining Buffer Set (“eBioscience”, США) и IO Test3 Lysing Solution (“Beckman Coulter”, США).

Среди клеток, выделенных из жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной и опытной групп определяли относительное содержание макрофагов. Для иммунофенотипического анализа использовали антитела фирмы “AbD Serotec” (США), конъюгированные с FITC (Fluorescein IsoThioCyanate): mouse anti-Rat CD68 Clone ED1 (общий маркер макрофагов) и mouse anti-Rat CD163 Clone ED2 (маркер противовоспалительных альтернативно активированных макрофагов M2).

10. Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

У животных контрольной и опытной групп методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в реальном времени (qPCR) в гомогенате ободочной кишки (пристеночная микрофлора) определяли содержание микроорганизмов отдела *Fermicutes* и типа *Bacteroidetes*, а в кале (просветная микрофлора) - микроорганизмов отдела *Fermicutes*, типа *Bacteroidetes*, а также *Akkermansia muciniphila* (тип *Verrucomicrobia*).

Суммарную РНК выделяли из ткани дистального отдела толстого кишечника с реагентом Extract RNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием наборов Реверта L (ИнтерЛаб Сервис, Россия). ДНК из фекалий выделяли сорбционным методом с использованием набора фирмы Изоген Diatom DNA Prep 200 (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Перед постановкой реакции qPCR образцы ДНК нормализовали по концентрации. Концентрацию ДНК (в нг/мкл) определяли на спектрофотометре BioSpec-nano (Shimadzu, Япония). В реакции количественной ПЦР применяли готовую смесь qPCR HS, содержащую интеркалирующий краситель SYBR Green I, (Евроген, Россия). ПЦР

проводили на детектирующем амплификаторе со встроенным программным обеспечением для первичной обработки показателей Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Для определения микроорганизмов, относящихся к роду *Bacteroides*, использовали праймеры (F: gag agg aag gtc ccc cac и R: cgc tac ttg gct ggt cag) и программу амплификации, предложенные X. Guo et al. (2008), для определения представителей отдела *Fermicutes* - F: gac gcc gcg tga agg a и R: agc ccc agc ctt tca cat c (Ley R.E. et al., 2005), а для *A. muciniphila* - F: cct tgc ggt tgg ctt cag at и R: CAG CAC gtg aag gtg ggg ac (Li J. et al., 2016). Образцы ДНК нормировали по контрольному гену домашнего хозяйства 18S rRNA, последовательности праймеров для которого: acg gac cag agc gaa agc at и tgt caa tcc tgt ccg tgt cc. Праймеры были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия). О содержании матрицы судили по величине порогового цикла в реакции qPCR.

11. Статистические методы

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США), с учетом характера распределения (по результатам теста χ^2), параметрическими (t-критерий Стьюдента) и непараметрическими методами (U-критерий Манн-Уитни) руководствуясь методическим пособием С.Э. Мастицкого (2009) по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. ХАРАКТЕРИСТИКА МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНОГО ОЖИРЕНИЯ ПО МАССОМЕТРИЧЕСКИМ, БИОХИМИЧЕСКИМ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИМ ПАРАМЕТРАМ И МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПРОЯВЛЕНИЯМ

Для моделирования алиментарного ожирения животные были разделены на две рандомизированные группы. Животные контрольной группы получали стандартный корм ПК-120-1 (ООО “Лабораторснаб”, сертификат соответствия № РОСС RU.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92), а опытной группы – рацион, обогащенный углеводами (фруктоза и белый хлеб) и жирами (пальмовое масло рафинированное дезодорированное отбеленное; ТУ 9141-064-57710951-2013; ООО “ЭФКО Пищевые Ингредиенты”). Энергетическая ценность корма у животных опытной группы была в 1,5 раза выше, чем у контрольной, причем почти 50% калорий крысы опытной группы получали за счет жиров. Содержание жиров в рационе у крыс опытной группы было увеличено в 20 раз по сравнению с рационом контрольной группы (табл. 1). Длительность эксперимента составила 40 недель.

Массометрические показатели крыс Спрейг-Доули контрольной и опытной группы

Масса тела крыс в начале эксперимента составила 204 ± 30 г. После рандомизации масса тела животных в контрольной ($n=20$) и опытной ($n=30$) группах составляла $198,5 \pm 42,2$ и $208,3 \pm 15,6$ г., соответственно ($p = 0,2$). За 40 недель эксперимента масса тела крыс контрольной группы увеличилась в 2,7 раз и составила $542,8 \pm 57,7$, а опытной - в 3 раза и составила $628,3 \pm 89,4$ г. ($p = 0,0005$; табл. 3). Экспериментальные группы различались по массе тела на 15,8%. Внешний вид животных контрольной и опытной групп представлен на фотографии (рис. 3).

Следует отметить, что в первые 3 недели эксперимента масса тела крыс опытной группы достоверно уменьшилась по сравнению с контрольной, что

связано с введением нового для животных рациона, обогащенного углеводами и жирами (табл. 1, табл. 3, рис. 2). В период с 9 по 17 неделю наблюдалась тенденция к увеличению массы тела у животных опытной группы по сравнению с контрольной, но статистически значимых различий не выявлено. Начиная с 22 недели, масса тела у животных опытной группы стала достоверно выше, чем в контрольной.

Индекс массы тела (ИМТ) – отношение массы тела в граммах к квадрату показателя длины тела в сантиметрах. Начиная с 9 недели эксперимента, значения ИМТ у крыс опытной группы были статистически значимо выше, чем у животных контрольной группы (табл. 4; рис. 4). В конце эксперимента крысы обеих групп были ранжированы по ИМТ. Для дальнейшей работы в контрольной группе были отобраны 10 крыс со средним показателем ИМТ по группе, а в опытной - 12 животных с максимальным ИМТ (табл. 2) и сформированы итоговые экспериментальные группы: контрольная и с ожирением.

После отбора животных, устойчивых и неустойчивых к высококалорийному рациону, в итоговых экспериментальных группах масса тела у крыс с ожирением (n=11) была выше, чем в контрольной группе (n=9) на 18% и составила 699 (657; 728) и 564 (508; 609) г., соответственно (рис. 5, табл. 5). Медиана значений ИМТ у животных контрольной группы была меньше, чем при ожирении на 24% и составили 0,87 (0,81; 0,87) и 1,02 (0,97; 1,05) усл. ед. соответственно (рис. 5, табл. 5).

Массометрические показатели внутренних органов крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

После выведения из эксперимента крыс Спрейг-Доули контрольной группы (n=9) и с ожирением (n=11) определяли массу жировой ткани, окружающей придаток правого семенника, печени, сердца и обоих семенников. Вычисляли индекс массы данных органов - отношение массы органа к массе тела.

Масса жировой ткани, окружающей придаток семенника, у животных с ожирением увеличилась в 2,2 раза по сравнению с контрольной группой и была равна 11,5 (10,6; 12,9) и 5,3 (4,5; 5,8) г. соответственно ($p = 0,0002$), а индекс массы жировой ткани, окружающей придаток семенника, повысился на 81% ($p = 0,0003$; табл. 5).

У крыс с ожирением увеличилась масса печени на 35,4% и была 19,9 (17,4; 21,5) г., тогда как в контрольной группе она составила 14,7 (13,4; 17) г. ($p = 0,0109$). По индексу массы печени статистически значимых различий показателей не выявлено. Масса сердца изменилась на 20%: в контрольной группе она была равна 1,5 (1,4; 1,6) г., а при ожирении – 1,8 (1,7; 1,9) г. ($p = 0,0383$), по индексу массы сердца статистически значимых различий показателей не выявлено.

Показатели массы семенников в сравниваемых группах статистически значимо не различались, но индекс массы семенников в опытной группе по сравнению с контрольной был ниже на 15% ($p = 0,0033$; табл. 5).

Таким образом, за 40 недель эксперимента масса тела животных контрольной группы ($n=20$) увеличилась в 2,7, а опытной ($n=30$) - в 3 раза, они различались по массе тела на 15,8%.

После отбора животных, устойчивых и неустойчивых к высококалорийному рациону, масса тела у крыс с ожирением ($n=11$) была выше, чем в контрольной группе ($n=9$) на 18%. Значения ИМТ у животных контрольной группы были меньше, чем у крыс с ожирением на 24%.

У животных с ожирением по сравнению с контрольной группой увеличилась масса жировой ткани, окружающей придаток семенника, в 2,2 раза, а индекс массы жировой ткани - на 81%. Масса печени и сердца повысились соответственно на, 35,4 и 20%. Индекс массы семенников в опытной группе по сравнению с контрольной был ниже на 15%.

Таблица 3

Масса тела в г. у крыс Спрейг-Доули контрольной и опытной группы в разные сроки эксперимента; $M \pm SE$

Сроки эксперимента	Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
	Контрольная (n=20)	Опытная (n=30)	
0 неделя	198,5 $\pm$ 42,2	208,3 $\pm$ 15,6	0,211755
1 неделя	256,9 $\pm$ 39,5	207,5 $\pm$ 18,3	0,000001
3 неделя	306,2 $\pm$ 34,9	283,6 $\pm$ 23,7	0,003713
9 неделя	376,4 $\pm$ 33,8	374,3 $\pm$ 33,2	0,809425
10 неделя	373,8 $\pm$ 35,8	390, 7 $\pm$ 39,4	0,091522
14 неделя	398,3 $\pm$ 38,5	417,0 $\pm$ 50,0	0,118136
17 неделя	404,4 $\pm$ 35,5	425,7 $\pm$ 55,6	0,092651
22 неделя	432,2 $\pm$ 45,5	477,8 $\pm$ 58,0	0,001777
34 неделя	527,1 $\pm$ 52,4	576,8 $\pm$ 98,1	0,048795
41 неделя	542,8 $\pm$ 57,7	628,3 $\pm$ 89,4	0,000528

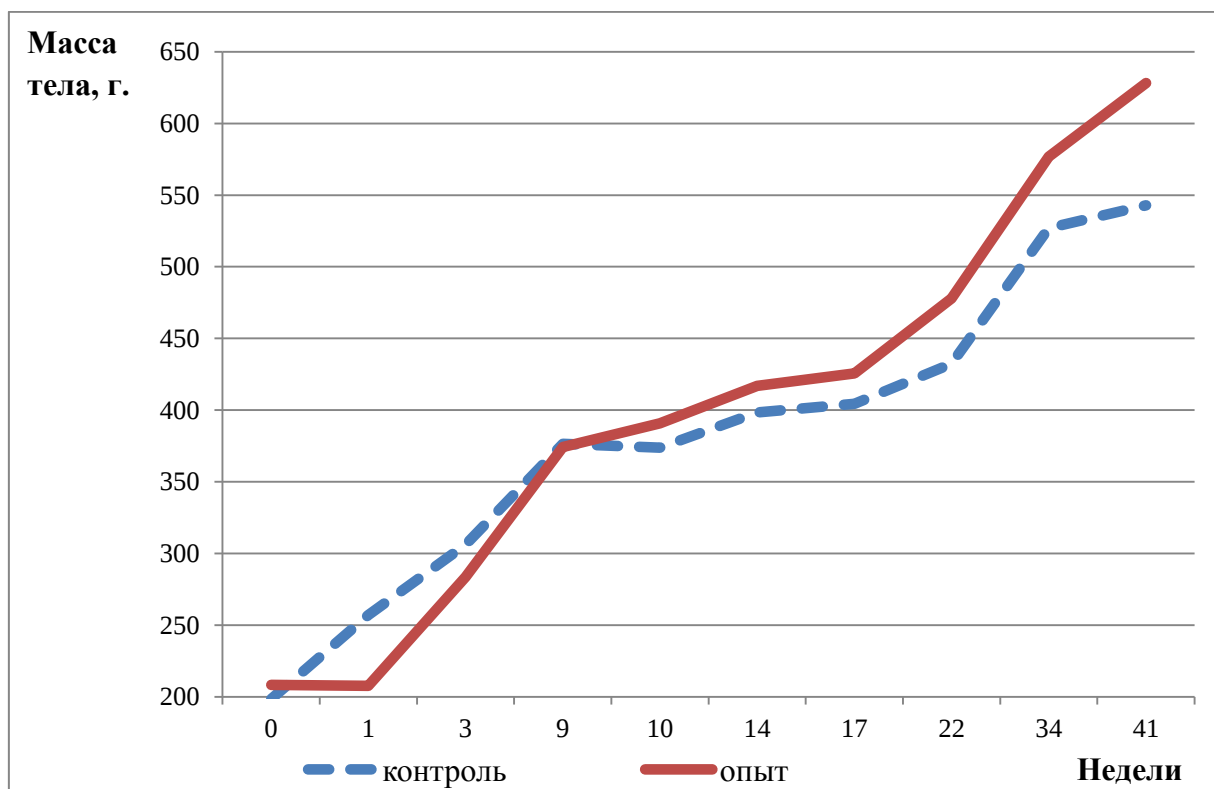


Рисунок 2. Изменения массы тела в разные сроки эксперимента у крыс Спрейг-Доули контрольной (n=20) и опытной (n=30) группы



Рисунок 3. Внешний вид животных контрольной и опытной групп

Таблица 4

Показатели индекса массы тела у крыс Спрейг-Доули контрольной и опытной групп в разные сроки эксперимента; $M \pm SE$

Сроки	ИМТ в усл. ед.		Доверительная вероятность (p)
	Группа наблюдения		
	Контрольная (n=20)	Опытная (n=30)	
9 неделя	0,69 ± 0,05	0,73 ± 0,05	0,001262
17 неделя	0,68 ± 0,04	0,75 ± 0,07	0,000018
22 неделя	0,74 ± 0,06	0,81 ± 0,07	0,000267
41 неделя	0,82 ± 0,06	0,95 ± 0,10	0,000009

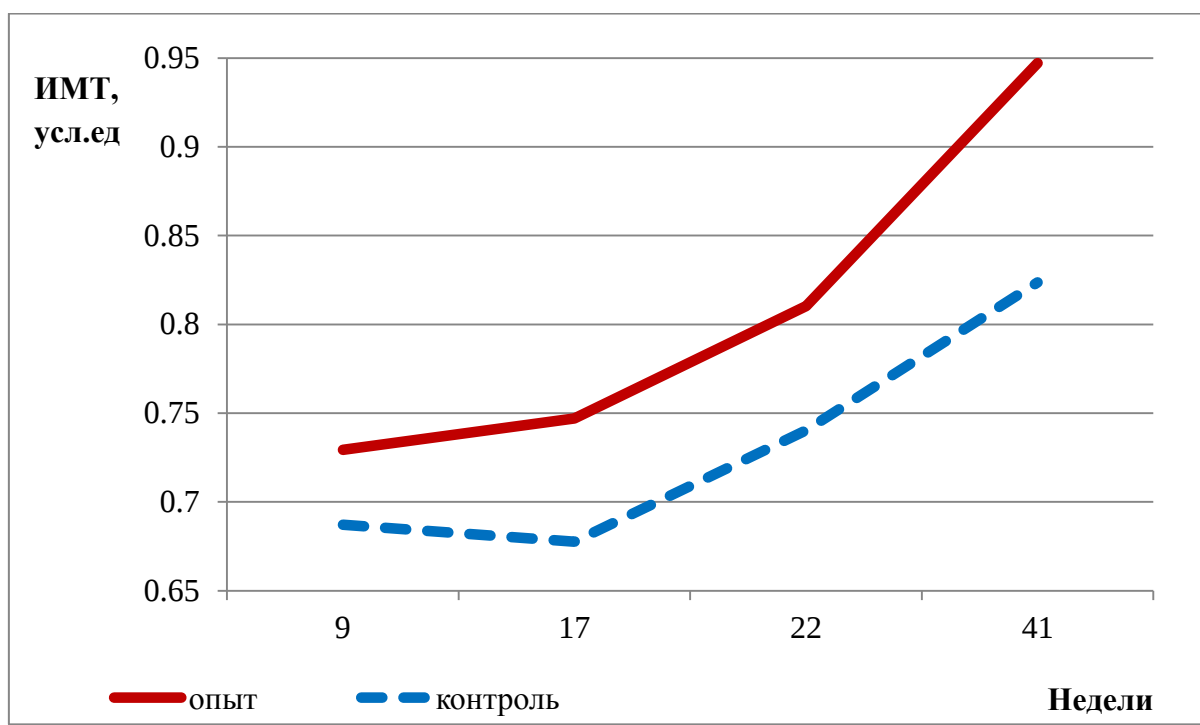


Рисунок 4. Динамика показателей индекса массы тела у крыс Спрейг-Доули контрольной (n=20) и опытной (n=30) группы

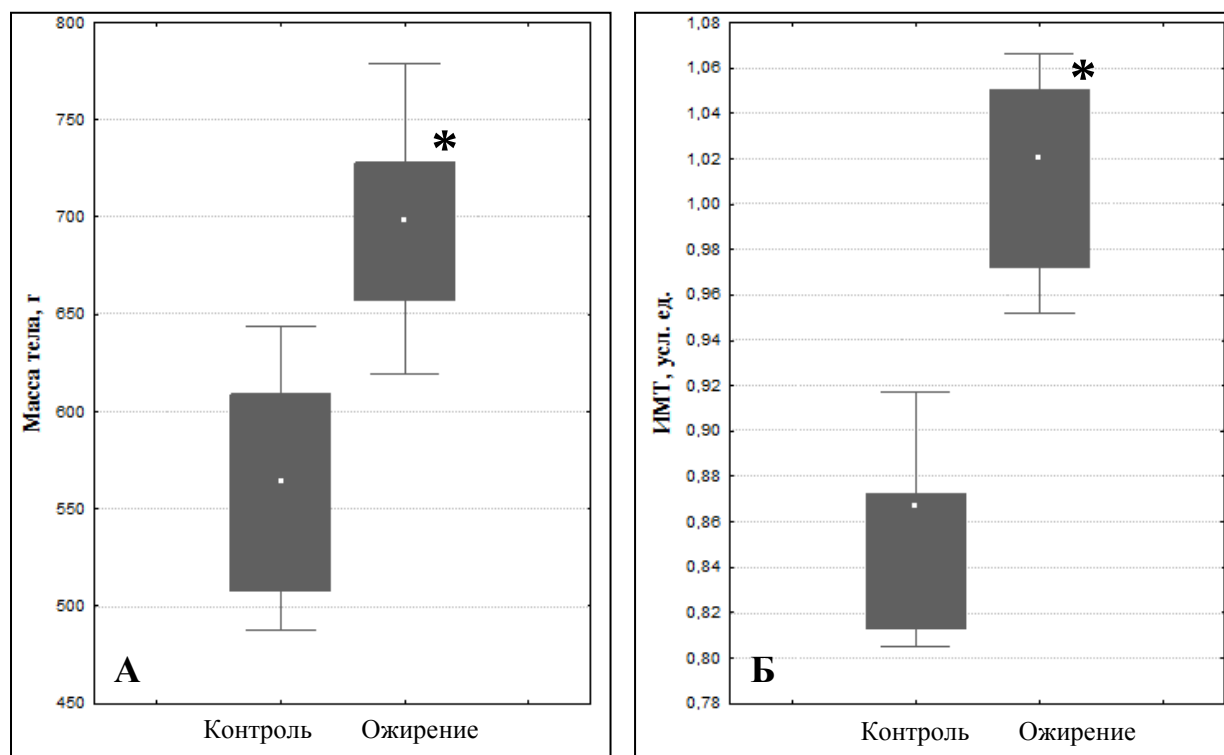


Рисунок 5. Масса тела (А) и ИМТ (Б) у крыс Спрейг-Дули контрольной группы и с ожирением в конце эксперимента; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

Таблица 5

Массометрические показатели крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметры	Группа наблюдения		Различия показателей между группами в %	Доверительная вероятность (p)
	Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)		
Масса тела, г.	564 (508; 609)	699 (657; 728)	18%	0,0008
ИМТ, усл.ед.	0,867 (0,813; 0,872)	1,02 (0,97; 1,05)	24%	0,0002
Масса жировой ткани, окружающей придаток семенника, г.	5,3 (4,5; 5,8)	11,5 (10,6; 12,9)	117%	0,0002
Индекс массы жировой ткани, окружающей придаток семенника, усл. ед. (×1000)	9,5 (8,1; 10,6)	17,2 (16,2; 19,1)	81%	0,0003
Масса семенников, г.	3,9 (3,8; 4,0)	3,8 (3,6; 4,1)	-	0,9349
Индекс массы семенников, усл. ед. (×1000)	6,7 (6,3; 7,5)	5,3 (5,2; 6,1)	- 15%	0,0033
Масса сердца, г.	1,5 (1,4; 1,6)	1,8 (1,7; 1,9)	20%	0,0383
Индекс массы сердца, усл. ед. (×1000)	2,7 (2,5; 2,9)	2,5 (2,3; 2,9)	-	0,4751
Масса печени, г.	14,7 (13,4; 17)	19,9 (17,4; 21,5)	35,4%	0,0109
Индекс массы печени, усл. ед. (×100)	2,7 (2,5; 2,9)	2,8 (2,6; 3)	-	0,4179

Морфологическая характеристика внутренних органов у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

Проводили морфологическое исследование печени, поджелудочной железы, сердца и жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной и опытной групп. На микрофотографиях гистологических срезов жировой ткани, окружающей придаток семенника, измеряли абсолютные показатели площади срезов адипоцитов в программе PhotoM 1.21.

В печени у животных контрольной группы дольковое и балочное строение было сохранено (рис. 6 А, В). У 8 из 9 животных все гепатоциты с мелкой базофильной зернистостью. По ходу балок выявлялись диффузно рассеянные лимфоциты и макрофаги. В соединительной ткани, окружающей триады, присутствовали единичные лимфоциты и гистиоциты. У 1 из 9 животных в центральных отделах долек определялись единичные гепатоциты с мелкими и средними вакуолями в цитоплазме.

Эпителий ацинусов поджелудочной железы с мелкозернистой цитоплазмой. Внутريدольковая строма представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью. Островки Лангерганса с неравномерным расширением капиллярных петель без разрастаний соединительной ткани. Междольковая соединительная ткань рыхлая, в ней определялись единичные в препарате адипоциты (рис. 6Д). У 2 животных из 9 в дольках были выявлены единичные в препарате небольшие очаговые скопления лимфоцитов и гистиоцитов.

Камеры и клапаны сердца у всех животных контрольной группы выстланы уплощенным эндотелием. Эндокард и клапаны образованы соединительной тканью с упорядоченным ходом коллагеновых волокон, фиброцитами и фибробластами. В миокарде сосуды неравномерно полнокровны (рис. 7 А). Кардиомиоциты с сохраненной поперечной исчерченностью. Эпикард, окружающий все камеры сердца и правый

желудочек, образован тонкой полосой рыхлой соединительной ткани, в которой выделяются фибробласты, фиброциты и единичные лимфоциты. В жировой ткани предсердно-желудочковой борозды определяются скопления адипоцитов.

В жировой ткани, окружающей придаток семенника, у всех животных контрольной группы адипоциты многоугольной формы (рис. 8 А, 9 А, В). Средний показатель площади их срезов составил 6039 (5723; 8820) мкм^2 (табл. 6, рис. 10). Между адипоцитами выявлялись единичные диффузно рассеянные лимфоциты и макрофаги (рис. 8 А, 9 А, В).

При морфологическом исследовании у крыс опытной группы была выявлена жировая дистрофия печени от минимально до максимально выраженной. В поджелудочной железе – слабо и умеренно выраженный липоматоз, в жировой ткани адипоциты были крупные и выявлялись многочисленные короноподобные структуры – скопления макрофагов и лимфоцитов вокруг адипоцитов. По сравнению с контрольной группой показатель площади среза адипоцитов в жировой ткани был увеличен в 2 раза.

В печени у 8 из 11 животных с ожирением была выявлена умеренно, а у 3 – слабо выраженная жировая дистрофия. Гепатоциты с мелкими, средними и крупными суданофильными вакуолями (рис. 6 В, Г). По ходу балок отмечалось увеличение количества неэпителиальных клеточных элементов, представленных макрофагами, эндотелиоцитами и лимфоцитами.

В поджелудочной железе по ходу междольковой и внутريدольковой соединительной ткани выявлялись скопления крупных адипоцитов. У 6 из 11 животных был слабо выраженный липоматоз (единичные жировые клетки во внутريدольковой соединительной ткани), а у 5 - умеренно выраженный (многочисленные жировые клетки во внутريدольковой соединительной ткани) (рис. 6 Е). Также, у 2 животных – определялись единичные в

препарате небольшие очаги фиброза с очаговыми скоплениями в них лимфоцитов и гистиоцитов.

В сердце у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой при микроскопическом исследовании каких-либо различий не выявлено (рис 7 Б). В жировой ткани предсердно-желудочковой борозды определяются скопления адипоцитов с единичными короноподобными структурами (рис. 7 В).

В жировой ткани, окружающей придаток семенника, у животных опытной группы адипоциты были многоугольной формы (рис. 8). По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением адипоциты были увеличены в размерах, и средняя площадь их среза была в два раза больше, чем в контрольной группе (табл. 6, рис. 10). Вокруг части адипоцитов определялись скопления макрофагов и лимфоцитов – так называемые, короноподобные структуры (рис. 9 Б, Г, Д, Е).

Таким образом, при морфологическом исследовании у крыс с ожирением выявлена жировая дистрофия печени, липоматоз поджелудочной железы, короноподобные структуры в жировой ткани – скопления макрофагов и лимфоцитов вокруг адипоцитов. По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением площадь среза адипоцитов была увеличена в 2 раза.

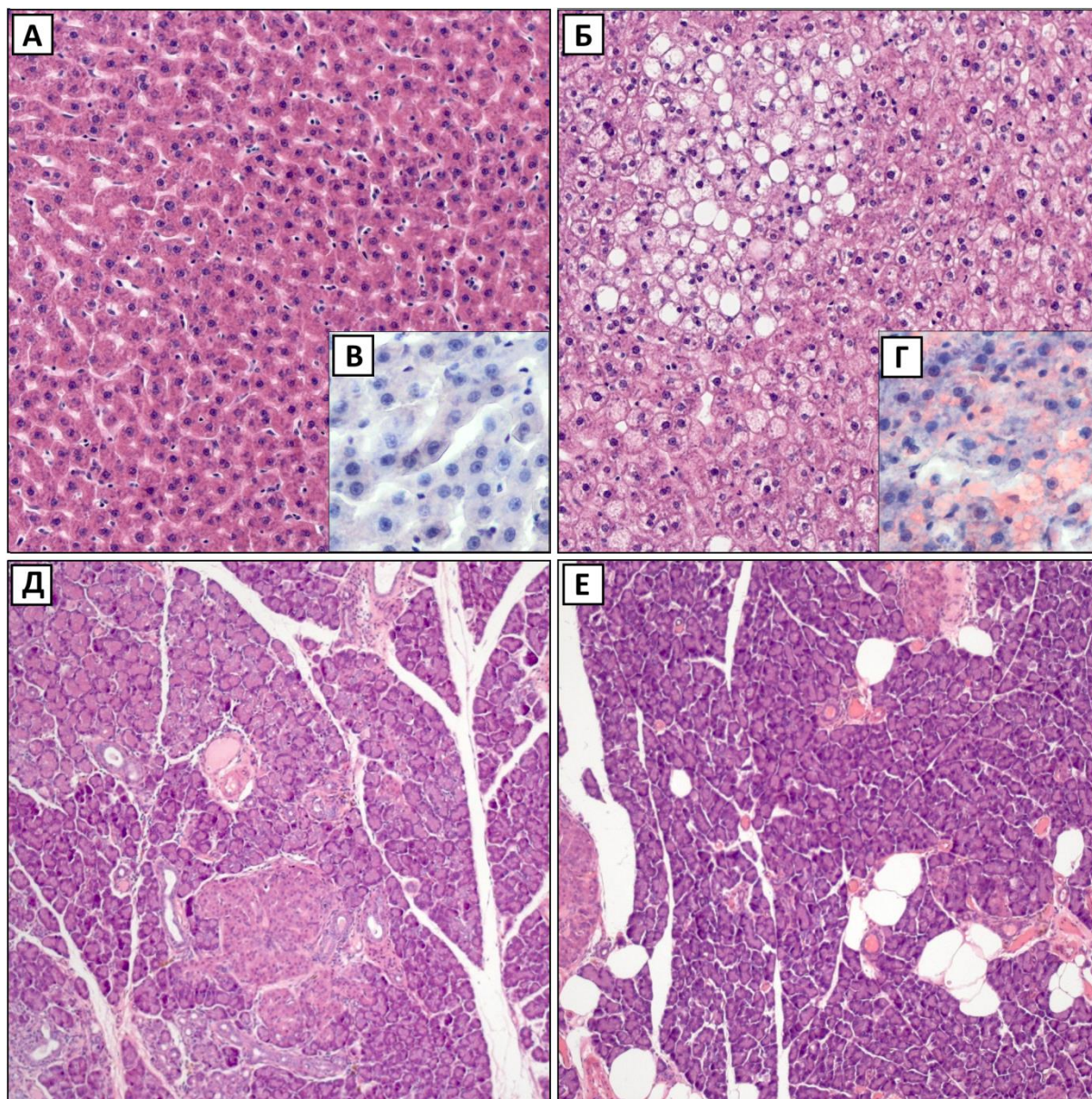


Рисунок 6. Морфологическая характеристика печени (А, Б, В, Г) и поджелудочной железы (Д, Е) у крыс контрольной группы (А, В, Д) и с ожирением (Б, Г, Е). А - гепатоциты с мелкой базофильной зернистостью. Б – гепатоциты с мелко-, средне- и крупнокапельной жировой дистрофией. Д – дольки поджелудочной железы окружены рыхлой волокнистой соединительной тканью, островки Лангерганса. Е – жировые клетки во внутريدольковой и междольковой соединительной ткани. Окраска гематоксилином и эозином (А, Б, Д, Е); суданом III (В,Г). Ув. А, Б, В, Г 200; Ув. Д, Е 100.

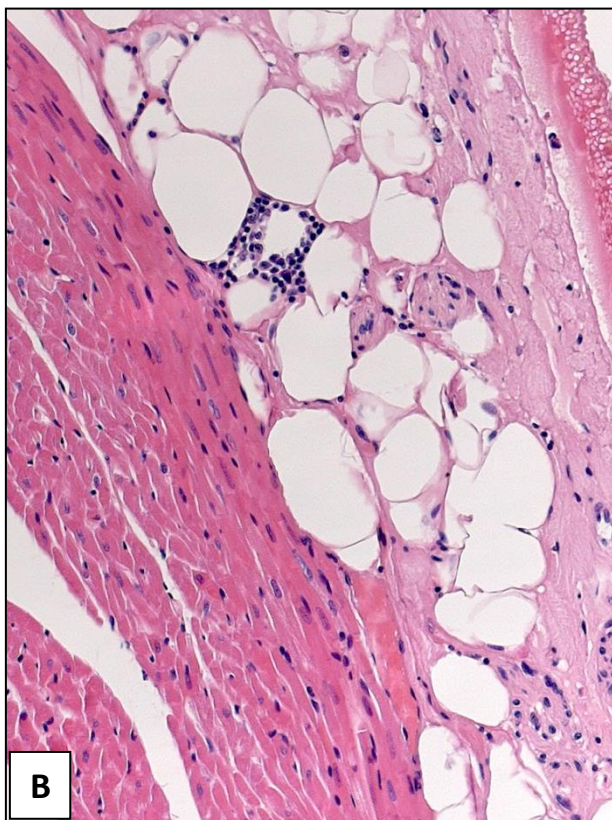
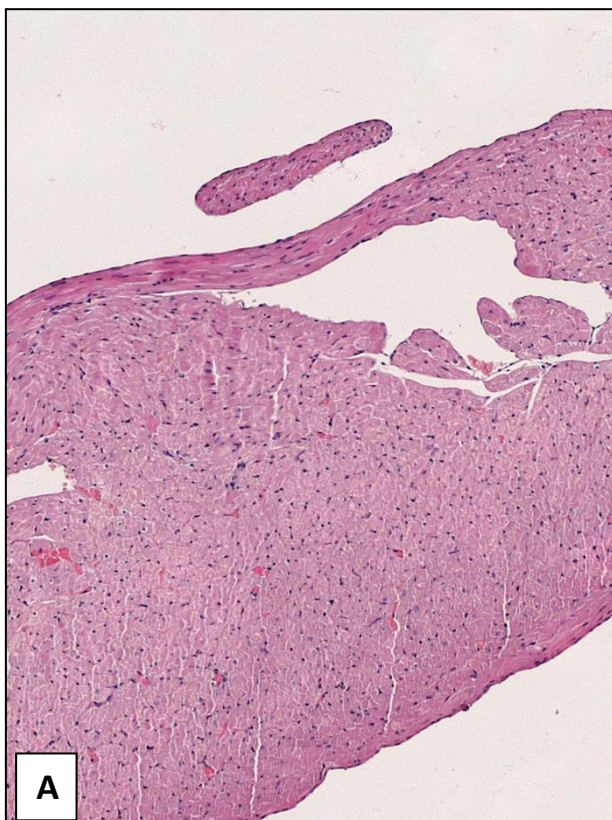


Рисунок 7. Сердце крыс контрольной группы (А) и при ожирении (Б, В). А, Б - стенка правого желудочка сердца. В - жировая ткань предсердно-желудочковой борозды со скоплением адипоцитов и единичной коронообразной структурой. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б $\times 100$, В $\times 200$.

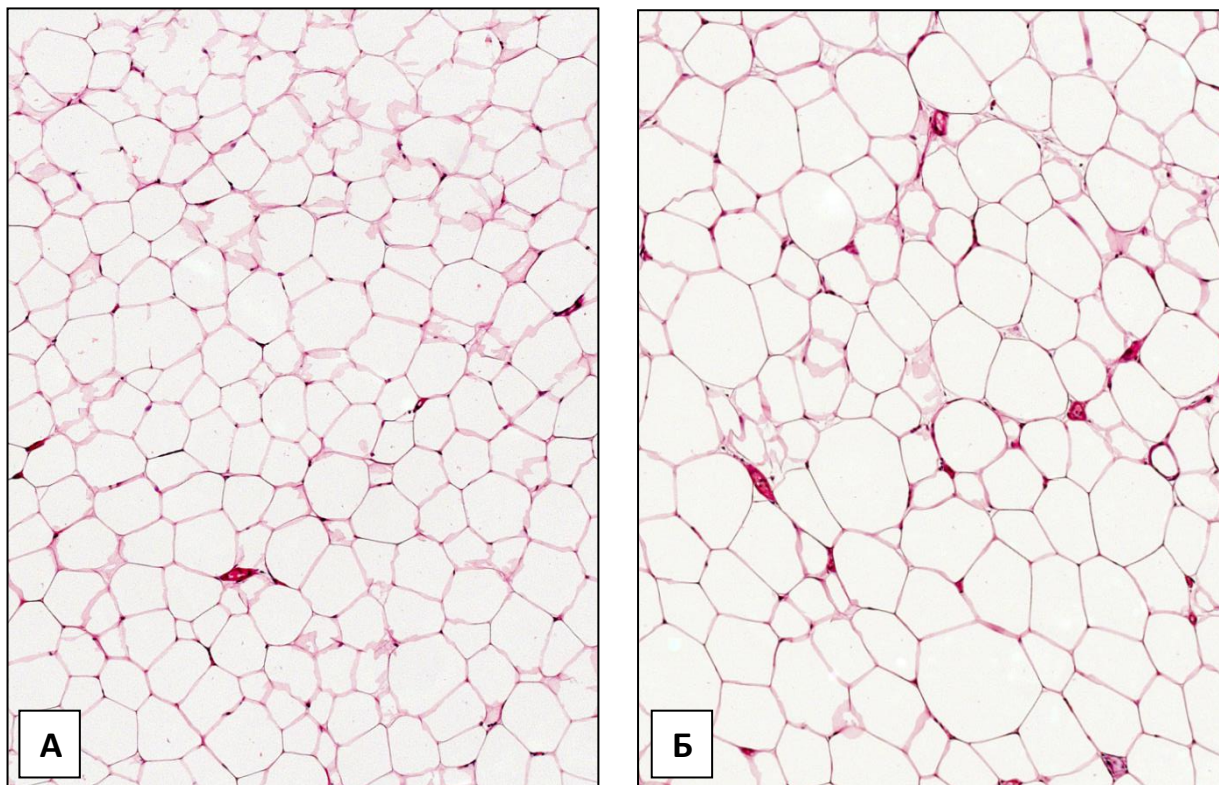


Рисунок 8. Жировая ткань, окружающая придаток семенника, у крыс контрольной группы (А) и при ожирении (Б). А - адипоциты многоугольной формы. Б – гипертрофированные адипоциты многоугольной формы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

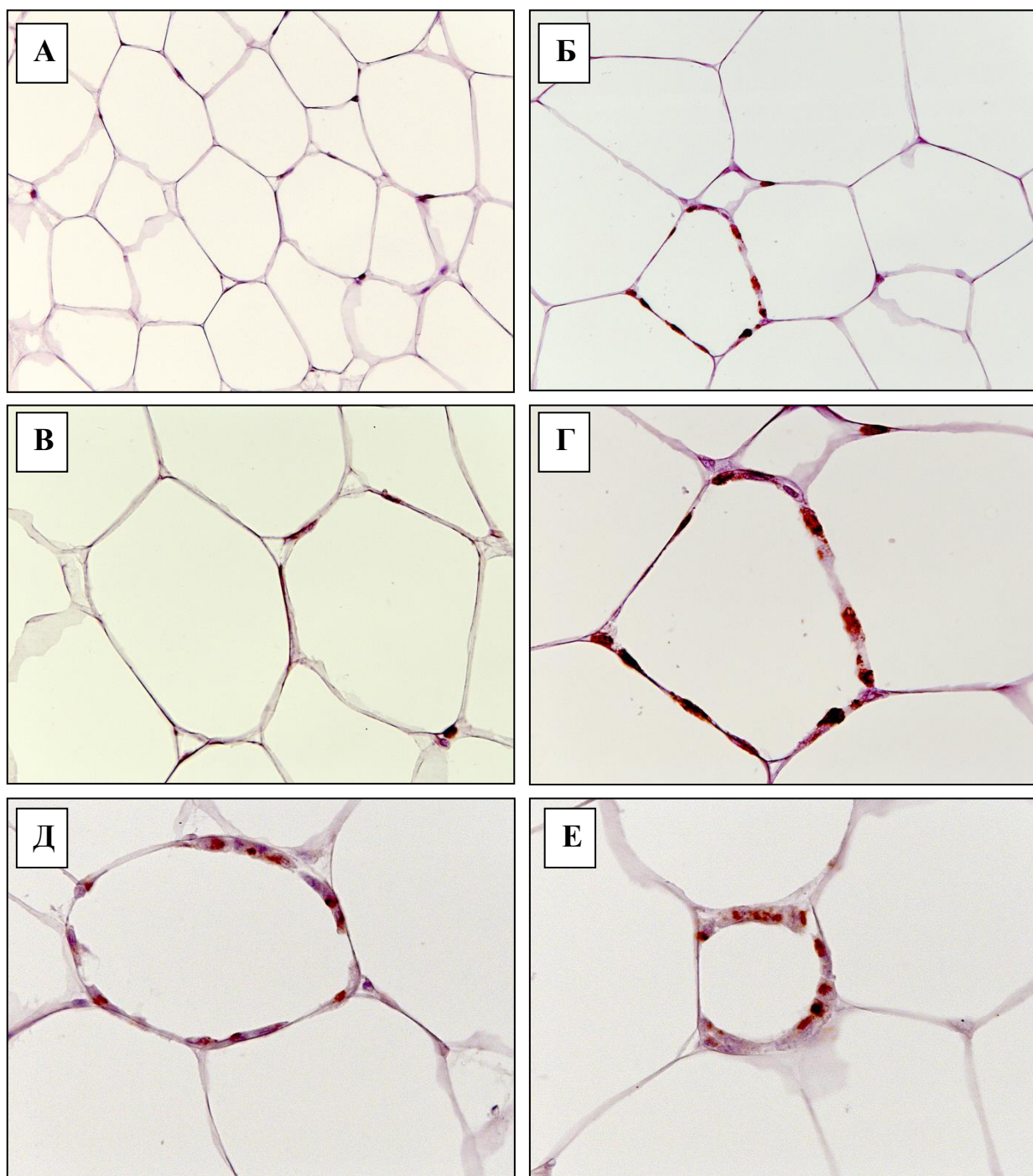


Рисунок 9. Жировая ткань, окружающая придаток семенника, у крыс контрольной группы (А, В) и при ожирении (Б, Г, Д, Е). А - адипоциты многоугольной формы. В - единичные макрофаги. Б – гипертрофированные адипоциты многоугольной формы. Г, Д, Е – короноподобные структуры с многочисленными CD68+ макрофагами. Реакция с антителами к CD68. Гематоксилин Майера. А, Б $\times 320$; В, Г, Д, Е $\times 640$.

Таблица 6

Показатели площади срезов адипоцитов в жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметр	Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
	Контрольная (n=9)	Ожирение (n=11)	
Площадь срезов адипоцитов, мкм ²	6039 (5723; 8820)	12928 (12227; 14139)	0,00085

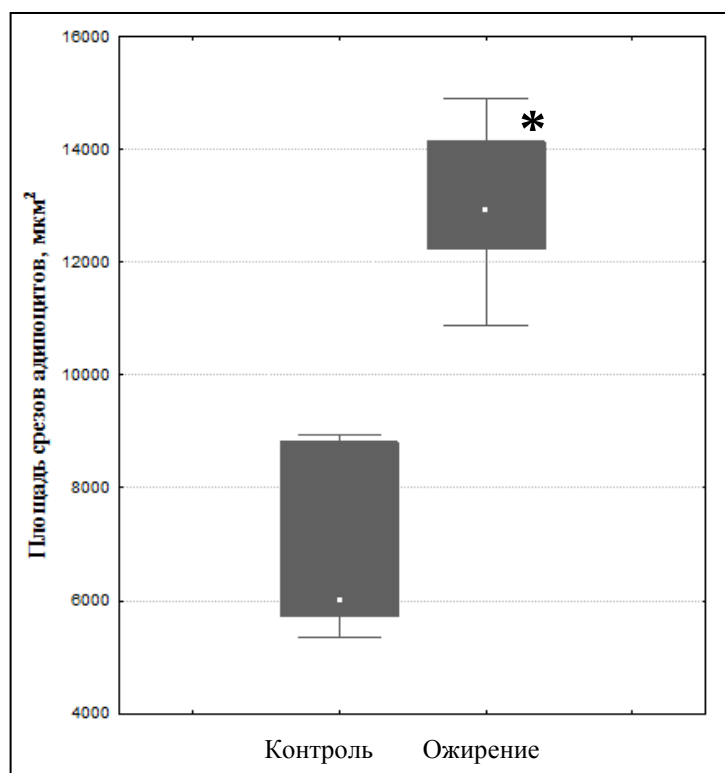


Рисунок 10. Показатели площади срезов адипоцитов в жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

Биохимические показатели крови у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

В сыворотке крови у крыс контрольной и опытной группы определяли уровень АСТ, АЛТ, глюкозы, α -амилазы, триглицеридов, холестерина, ЛПНП и ЛПВП.

В литературе широко представлены данные биохимических показателей у крыс Спрейг-Доули в норме в возрасте 2, 6, 12 и 13 недель. Однако сравнивать эти нормативы с показателями, полученными в нашем эксперименте, недостаточно корректно, так как в нашей работе возраст животных при выведении из эксперимента достигал 47 недель.

По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением концентрация триглицеридов в сыворотке крови было выше на 39% (табл. 7, рис. 11 В). Уровень общего холестерина у крыс с ожирением снизился на 16% по сравнению с контрольной группой (табл. 7, рис. 11 Г). Также, в экспериментальных группах не было выявлено достоверных различий по содержанию в сыворотке крови ЛПВП и ЛПНП (табл. 7).

Концентрация глюкозы в сыворотке крови у крыс с ожирением повышалась по сравнению с контрольной группой (табл. 7, рис. 11 Б) и была равна, соответственно, 9,8 (8,6; 10,7) и 8,5 (7,8; 9,43) ммоль/л, однако различий этого показателя не выявлено ($p=0,2741$). Различий концентрации α -амилазы в сыворотке крови в сравниваемых группах не обнаружено (табл. 7).

У крыс с ожирением было выявлено снижение активности в сыворотке крови АЛТ и тенденция к снижению активности АСТ, а показатель их соотношения (коэффициент де Ритиса) не изменился (табл. 7, рис. 11 А).

Таким образом, у крыс с ожирением в сыворотке крови выявлено повышение концентрации триглицеридов и снижение содержания холестерина и активности АЛТ.

Таблица 7

Биохимические показатели у крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметры	Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
	Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
АСТ, ед/л	119,1 (84,2; 178)	90,2 (72,1; 95,3)	0,0971
АЛТ, ед/л	50,6 (47,4; 53,0)	36,8 (29,8; 40,2)	0,0004
Глюкоза, ммоль/л	8,5 (7,8; 9,43)	9,8 (8,6; 10,7)	0,2741
α -амилаза, ед/л	731 (657,5; 794)	788 (692; 848,5)	0,3226
Триглицериды, ммоль/л	1,33 (1,25; 1,69)	1,85 (1,48; 2,4)	0,0501
Холестерин, ммоль/л	2,52 (2,37; 2,79)	2,17 (1,91; 2,31)	0,0210
ЛПНП, ммоль/л	0,22 (0,18; 0,32)	0,23 (0,21; 0,3)	0,6444
ЛПВП, ммоль/л	0,54 (0,46; 0,64)	0,54 (0,46; 0,6)	0,7667
Коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ)	2,28 (2,09; 3,33)	2,51 (2,26; 2,82)	0,5529

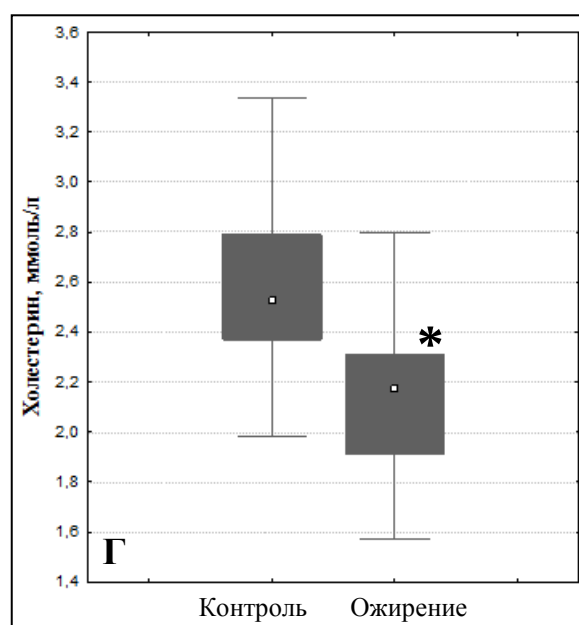
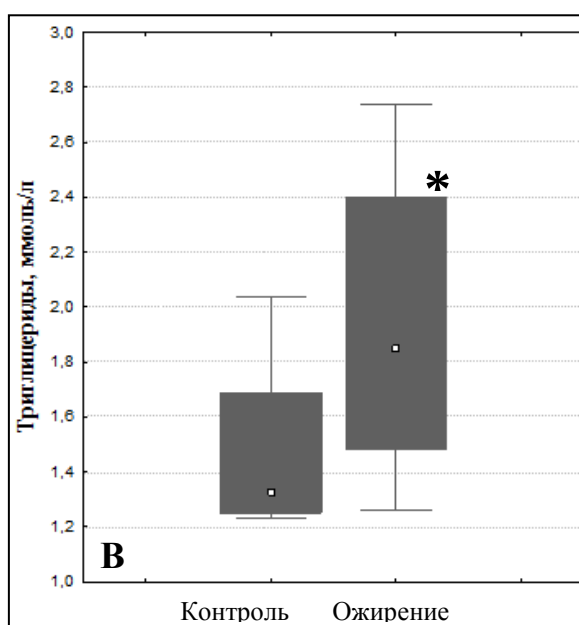
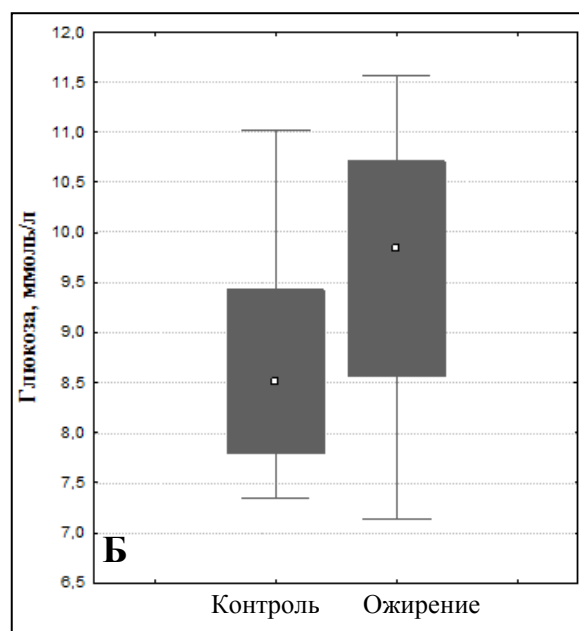
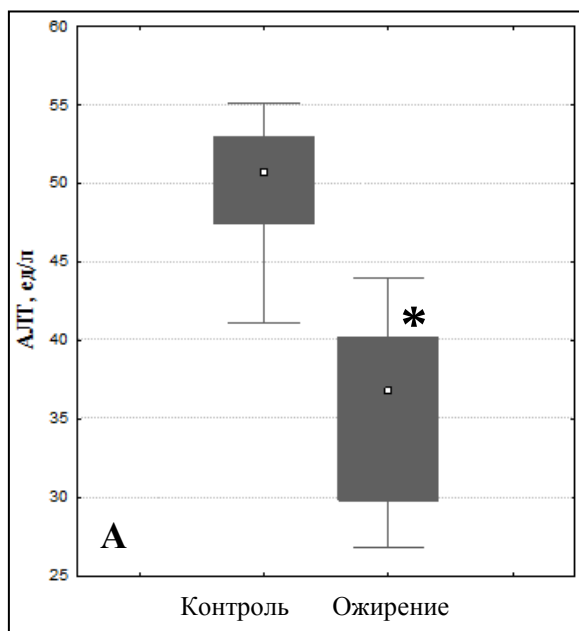


Рисунок 11. Биохимические показатели у крыс контрольной группы и с ожирением. А – АЛТ; Б – глюкоза; В – триглицериды; Г – холестерин; Ме (25L; 75U). * – $p \leq 0.05$

Уровень стероидных гормонов, инсулина и факторов роста в сыворотке крови у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

В сыворотке крови у крыс контрольной и опытной группы с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА) определяли уровень стероидных гормонов (общего и свободного тестостерона, эстрадиола и кортизола), а также инсулина и факторов роста -IGF-1 и EGF.

В сыворотке крови у крыс с ожирением по сравнению с контролем повышался показатель содержания инсулина в 2.8 раза (табл. 8, рис. 12 А).

Содержание стероидных половых гормонов - общего и свободного тестостерона, а также эстрадиола - у крыс с ожирением статистически значимо снижалось по сравнению с контрольной группой (табл. 8, рис. 13). Однако концентрация другого стероидного гормона - кортикостерона у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой повышалась ($p = 0,051$; табл. 8, рис. 12 Б).

В сравниваемых группах не выявлено статистически значимых различий содержания в сыворотке крови IGF-1 и EGF (табл. 8).

Таким образом, у крыс с ожирением в сыворотке крови выявлено повышение содержания кортикостерона и снижение концентрации половых стероидных гормонов – эстрадиола, общего и свободного тестостерона.

Таблица 8

Содержание стероидных гормонов, инсулина и факторов роста в сыворотке крови у крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметры	Группа наблюдения		Доверительная вероятность (р)
	Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
Общий тестостерон, нг/мл	1,53 (1,16; 1,95)	0,89 (0,41; 1,07)	0,033
Свободный тестостерон, нг/мл	4,26 (2,37; 4,44)	1,33 (0,81; 2,13)	0,033
Эстрадиол, пг/мл	61,9 (38,7; 71,8)	18,6 (11,4; 46,6)	0,006
Кортикостерон, нмоль/л	375,9 (274,3; 410,3)	443,1 (419; 513,8)	0,0509
Инсулин, нмоль/л	1,22 (1,10; 1,44)	3,4 (2,17; 3,6)	0,003
IGF-1, нг/мл	1475 (1344; 1552)	1410 (1187; 1678)	0,553
EGF, пг/мл	59 (34; 69)	41 (32; 112)	0,895

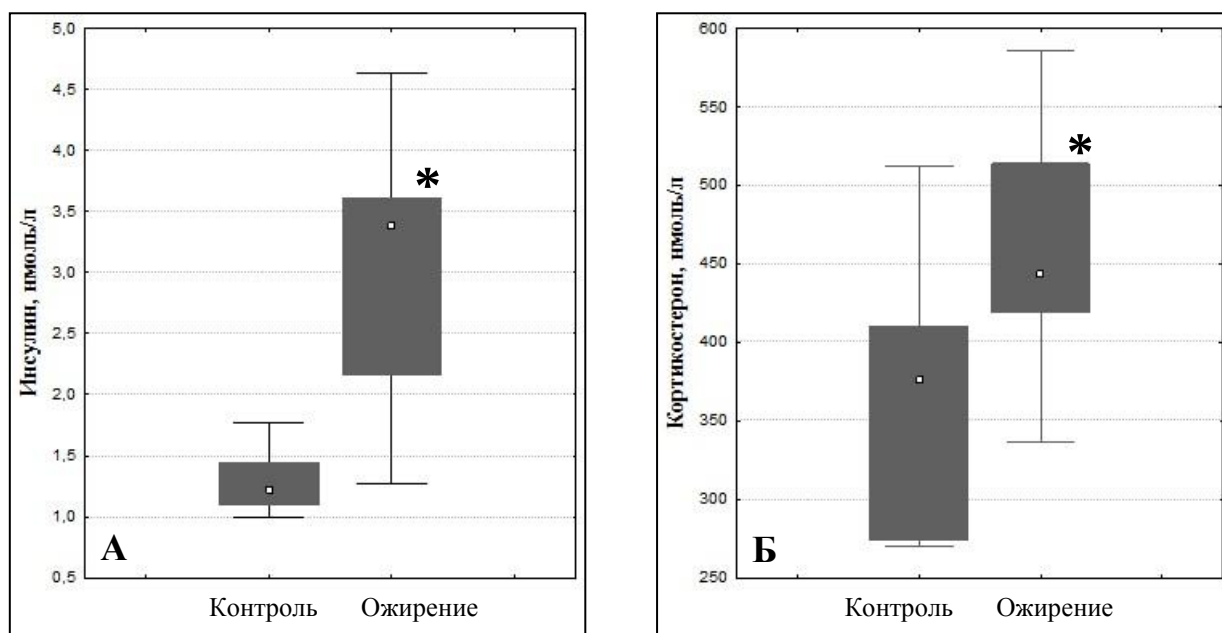


Рисунок 12. Содержание инсулина (А) и кортикостерона (Б) в сыворотке крови у крыс контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

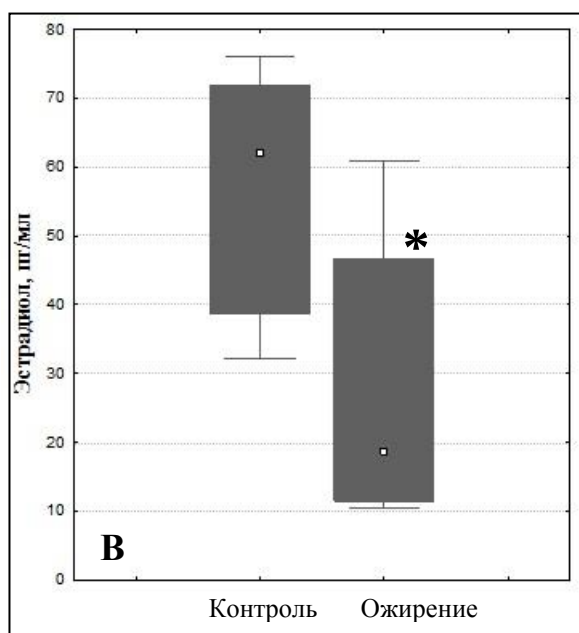
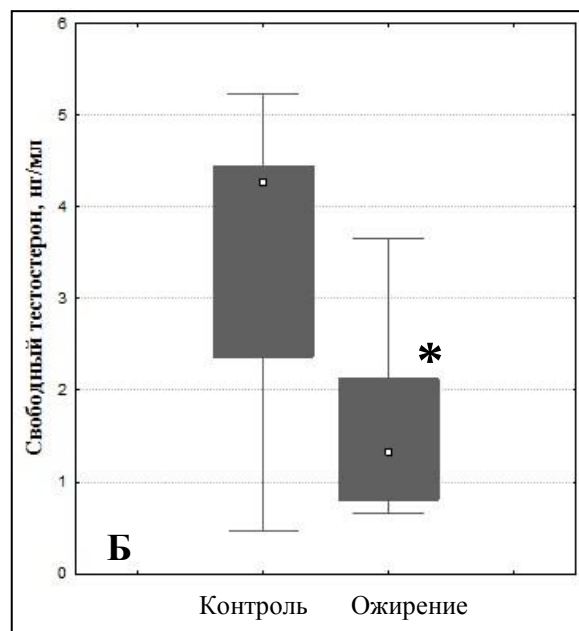
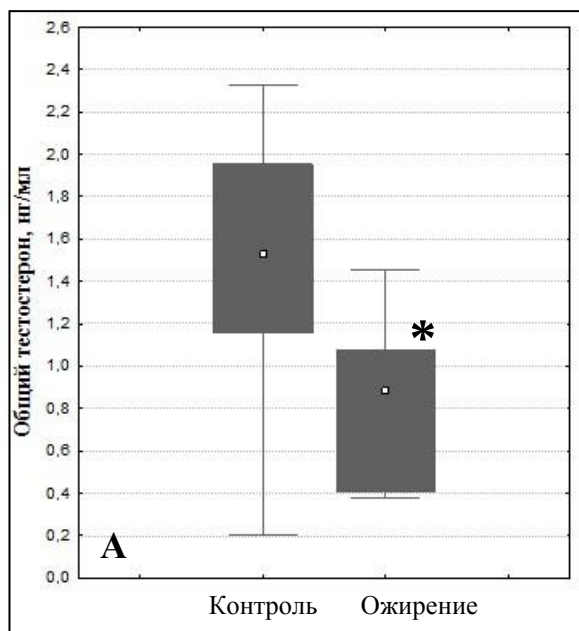


Рисунок 13. Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови у крыс контрольной группы и с ожирением. А – общий тестостерон; Б – свободный тестостерон; В – эстрадиол; Me (25L; 75U). * – $p \leq 0.05$

**Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток
селезенки не стимулированных и стимулированных конканавалином-А,
у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением**

В культуральной жидкости стимулированных и нестимулированных клеток селезенки методом ИФА определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-2, ИЛ-4, интерферона- γ (ИНФ- γ) и фактора некроза опухолей α (ФНО- α) у крыс контрольной и опытной группы.

По концентрации цитокинов - ИЛ-2, ИЛ-4, ИНФ- γ и ФНО- α - в культуральной жидкости клеток селезенки не стимулированных и стимулированных конканавалином-А, различий между сравниваемыми группами не выявлено (табл. 9).

Таким образом, по сравнению с контрольной группой при ожирении у крыс не выявлено достоверных различий содержания цитокинов - ИЛ-2, ИЛ-4, ИНФ- γ и ФНО- α в культуральной жидкости клеток селезенки, не стимулированных и стимулированных конканавалином-А.

Таблица 9

Содержание цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, не стимулированных и стимулированных конканавалином-А, и эндотоксина в сыворотке крови, у крыс контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U)

Параметры		Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
		Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
ИЛ-2, пг/мл	без стимуляции	0	0	1
	КонА	1992,4 (1880,4; 3260,2)	2457,9 (1668,6; 3325,2)	0,943
ИЛ-4, пг/мл	без стимуляции	0,91 (0,45; 1,18)	0,69 (0,51; 0,94)	0,363
	КонА	138,8 (83,8; 177,5)	51,4 (1,27; 136,5)	0,117
ИНФ-γ, пг/мл	без стимуляции	75,1 (62,6; 135,9)	133,1 (42,7 173,9)	0,455
	КонА	250 (206,5; 300,8)	220,1 (143,2; 287,1)	0,434
ФНО-α, пг/мл	без стимуляции	0,05 (0,047; 0,052)	0,56 (0,049; 0,06)	0,165
	КонА	0,16 (0,15;0,18)	0,17 (0,14;0,20)	0,594
Эндотоксин, ед/л		0,615 (0,293; 0,663)	0,725 (0,619; 0,819)	0,045

Содержание эндотоксина в сыворотке крови у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

Уровень эндотоксина в сыворотке крови крыс контрольной и опытной групп определяли с помощью хромогенного LAL-теста.

Содержание эндотоксина в сыворотке крови у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой было достоверно выше на 18% и составляло 0,725 (0,619; 0,819) и 0,615 (0,293; 0,663) ед/л соответственно (рис. 14).

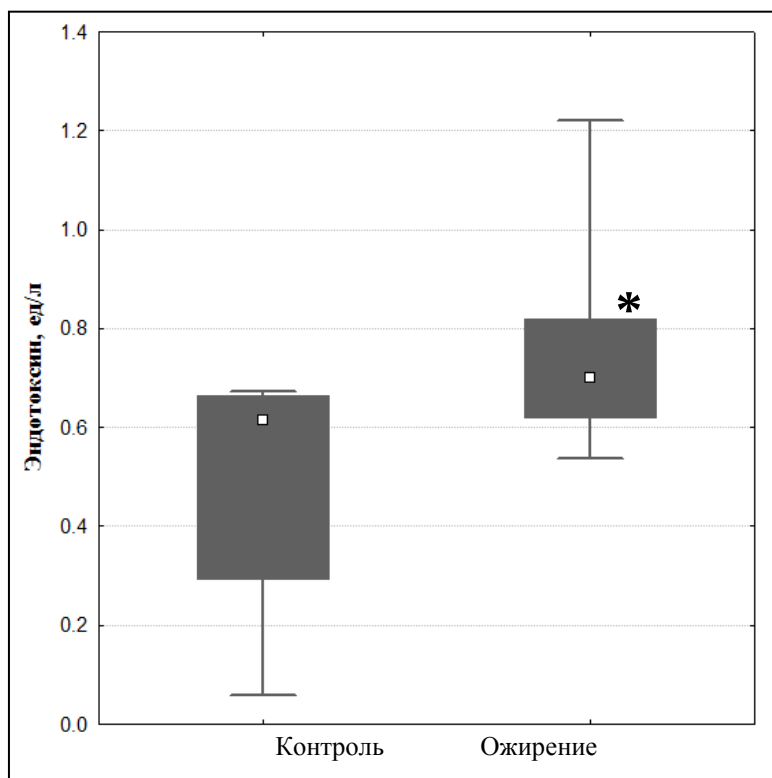


Рисунок 14. Содержание эндотоксина в сыворотке крови у крыс контрольной группы и с ожирением; Me (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

Сравнительный анализ субпопуляционного состава лимфоцитов у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

Субпопуляционный состав лимфоцитов у животных контрольной группы и с ожирением определяли методом проточной цитофлуориметрии. Проводили анализ абсолютного и относительного количества различных субпопуляций лимфоцитов и иммунорегуляторного индекса (соотношение CD4/CD8). Абсолютное количество Т-лимфоцитов (CD3+ клетки), и В-лимфоцитов (CD45R+CD3- клетки) в периферической крови вычисляли по отношению к абсолютному количеству лимфоцитов; абсолютное количество Т-хелперов (CD3+CD4+CD8- клетки) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+CD4- клетки) – по отношению к абсолютному количеству Т-лимфоцитов; процентное содержание активированных Т-хелперов (CD4+CD25+Foxp3-) и регуляторных Т-клеток (CD4+CD25+Foxp3+) – по отношению к абсолютному количеству Т-хелперов.

При иммунофенотипическом анализе основных субпопуляций лимфоцитов периферической крови у крыс опытной группы по сравнению с контролем выявлено статистически значимое повышение абсолютного количества Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов (табл. 10, рис. 15). У крыс контрольной группы показатель абсолютного количества Т-лимфоцитов составил 4,76 (4,68; 5,44) млн/мл, а при ожирении - 6,16 (5,45; 6,53) млн/мл ($p=0,010$). Показатель абсолютного количества В-лимфоцитов у крыс с ожирением также увеличился по сравнению с контрольной группой и составил 3,83 (3,53; 4,04) и 3,19 (2,23; 3,57) млн/мл ($p=0,039$). По другим параметрам различий между сравниваемыми группами не выявлено (табл. 10).

Таким образом, по сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением в периферической крови возрастает абсолютное количество В- и Т-лимфоцитов.

Таблица 10.

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови у крыс Спрейг-Доули в контрольной группе и с ожирением; Ме (25L; 75U).

Параметры		Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
		Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
Лимфоциты, млн/мл		9,0 (8,3; 10,4)	10,4 (8,75; 11,6)	0,294
В-лимфоциты	%	35,4 (28,7; 37,7)	35,4 (34,7; 36,14)	0,897
	млн/мл	3,19 (2,23; 3,57)	3,83 (3,53; 4,04)	0,039
Т-лимфоциты	%	54,6 (52,2; 63,3)	54,6 (53,9; 55,3)	0,897
	млн/мл	4,76 (4,68; 5,44)	6,16 (5,45; 6,53)	0,010
Цитотоксические Т-лимфоциты	%	41,6 (33,0; 58,0)	39,9 (31,95; 44,5)	0,431
	млн/мл	1,98 (1,58; 3,05)	2,38 (1,75; 2,83)	0,563
Т-хелперы	%	56,9 (38,9; 64,0)	56,0 (51,3; 62,1)	0,753
	млн/мл	2,5 (2,23; 2,68)	3,1 (2,43; 3,33)	0,085
Активированные Т-хелперы	%	5,8 (5,3; 10,6)	7,85 (7,45; 8,55)	0,602
	млн/мл	18,0 (12,9; 26,4)	25,0 (18,2; 31,2)	0,180
Регуляторные Т-лимфоциты	%	3,05 (2,70; 3,10)	3,1 (2,80; 3,6)	0,561
	млн/мл	74,2 (56,5; 99,6)	87,1 (80,6; 129,8)	0,253
Иммунорегуляторный индекс, усл.ед.		1,37 (0,68; 1,94)	1,42 (1,15; 1,95)	0,529

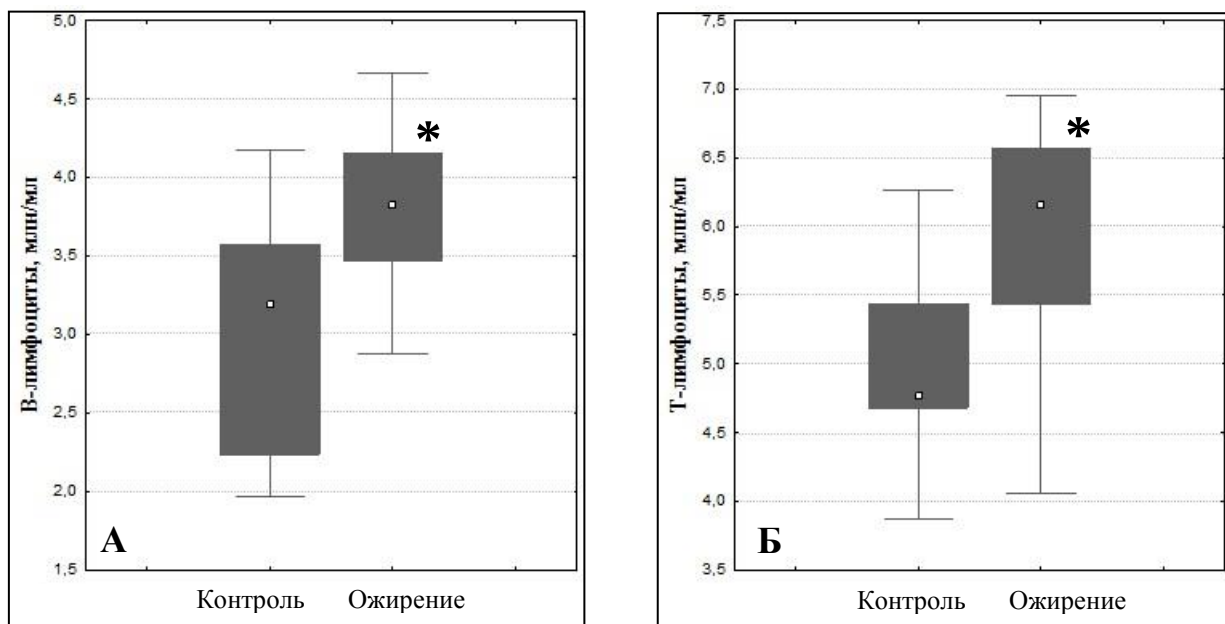


Рисунок 15. Абсолютное количество В- и Т-лимфоцитов в периферической крови в контрольной группе и у животных с ожирением; Me (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

Субпопуляционный состав макрофагов, выделенных из жировой ткани, у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и при ожирении

Субпопуляционный состав клеток, выделенных из жировой ткани у животных контрольной и опытной группы, определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для определения относительного содержания макрофагов в жировой ткани, окружающей придаток семенника, использовали антитела к CD68 (общий маркер макрофагов) и CD163 (маркер противовоспалительных альтернативно активированных макрофагов M2).

Показатель относительного количества CD68-положительных клеток среди клеток, выделенных из жировой ткани у крыс с ожирением, был выше, чем в контрольной группе в 1,9 раз (табл. 11, рис. 16). В сравниваемых экспериментальных группах не было выявлено достоверных различий по количеству CD163-положительных клеток (табл. 11).

Таким образом, у крыс с ожирением в жировой ткани увеличивается количество CD68 положительных макрофагов.

Таблица 11

Относительное количество CD68- и CD163-положительных клеток среди клеток, выделенных из жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметры	Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
	Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
Количество CD68-положительных клеток, %	5,2 (4,0; 5,9)	9,9 (5,4; 10,0)	0,027
Количество CD163-положительных клеток, %	1,8 (1,4; 2,8)	2,4 (1,6; 2,8)	0,312

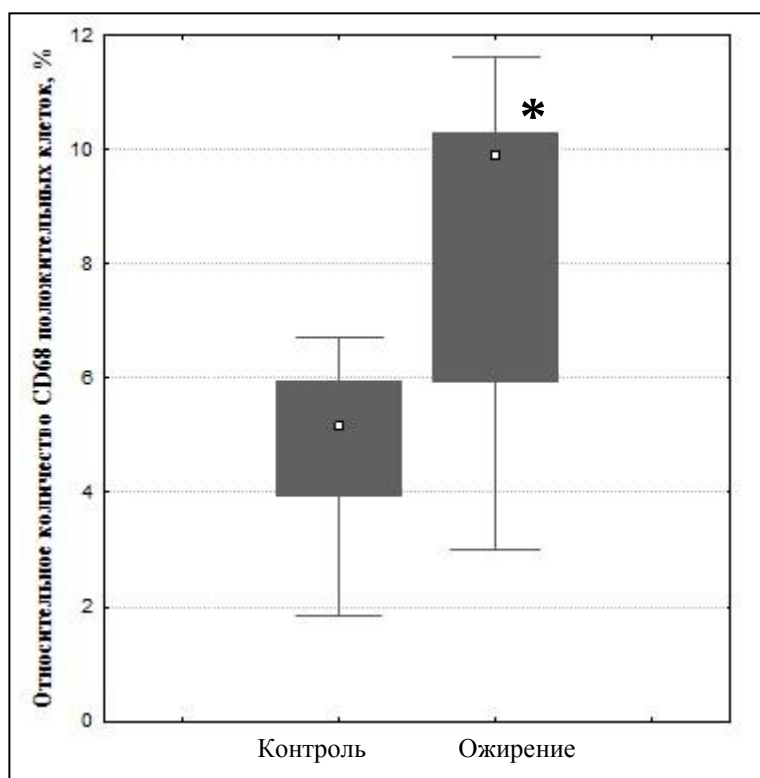


Рисунок 16. Относительное количество CD68-положительных клеток среди клеток, выделенных из жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

**Исследование состава микрофлоры толстой кишки методом
количественной ПЦР в реальном времени у крыс Спрейг-Доули
контрольной группы и с ожирением**

У животных контрольной групп и с ожирением методом количественной ПЦР в реальном времени изучали содержание в гомогенате толстой кишки (пристеночная микрофлора) микроорганизмов типов *Fermicutes* и *Bacteroidetes*, а в кале (просветная микрофлора) микроорганизмов типов *Fermicutes* и *Bacteroidetes*, а также *Akkermansia muciniphila* (тип *Verrucomicrobia*).

В пристеночной микрофлоре у крыс с ожирением показатели содержания *Bacteroidetes* были статистически значимо ниже, чем в контроле, а содержание *Fermicutes* и соотношение *Fermicutes* и *Bacteroidetes* между сравниваемыми группами не различались. В просветной микрофлоре не выявлено достоверных различий между сравниваемыми группами по содержанию *Bacteroidetes*, *Fermicutes* и соотношению *Fermicutes* и *Bacteroidetes*. Однако по сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением в составе просветной микрофлоры достоверно снижался показатель количества микроорганизмов *Akkermansia muciniphila* (табл. 12, рис. 17).

Таким образом, в составе пристеночной и просветной микрофлоры при ожирении снижается, соответственно, количество *Bacteroidetes* и *Akkermansia muciniphila*.

Таблица 12

Исследование микрофлоры толстой кишки методом количественной ПЦР в реальном времени у крыс контрольной и опытной группы, Ме (25L; 75U)

Значения порогового цикла, Ct (cycle threshold)*		Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
		Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
Пристеночная микрофлора	<i>Firmicutes</i>	13,8 (13,3; 16,0)	16,2 (14,3; 19,3)	0,434
	<i>Bacteroidetes</i>	16,4 (15,4; 17,9)	19,2 (17,3; 20,3)	0,030
	<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> , усл. ед.	0,86 (0,83; 0,94)	0,97 (0,86; 0,99)	0,534
Просветная микрофлора	<i>Firmicutes</i>	16,0 (15,2; 16,9)	16,7 (16,4; 16,9)	0,501
	<i>Bacteroidetes</i>	19,7 (18,6; 20,7)	20,8 (20,1; 20,9)	0,121
	<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> , усл. ед.	0,83 (0,77; 0,90)	0,82 (0,74; 0,84)	0,606
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	25,7 (25,1; 26,7)	28,2 (27,9; 29,2)	0,002

*Значения порогового цикла находятся в обратной зависимости от содержания последовательности-мишени в образце ДНК.

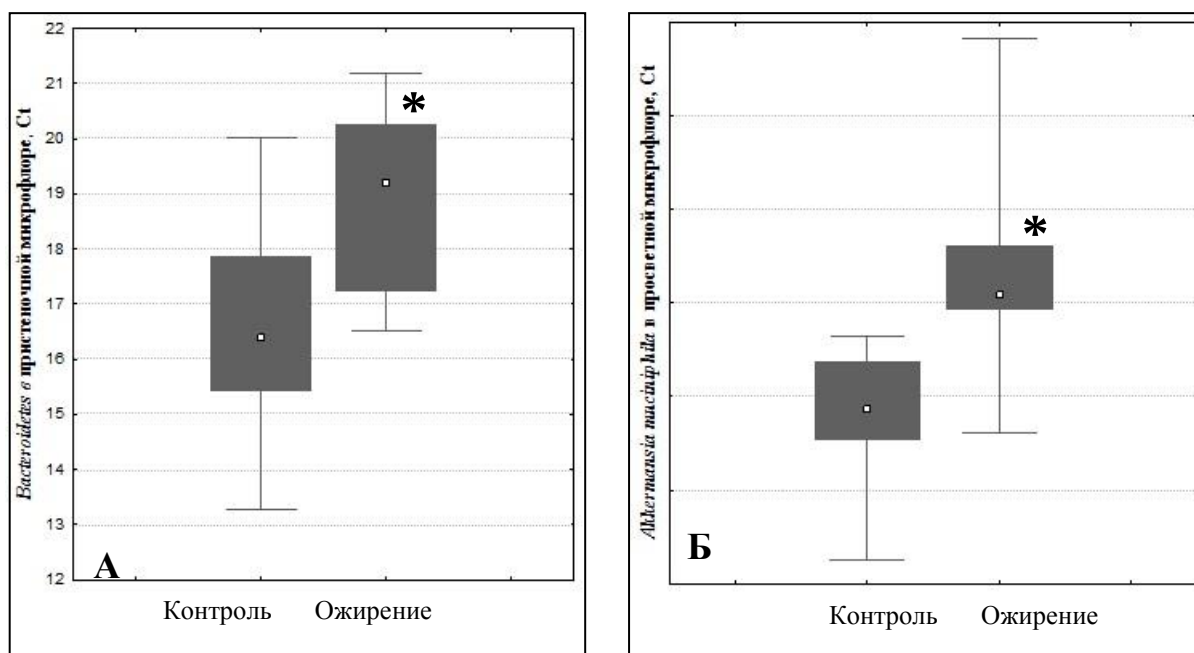


Рисунок 17. Значения порогового цикла Ct (находятся в обратной зависимости от содержания последовательности-мишени в образце ДНК) для *Bacteroidetes* (А) в составе просветной микрофлоры и *Akkermansia muciniphila* (Б) в составе пристеночной микрофлоры толстой кишки у крыс контрольной группы и с ожирением; Me (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

3.2. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА И ЛОКАЛЬНОГО КОМПАРТМЕНТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У КРЫС СПРЕЙГ-ДОУЛИ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ОЖИРЕНИИ

Морфологическая и морфометрическая характеристика ободочной кишки у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением

Проводили морфологическое исследование ободочной кишки крыс контрольной и опытной групп на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Определяли относительное количество нейтрофилов, лимфоцитов, плазмочитов, фиброцитов и фибробластов на 1000 клеток при увеличении 600. На микрофотографиях гистологических срезов ободочной кишки проводили подсчет абсолютного количества клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) на стандартной площади (1000 мкм^2). Подсчитывали количество бокаловидных клеток на крипту. На стандартной единице площади эпителия (10000 мкм^2) определяли количество хромогранин-позитивных энтероэндокринных и CD68-положительных клеток, а также относительную объёмную плотность в СПСО CD68-положительно окрашенного материала.

При морфологическом исследовании дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной и опытной групп эпителиальная выстилка не нарушена и представлена каемчатым цилиндрическим эпителием. Крипты глубокие с узкими просветами, в их эпителиальной выстилке бокаловидные клетки округлой и овальной формы. В эпителии на дне крипт от 0 до 3 клеток с митозами. Между криптами в строме собственной пластинки слизистой оболочки - рыхлая волокнистая соединительная ткань с диффузно рассеянными клеточными элементами – фибробластами и фиброцитами, лимфоцитами, единичными нейтрофилами и гистиоцитами. Базальный отдел собственной пластинки слизистой оболочки представлен рыхлой волокнистой соединительной тканью и клеточными элементами – фибробластами, фиброцитами и небольшим количеством диффузно

рассеянных лимфоцитов и макрофагов. Просветы лимфатических сосудов не расширены (рис. 21).

Мышечная пластинка представлена 3-5 слоями гладкомышечных клеток с эозинофильной цитоплазмой. В подслизистом слое – рыхлая волокнистая соединительная ткань, в ней немногочисленные клеточные элементы - фибробласты и фиброциты, лимфоциты и гистиоциты, сосуды микроциркуляторного русла. В отдельных лимфатических сосудах – скопления лимфоцитов. Поперечный и продольный мышечные слои представлены гладкомышечными клетками с эозинофильной цитоплазмой. Серозная оболочка состоит из рыхлой волокнистой соединительной ткани и одного слоя уплощенных мезотелиальных клеток.

В отличие от контрольной группы у крыс с ожирением при морфологическом исследовании бокаловидные клетки были менее крупными, а в СПСО увеличено количество клеточных элементов (рис. 21).

По данным морфометрического исследования в СПСО у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой отмечено достоверное увеличение относительного количества клеточных элементов в соединительной ткани между криптами и базальном отделе, соответственно, на 29 и 34%, (табл. 13, рис. 18, 21). У крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой среди клеточных элементов процентное содержание лимфоцитов и нейтрофилов было достоверно увеличено на 65% и 25%, соответственно, а фиброцитов и фибробластов – снижено на 12% (табл. 13, рис. 19). Количество плазмоцитов в сравниваемых группах статистически значимо не отличалось. Показатель относительного количества макрофагов (CD68-положительных клеток) у крыс с ожирением повысился в 2 раза по сравнению с контрольной группой, а относительная объёмная плотность в СПСО CD68-положительно окрашенного материала увеличилась в 4,1 раза (табл. 13, рис. 20, 22).

Бокаловидные клетки овальные и округлые, показатель их количества на крипту у крыс с ожирением снижался по сравнению с контролем, однако достоверных различий показателей между сравниваемыми группами не выявлено (табл. 13). Относительное количество хромогранин-позитивных энтероэндокринных клеток в эпителии слизистой оболочки в сравниваемых группах не различалось (табл. 13, рис 23).

Таблица 13

Морфометрическая характеристика эпителиальной выстилки и клеточного состава СПСО толстой кишки у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметры	Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
	Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
Количество бокаловидных клеток на крипту	18,8 (17,4; 21,9)	16,2 (13,7; 19,1)	0,167
Количество энтероэндокринных клеток (на 10 000 мкм ²)	1,22 (1,14 1,60)	1,33 (1,07 1,55)	1,00
Количество клеточных элементов в СПСО между криптами (на 1000 мкм ²)	10,7 (10,0; 11,0)	13,8 (12,5; 14,7)	0,023
Количество клеточных элементов в базальном отделе СПСО (на 1000 мкм ²)	6,7 (6,2; 6,9)	9,0 (8,6; 9,3)	0,004
Лимфоциты (в %)	9,5 (9,0; 10,3)	15,7 (14,1; 19,3)	0,028
Нейтрофилы (в %)	9,1 (8,3; 9,9)	12,5 (9,9; 14,7)	0,028
Плазмоциты (в %)	3,0 (1,5; 3,1)	2,9 (2,1; 4,2)	0,516
Фibroциты и фибробласты (в %)	77,2 (76,4; 84,0)	68,8 (66,7; 69,6)	0,006
Количество CD68 положительных клеток (на 10 000 мкм ²)	1,10 (0,87; 1,38)	2,27 (1,87; 2,43)	0,008
Относительная объёмная плотность CD68 положительно окрашенного материала, усл.ед.	1,86 (1,4; 2,21)	7,61 (7,44; 13,04)	0,008

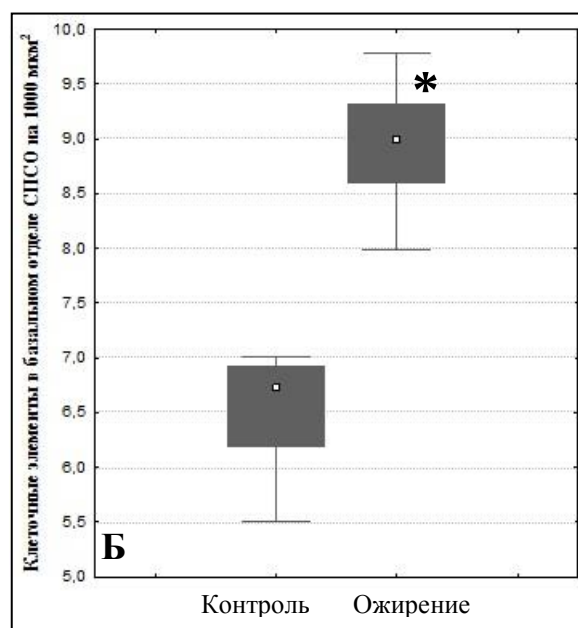
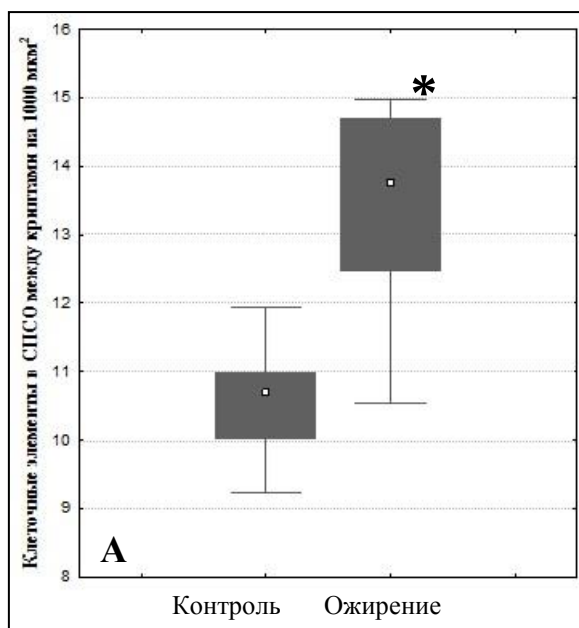


Рисунок 18. Количество клеточных элементов (на 1000 мкм²) между криптами (А) и в базальном отделе (Б) СПСО толстой кишки у крыс Спрейг-Дуоли контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

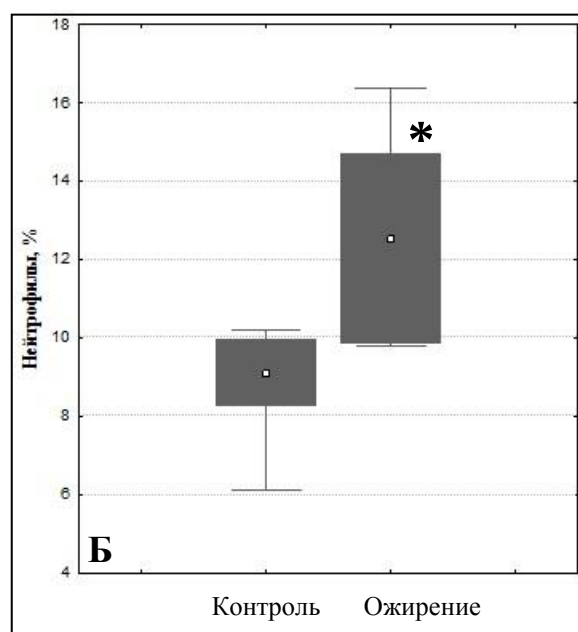
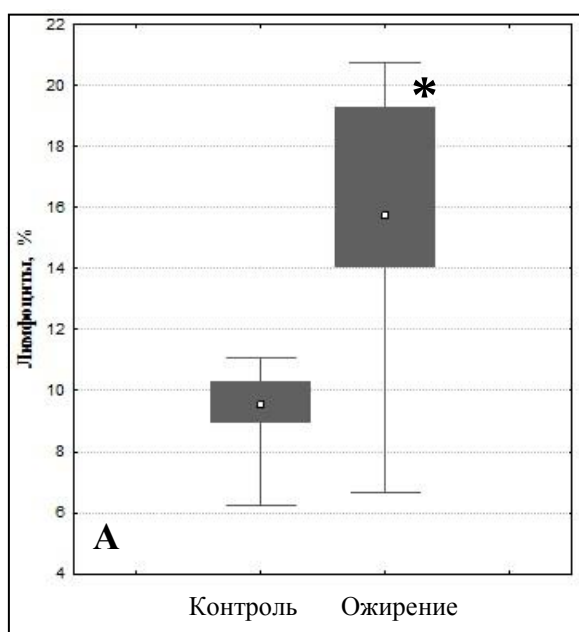


Рисунок 19. Относительное количество лимфоцитов (А) и нейтрофилов (Б) среди клеточных элементов СПСО толстой кишки у крыс Спрейг-Дуоли контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

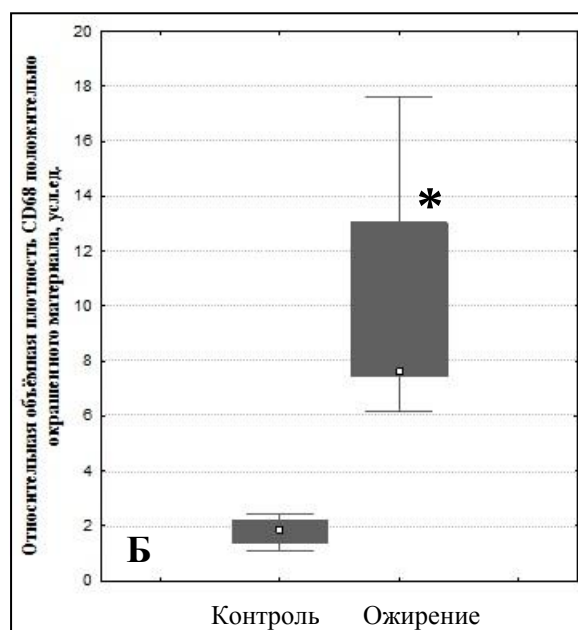
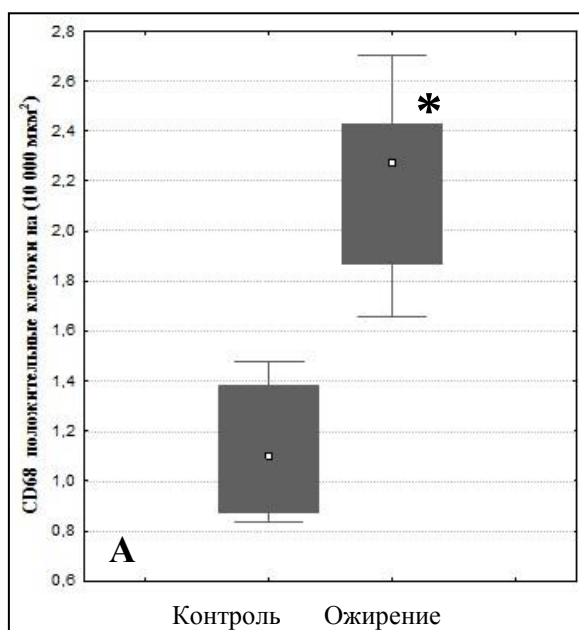


Рисунок 20. Количество CD68-положительных макрофагов (А) на 10 000 мкм² СПСО толстой кишки и относительная объёмная плотность CD68-положительно окрашенного материала (Б) у крыс Спрейг-Доули контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U).
* — $p \leq 0.05$

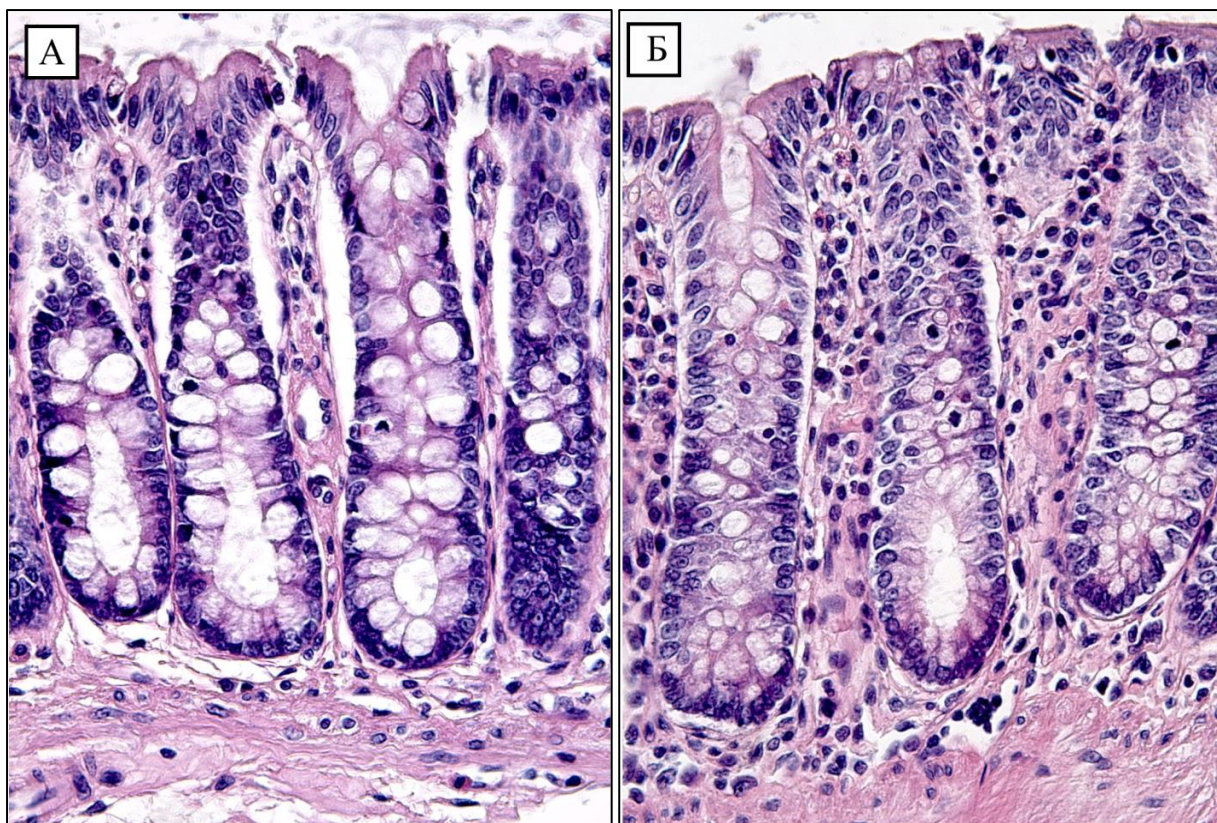


Рисунок 21. Морфологическая характеристика дистального отдела толстой кишки крыс контрольной группы (А) и с ожирением (Б). При ожирении в СПСО увеличено количество клеточных элементов, а бокаловидные клетки менее крупные (Б), чем в контрольной группе (А). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

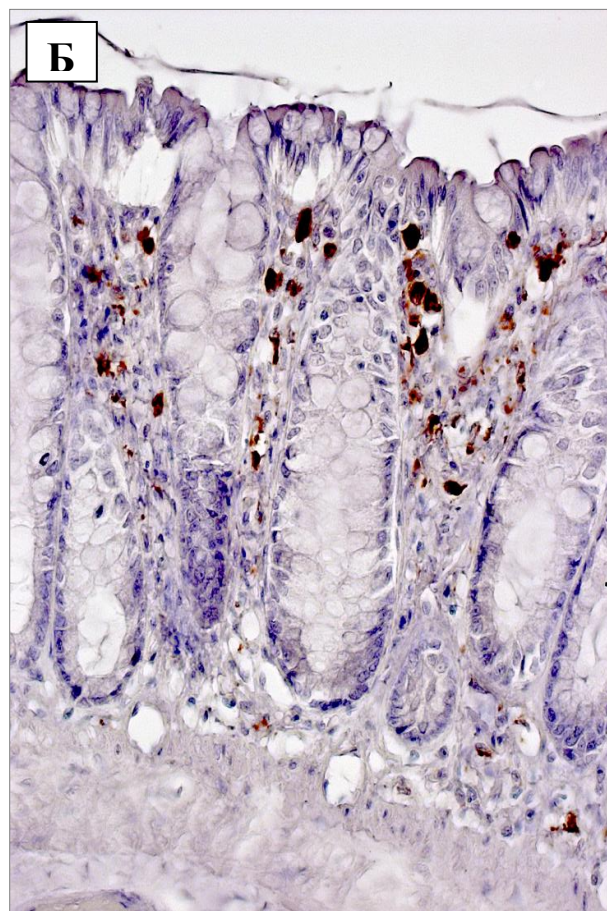


Рисунок 22. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки крыс контрольной группы (А) и с ожирением (Б). При ожирении в СПСО увеличено количество CD68-положительных макрофагов. Иммуногистохимическая реакция с антителами к CD68. Ув. 400.

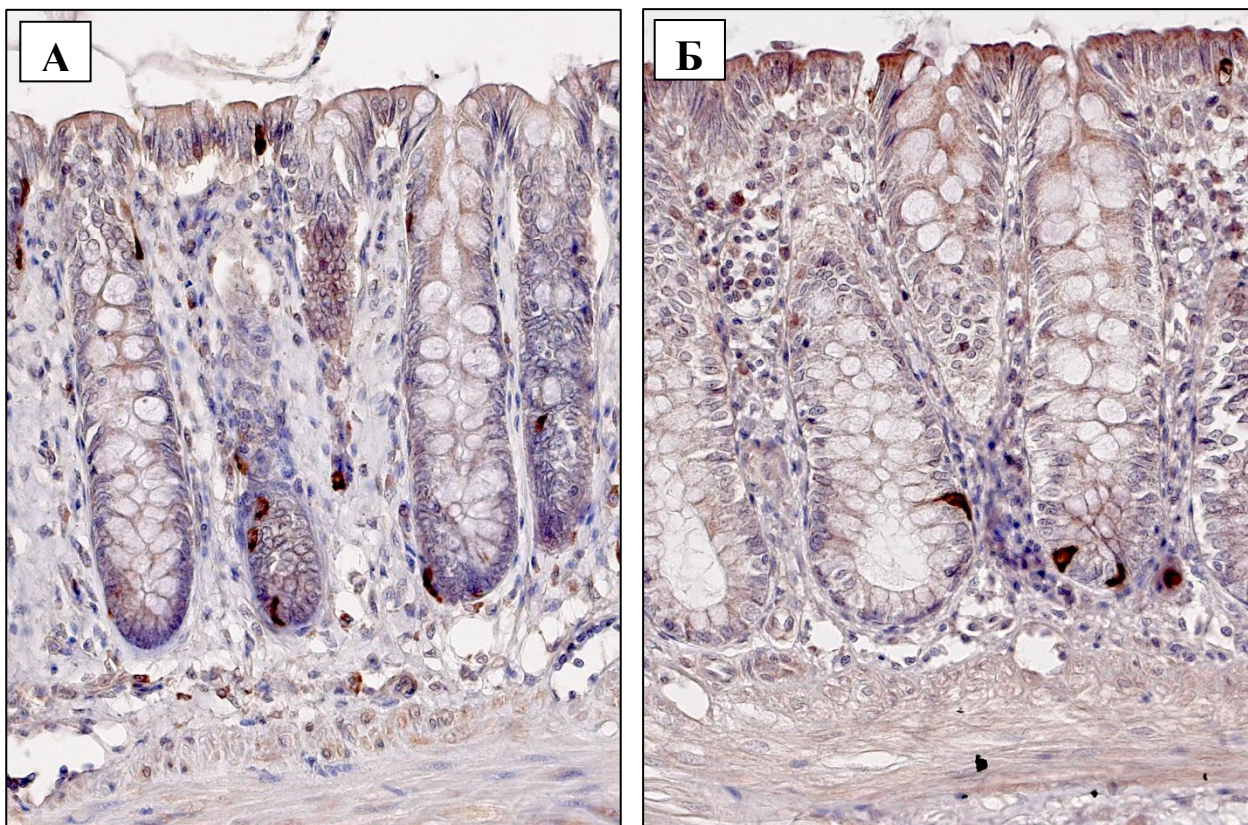


Рисунок 23. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки крыс контрольной группы (А) и с ожирением (Б). Относительное количество хромогранин-позитивных энтероэндокринных клеток в эпителии слизистой оболочки в сравниваемых группах не различалось. Иммуногистохимическая реакция с антителами к хромогранину. Ув. 400.

**Цитофизиологическая характеристика бокаловидных клеток
дистального отдела ободочной кишки у крыс Спрейг-Доули
контрольной группы и с ожирением**

На микрофотографиях срезов дистального отдела ободочной кишки определяли относительную объёмную плотность выявляемых при ШИК-реакции бокаловидных клеток и интенсивность окрашивания секрета бокаловидных клеток: окраска альциановым синим (высоко сульфатированные муцины) и ШИК-реакция (нейтральные муцины; табл. 14, рис. 24, 25 26).

Показатель объёмной доли ШИК-позитивных эпителиальных клеток у крыс с ожирением статистически достоверно снижался (табл. 14, рис. 24). У крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой статистически значимо уменьшились показатели интенсивности окрашивания ШИК-позитивного и альциан-положительного содержимого в цитоплазме бокаловидных клеток (табл. 14, рис. 25).

Морфометрическая характеристика бокаловидных клеток дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Параметры		Группа наблюдения		Доверительная вероятность (p)
		Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
Относительная объёмная плотность бокаловидных клеток (ШИК-реакция), усл.ед.		0,31 (0,30; 0,34)	0,23 (0,19; 0,28)	0,012
Интенсивность окрашивания секрета бокаловидных клеток, усл.ед.	ШИК-реакция	0,43 (0,40; 0,43)	0,37 (0,37; 0,40)	0,012
	Альциановый синий	0,195 (0,194; 0,203)	0,182 (0,169; 0,186)	0,025

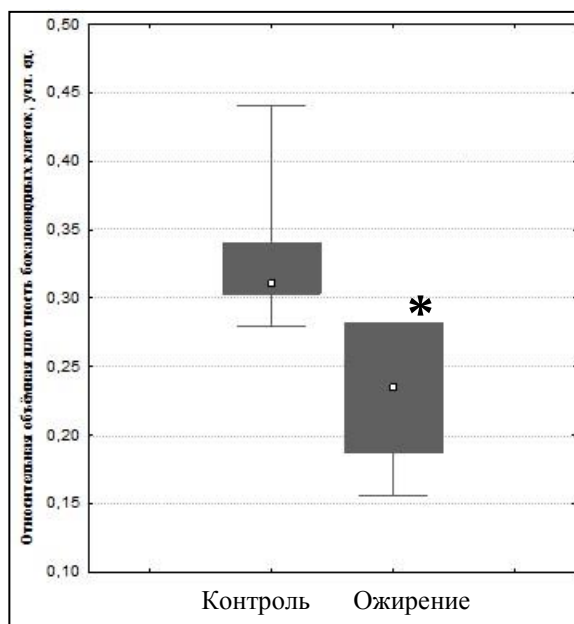


Рисунок 24. Относительная объёмная плотность выявляемых при ШИК-реакции бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

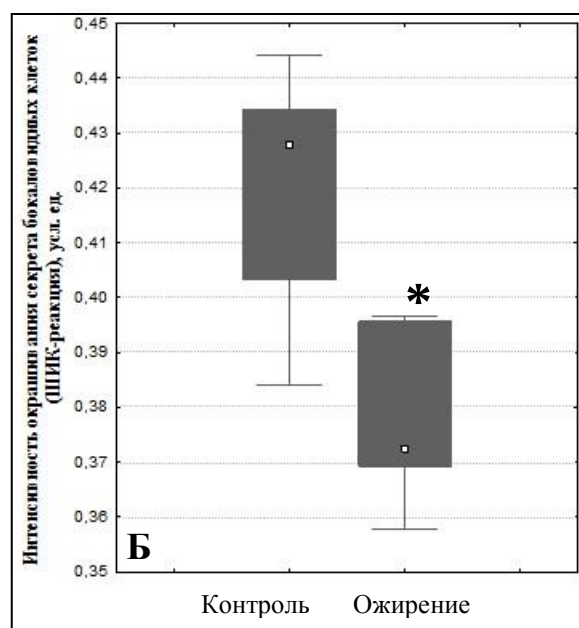
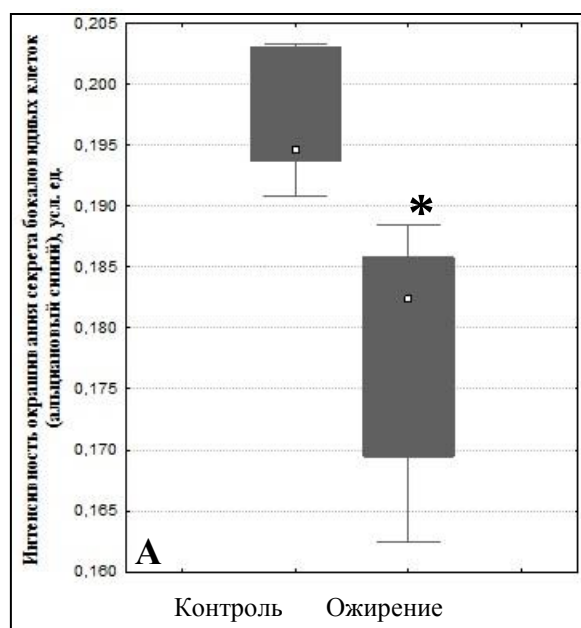


Рисунок 25. Интенсивность окрашивания секрета бокаловидных клеток в дистальном отделе ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением. А – высоко сульфатированные муцины (окраска альциановым синим); Б – нейтральные муцины (ШИК-реакция); Me (25L; 75U). * – $p \leq 0.05$

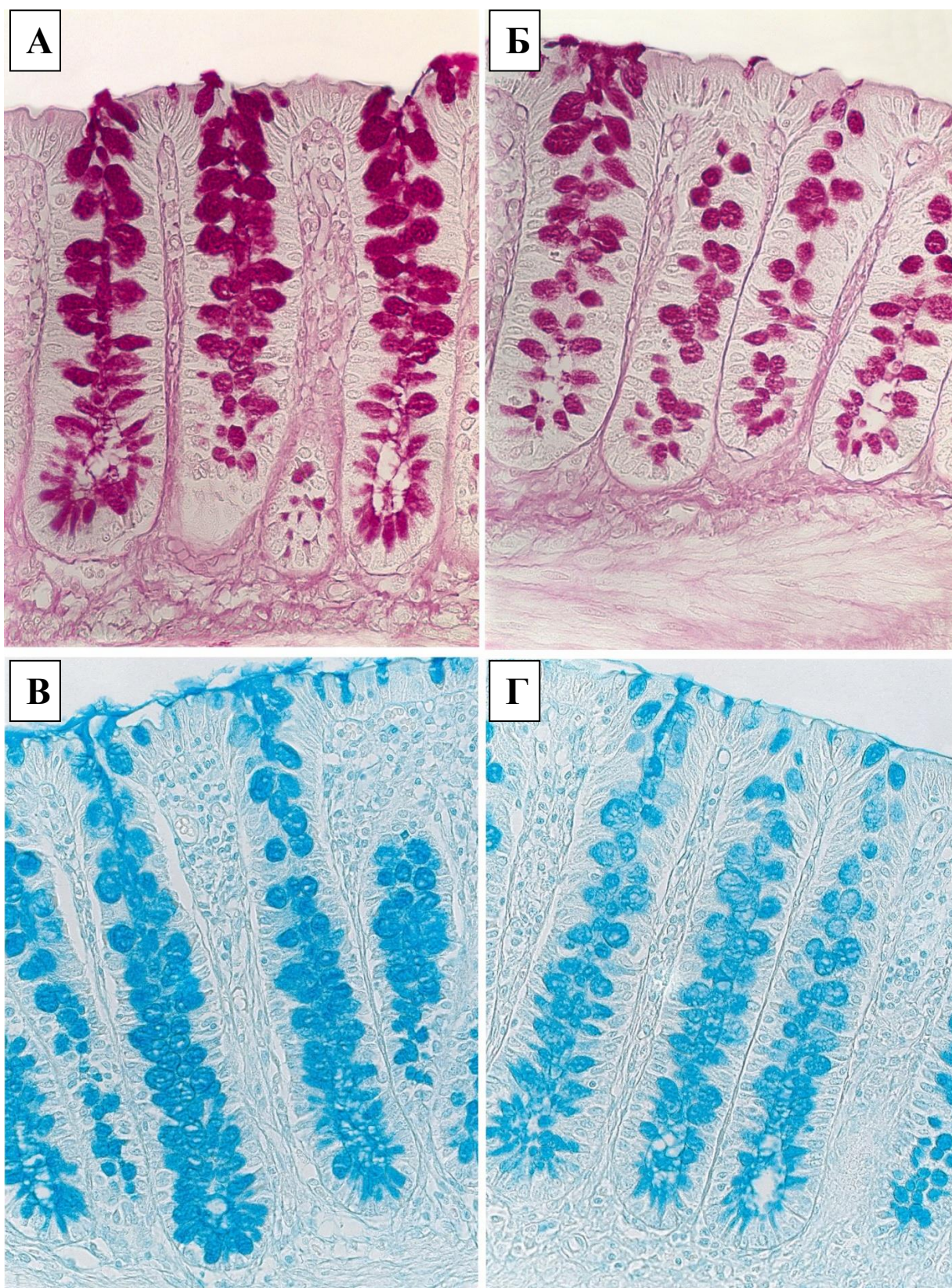


Рисунок 26. Гистохимическая характеристика бокаловидных клеток дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы (А, В) и с ожирением (Б, Г). При ожирении интенсивность окрашивания ШИК- (А, Б) и альциан-позитивного (В, Г) содержимого в бокаловидных клетках менее выражена, чем в контроле (А, В). Окраска альциановым синим (А, Б) и ШИК-реакция (В, Г). Ув. 400.

Гистохимическая и морфометрическая характеристика коллагеновых волокон в слизистой оболочке дистального отдела ободочной кишки

На микрофотографиях срезов стенки дистального отдела толстой кишки, окрашенных пикросириусом красным, в поляризованном свете оценивали объемную долю и распределение зрелых (оранжево-красных) и незрелых (желто-зеленых) коллагеновых волокон и их соотношение.

У крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое увеличение относительной объемной доли незрелых коллагеновых волокон желто-зеленого цвета в СПСО между криптами, а в базальных отделах СПСО - увеличение объемной доли зрелых оранжево-красных волокон (табл. 15, рис. 27 А). В базальном отделе СПСО также отмечалась тенденция к увеличению относительной объемной доли волокон желто-зеленого цвета (табл. 15). Показатели объемной доли коллагеновых волокон в подслизистой основе не различались между сравниваемыми группами. В СПСО крипт изменилось отношение относительной объемной доли зрелых коллагеновых волокон к незрелым волокнам (табл. 15, рис. 27 Б), но в базальном слое СПСО и в подслизистой основе эти показатели не различались между сравниваемыми группами.

Таким образом при ожирении у крыс Спрейг-Доули в ободочной кишке развиваются реактивные морфологические изменения эпителиального барьера, которые характеризуются снижением объемной доли ШИК-позитивного содержимого бокаловидных клеток и интенсивности окрашивания в них ШИК- и альциан-положительного содержимого, а также тенденцией к снижению числа бокаловидных клеток на крипту. В СПСО повышается количество клеточных элементов и, среди них, относительное содержание лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов. В стенке дистального отдела ободочной кишки в СПСО крипт у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой изменяется соотношение зрелых и незрелых коллагеновых волокон.

Таблица 15

Морфометрическая характеристика окрашенных пикросириусом красным волокон дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением, Ме (25L; 75U)

Структуры слизистой оболочки и тинкториальные свойства волокон		Относительная площадь коллагеновых волокон, усл.ед.		Доверительная вероятность (p)
		Группа наблюдения		
		Контрольная (n=9)	Опытная (n=11)	
СПСО между криптами	Оранжево-красные волокна	19,9 (12,9; 20,20)	17,8 (15,1; 19,5)	0,807
	Желто-зеленые волокна	1,14 (1,00; 1,27)	1,85 (1,45; 2,07)	0,011
	Соотношение волокон разных типов	12,1 (11,7; 15,3)	10,0 (9,4; 11,5)	0,028
Базальный слой СПСО	Оранжево-красные волокна	30,6 (30,1; 32,2)	39,7 (36,1; 46,28)	0,028
	Желто-зеленые волокна	2,32 (1,55; 3,45)	3,59 (2,47; 4,16)	0,123
	Соотношение волокон разных типов	11,7 (9,3; 19,4)	11,5 (10,5; 14,6)	0,935
Подслизистая основа	Оранжево-красные волокна	55,8 (53,0; 56,2)	56,9 (52,4; 60,5)	0,685
	Желто-зеленые волокна	3,67 (1,25; 4,55)	3,35 (2,67; 4,43)	0,935
	Соотношение волокон разных типов	13,8 (12,1; 42,5)	17,0 (13,6; 19,6)	0,935

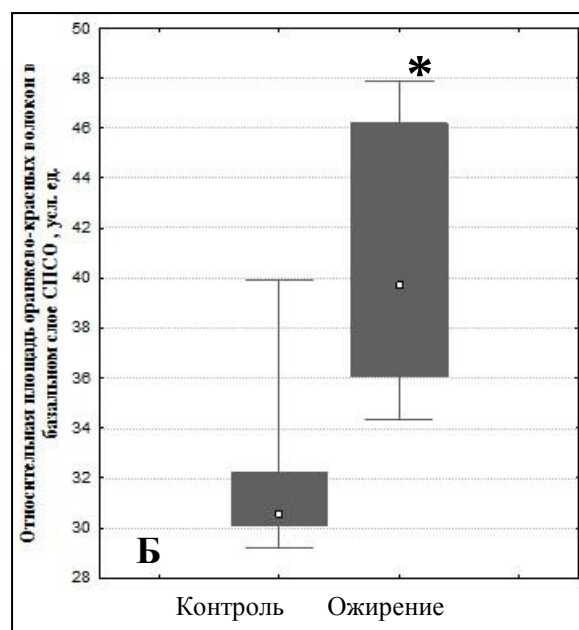
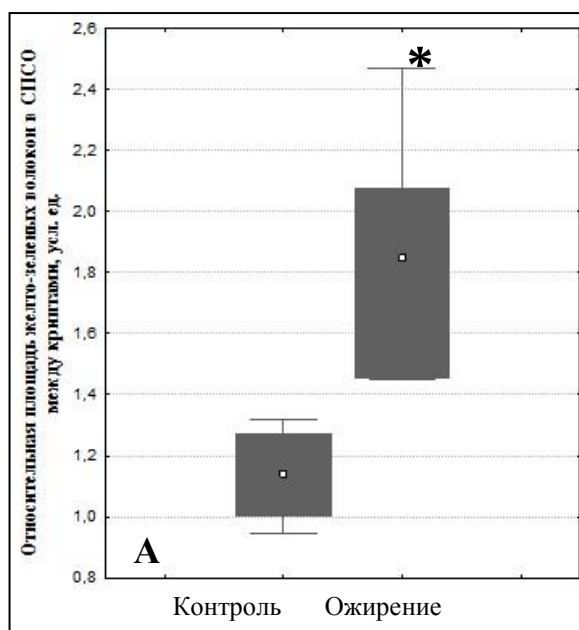


Рисунок 27. Морфометрическая характеристика окрашенных пикросириусом красным волокон дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением. А - относительная объёмная доля коллагеновых волокон желто-зеленого цвета в СПСО между криптами; Б - относительная объёмная доля коллагеновых волокон оранжево-красных волокон в базальных отделах СПСО; Ме (25L; 75U). * — $p \leq 0.05$

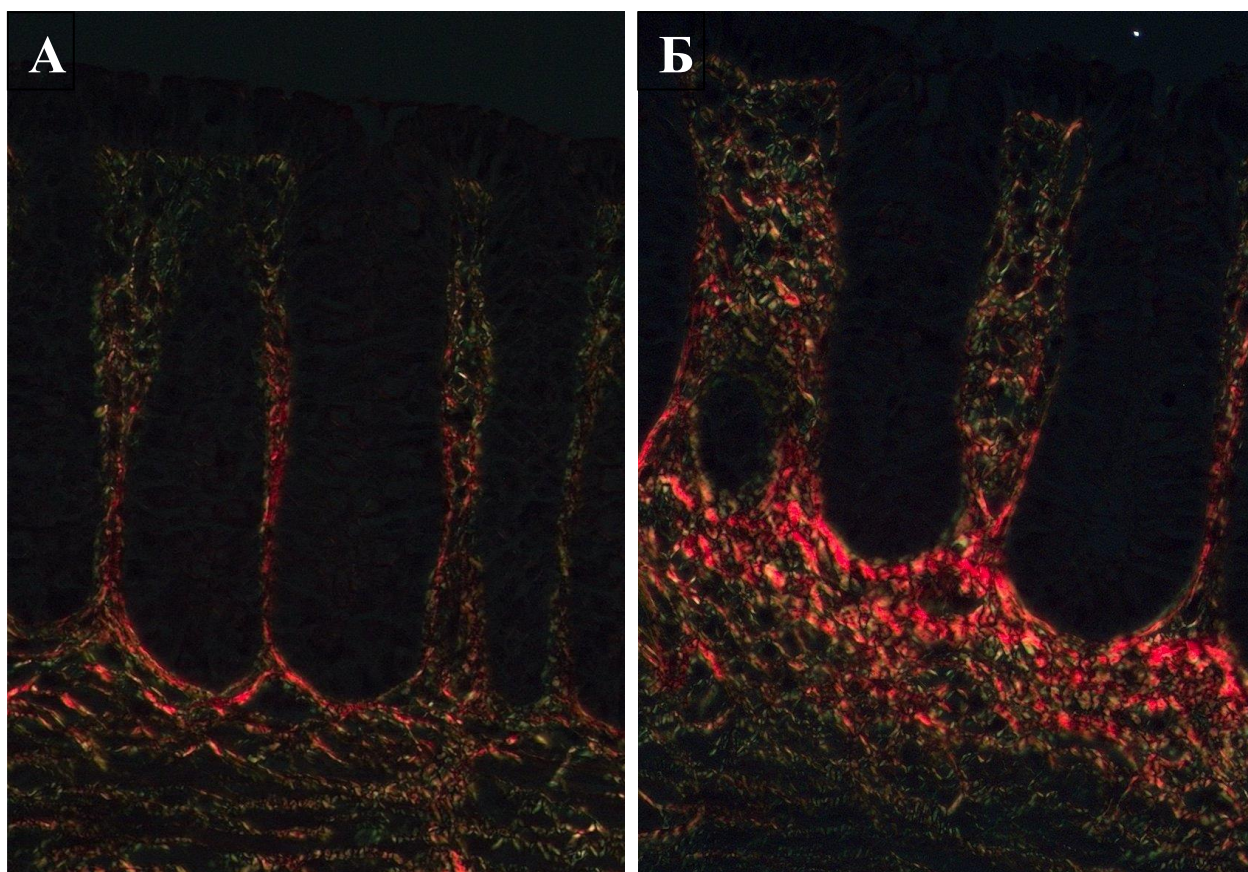


Рисунок 28. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением. При ожирении (Б) в СПСО в отличие от контроля (А) изменяется соотношение зрелых и незрелых коллагеновых волокон. Окраска пикросириусом красным в поляризованном свете. Ув. 400.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ожирение широко распространено среди населения всех стран и встречается у 25% взрослого населения РФ старше 18 лет. [Козырева П.М. и соавт., 2014; Проблема ожирения: краткие статистические данные: <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>. Дата обращения: 03.04.2017]. Основной причиной его развития является нарушение энергетического баланса организма вследствие потребления избыточного количества калорий в условиях низкой физической активности [Al Mushref M., Srinivasan S., 2013; Acosta A., Camilleri M., 2014]. Ожирение характеризуется избыточным развитием жировой ткани и повышением частоты развития сахарного диабета второго типа, хронических воспалительных и опухолевых заболеваний [Дедов И.И. и соавт., 2004; Ройтберг Г.Е., 2007].

У больных ожирением чаще, чем у пациентов с нормальным весом, обнаруживаются функциональные нарушения и заболевания органов пищеварения: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, жировой гепатоз, желчнокаменная болезнь, хронический панкреатит и воспалительные заболевания кишечника [Boutros M., Maron D., 2011; Acosta A., Camilleri M., 2014; Al Mushref M., Srinivasan S., 2013]. При висцеральном ожирении часто выявляется синдром раздраженного кишечника - 25-42% детей и 12-24% взрослых пациентов с ожирением страдают от этого заболевания [Pickett-Blakely O., 2014]. Ожирение отмечается у 1 из 5 детей с болезнью Крона и 1 из 3 с язвенным колитом [Long M.D. et al., 2011]. В ряде работ показано, что при ожирении возрастает частота развития рака толстой кишки, поджелудочной железы, печени, пищевода, желчевыводящих путей, почек, эндометрия, молочной железы и простаты [De Pergola G., Silvestris F., 2013; O'Flanagan C.H. et al., 2015; Brown J.C., Meyerhardt J.A., 2016; Kyrgiou M. et al., 2017]. Риск развития колоректального рака у мужчин при ожирении увеличивается в целом на 30-70% [Bardou M. et al., 2013; Kyrgiou M. et al., 2017].

Несмотря на то, что проблеме ожирения посвящено огромное число работ, до сих пор при этом заболевании остаются неизученными функциональные и структурные изменения толстой кишки. По данным клинических и эпидемиологических исследований установить связь ожирения с функциональными и морфологическими изменениями желудочно-кишечного тракта относительно трудно, так как практически невозможно сформировать репрезентативные группы пациентов по полу, возрасту, стадии ожирения и сопутствующим заболеваниям. Поэтому изучение морфологических и функциональных изменений толстой кишки при ожирении в нашей работе проведено на модели алиментарного ожирения, вызванного избыточным высококалорийным питанием [Международная классификация болезней (МКБ-10): <http://мкб-10.рф/ozhirenie/>. Дата обращения: 03.04.2017].

Модели алиментарного ожирения основаны на увеличении калорийности рациона экспериментальных животных и изменении его состава по макронутриентам, что, в целом, соответствует основной причине развития ожирения у человека - несбалансированному высококалорийному питанию [Лещенко Д.В. и соавт., 2015; Nilsson C. et al., 2012]. Однако данные модели очень разнообразны: для воспроизведения ожирения используются разные по составу рационы, длительность потребления высококалорийного корма, виды и линии лабораторных животных [Kennedy A.J. et al., 2010; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. Поэтому первым этапом работы было создание воспроизводимой модели алиментарного ожирения и ее характеристика по морфологическим изменениям внутренних органов, метаболическим и иммунологическим показателям.

В настоящей работе разработана экспериментальная модель алиментарного ожирения, основанная на использовании в течение 40 недель высококалорийного рациона с высоким содержанием жиров (пальмового масла) и углеводов (фруктозы и хлеба белого из пшеничной муки высшего

сорта). Содержание жиров в рационе составило 49% от общей калорийности, что соответствует наиболее распространенному варианту высокожирового рациона с 30-50% жиров [Gajda A.M. et al., 2007; Angelova P., Boyadjiev N., 2013]. В нашей экспериментальной модели алиментарного ожирения 85% животных, потреблявших высококалорийный рацион, имели ИМТ больше верхнего квартиля ИМТ контрольной группы. Кроме того, по сравнению с контрольной группой у них были более высокие показатели массы тела и жировой ткани, окружающей придаток семенника.

Следует отметить, что крысы линии Спрейг-Доули, потребляющие рацион с высоким содержанием жиров, реагируют на него по-разному, и их можно поделить на крыс устойчивых к высококалорийному рациону и неустойчивых, у которых развивается ожирение [Lauterio T.J. et al., 1994; Levin B.E. et al., 1997; Dobrian A.D. et al., 2000; De La Serre C.B. et al., 2010]. В нашей работе в опытную группу (крысы с ожирением) были отобраны 12 животных с максимальным ИМТ. В отличие от других моделей в настоящей работе использованы длительные сроки эксперимента и проведено комплексное морфологическое исследование внутренних органов (печени, поджелудочной железы, толстой кишки и сердца).

По нашим данным у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой при морфологическом исследовании жировой ткани, окружающей придаток семенника, выявлена гипертрофия адипоцитов (в 2 раза) и короноподобные структуры - скопления макрофагов и лимфоцитов вокруг погибших адипоцитов [Cinti S. et al., 2005; Murano I. et al., 2008]. Жировая ткань, окружающая придаток семенника – крупный компартмент висцеральной жировой ткани у грызунов [Altintas M.M. et al., 2012], увеличение его массы, значительная гипертрофия адипоцитов и наличие короноподобных структур объективно отражают развитие висцерального ожирения. Количество некротизированных адипоцитов в жировой ткани

коррелирует с увеличением в ней размеров адипоцитов при ожирении у мышей и людей [Cinti S. et al., 2005; Sampey B.P. et al., 2011].

При ожирении у крыс Спрейг-Доули также повышалась масса печени и сердца, однако отношение их показателей к массе тела не изменилось по сравнению с контрольной группой. Следовательно, масса печени и сердца у крыс с ожирением увеличилась пропорционально массе тела.

По данным морфологического исследования у крыс опытной группы через 40 недель эксперимента выявлены характерные для ожирения изменения печени и поджелудочной железы, что соответствует данным ряда авторов [Festi D. et al., 2004; Fabbrini E. et al., 2010; Smits M.M., van Geenen E.J.M., 2011; Pezzilli R., Calculli L., 2014]. Жировая дистрофия печени встречается всего у 3% людей с нормальным ИМТ и у 20% - с ожирением (Basaranoglu M. et al., 2013). В нашей модели ожирения в печени у крыс определялась умеренная мелко- и крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов без признаков тяжелого поражения органа – жировых кист и фиброза. Появление жировых вакуолей в гепатоцитах связывают с нарушением баланса поступления в них экзогенных жирных кислот, их синтеза *de novo* с последующей этерификации в триглицериды, а также окисления жирных кислот и их экспорта/секреции в составе липопротеинов очень низкой плотности [Fabbrini E. et al., 2010]. Жировая дистрофия печени при ожирении взаимосвязана с нарушением метаболизма глюкозы, липидов (липопротеинов и жирных кислот), а также воспалительными процессами [Festi D. et al., 2004; Fabbrini E. et al., 2010]. Дислипидемия при жировой дистрофии печени и ожирении ассоциирована с увеличением в плазме крови концентрации триглицеридов и/или снижением липопротеинов высокой плотности [Fabbrini et al., 2010; Tchernof A., Després J.P., 2013]. У животных с ожирением нами выявлена триглицеридемия, а показатели содержания в сыворотке крови липопротеинов высокой и низкой плотности у крыс с ожирением не отличались от контрольной группы. Следует отметить, что

уровень холестерина у животных с ожирением был ниже, чем в контрольной группе, что согласуется с результатами, полученными как при исследовании больных с ожирением, так и лабораторных животных, длительно потреблявших пальмовое масло, которое не содержит холестерин. Однако входящая в состав пальмового масла пальмитиновая кислота может стимулировать генерацию эндогенного холестерина [Ng T.K. et al., 1991; Odia O.J. et al., 2015].

При ожирении у людей увеличивается активность аминотрансфераз АЛТ и АСТ и изменяется их соотношение - коэффициент де Ритиса [Botros M., Sikaris K.A., 2013]. АЛТ, АСТ и коэффициент де Ритиса характеризуют функциональное состояние печени [Botros M., Sikaris K.A., 2013]. Аминотрансферазы это цитоплазматические и митохондриальные ферменты клеток печени, сердца, скелетной мускулатуры, поджелудочной железы и других органов [Badrick T., Turner P., 2014]. Повышение активности трансаминаз в сыворотке крови или изменение их соотношения связаны с повреждением клеток и являются маркерами тяжелых повреждений сердца и печени, а снижение их активности возможно также при почечной и печеночной недостаточности или дефиците витамина В6 - пиридоксина [Botros M., Sikaris K.A., 2013]. Снижение активности аминотрансфераз наблюдается у пациентов с мальнутрицией, получавших около 50% калорий за счет алкоголя [Кучерявый Ю.А., 2015]. При ожирении у крыс нами выявлено снижение активности в сыворотке крови АЛТ и тенденция к снижению активности АСТ, а коэффициент де Ритиса не изменился. Рацион крыс с ожирением был обогащен рафинированными углеводами и жирами, а, следовательно, количество витаминов в нем было снижено по сравнению с рационом крыс контрольной группы, что может также обуславливать снижение активности аминотрансфераз без изменения коэффициента де Ритиса. Полученные результаты совпадают с данным D. Festi et al. (2004) о том, что активность аминотрансфераз не коррелирует с тяжестью жировой дистрофии.

При морфологическом исследовании поджелудочной железы у крыс с ожирением выявлялся липоматоз, что согласуется с исследованиями, проведенными у больных с ожирением и у лабораторных животных [Кучерявый Ю.А., 2015; Smits M., van Geenen E.J.M., 2011; Matsuda A. et al., 2014; Pezzilli R., Calculli L., 2014; Nakajima K., 2016]. Однако какие-либо воспалительные изменения поджелудочной железы не обнаружены. Концентрации α -амилазы в плазме крови у крыс с ожирением, не отличалась от таковой у животных контрольной группы.

У крыс Спрейг-Дули с ожирением нами обнаружена гиперинсулинемия и тенденция к повышению концентрации глюкозы, что согласуется с данными многочисленных исследований [Ghibaudi L. et al., 2002; Deng J.Y. et al., 2007; Tchernof A., Després J.-P., 2013; Leopoldo A.S. et al., 2016]. Однако в ряде работ у животных, потреблявших рацион с высоким содержанием жира, гипергликемии не выявлено. Так, F. Reichardt et al. (2013) выявили гиперинсулинемию, гиперлептинемию и снижение толерантности к глюкозе у мышей, получавших корм с высоким содержанием жиров в течение 12 недель, однако концентрация глюкозы в сыворотке крови не повышалась. В исследовании L.N. Axelsen et al. (2010) у крыс Спрейг-Дули с ожирением на 18 неделе эксперимента обнаружена гипергликемия, но не на 24-ой, 36-ой и 48-ой неделях. Кроме того, с 18-ой недели эксперимента толерантность к глюкозе у экспериментальных животных уменьшалась и отмечалась нарастающая гиперинсулинемия [Axelsen L.N. et al., 2010]. Таким образом, в нашем исследовании при ожирении у крыс, так же, как и в работах F. Reichardt et al. (2013) и L.N. Axelsen et al. (2010), выявлены нарушения регуляции метаболизма глюкозы.

При ожирении концентрация инсулина в сыворотке крови увеличивается, что приводит к угнетению эндогенной продукции глюкозы в печени и стимуляции накопления глюкозы в скелетных мышцах и жировой ткани. Однако у некоторых пациентов с ожирением и компенсаторной

гиперинсулинемией может сохраняться нормальная концентрации глюкозы в крови [Mitrou P. et al., 2013]. В нашей работе рацион крыс с ожирением был обогащен жирами и углеводами, включая фруктозу. Многие авторы указывают, что «диета кафетерия» или «фаст-фуд», содержащая одновременно избыточное количество жиров и фруктозу, приводит к инсулинорезистентности и хронической гиперлипидемии, которые являются факторами риска развития сахарного диабета, заболеваний печени и сердечно-сосудистой системы [Lustig R.H., 2010; Basaranoglu M. et al., 2013].

F. Windemuller et al. (2016) в исследовании *in vitro* показали, что фруктоза в большей степени, чем глюкоза, усиливает в гепатоцитах синтез триглицеридов и холестерина. Следует отметить, что по мнению многих авторов, фруктоза приводит к нарушениям обмена липидов и инсулинорезистентности только при ее избыточном потреблении и сочетании с рядом других факторов, таких как гиперкалорийное питание и гиподинамия [Rippe J.M., Angelopoulos T.J., 2012; Laughlin M.R., 2014; Laughlin M.R. et al., 2014].

В нашей работе при ожирении у крыс Спрейг-Дуоли выявлено снижение индекса массы семенников и снижение концентрации половых стероидных гормонов – эстрадиола, общего и свободного тестостерона. Хорошо известно, что ожирение у мужчин достоверно ассоциируется с гипогонадизмом: низким уровнем общего и свободного тестостерона крови и снижением концентрации связывающего половые гормоны глобулина [Калинченко С.Ю. и соавт., 2015; Fui M.N.T. et al., 2014]. При развитии ожирения в жировой ткани усиливается ароматизация андрогенов с образованием эстрогенов, которые подавляют гонадотропную функцию гипофиза [Роживанов Р.В., 2014]. Однако локальное повышение образования эстрадиола в жировой ткани не обязательно должно приводить к повышению концентрации этого гормона в крови [Fui M.N.T. et al., 2014]. По данным S. Dhindsa et al. (2011) ожирение у мужчин может сопровождается

одновременным снижением содержания как тестостерона, так и эстрадиола, что совпадает с нашими данными.

Нами выявлено повышение содержания кортикостерона в сыворотке крови у самцов крыс Спрейг-Доули при ожирении, что согласуется с результатами, полученными как при исследовании людей и лабораторных животных с ожирением [Bjorntorp P., Rosmond R., 2000; Salehi M. et al., 2005]. Несмотря на большое количество данных о том, что глюкокортикоиды способствуют развитию ожирения, до сих пор не ясно, почему ожирение вызывает повышение содержания этих гормонов в плазме крови.

Кортизол – основной представитель группы глюкокортикоидных гормонов, которые прямо или опосредованно регулируют практически все физиологические и биохимические процессы в организме человека. У грызунов основным и наиболее активным глюкокортикоидным гормоном является кортикостерон. Диапазон действия этих стероидов очень широк. Глюкокортикоиды играют ключевую роль в защитных реакциях организма при острых стрессорных воздействиях, а также в процессах адаптации к длительному действию внешних факторов [Довжикова И.В., 2010; Liebman T., 2010]. Глюкокортикоиды активируют гликогенолиз и глюконеогенез, стимулируют липолиз и увеличивают количество свободных жирных кислот, регулируют белковый обмен. В связи с чем повышение содержания кортикостерона у крыс с ожирением, очевидно, является адаптивной реакцией.

Стресс и увеличение продукции глюкокортикоидов могут быть одним из факторов, повышающих потребление пищи, в особенности жиров и углеводов, способствуя развитию ожирения [Hewagalamulage S.D. et al., 2016]. Люди с повышенным содержанием кортикостерона имеют более высокий риск развития ожирения и сахарного диабета [Liebman T., 2010; Hewagalamulage S.D. et al., 2016]. Повышение содержания кортизола в 2-5 раз на системном уровне приводит к развитию синдрома Ицэнко-Кушинга,

который сопровождается висцеральным ожирением. В ряде работ на моделях ожирения у животных описано локальное повышение содержания кортикостерона в жировой и других тканях, обусловленные высокой активностью фермента 11 β -гидроксистероид-дегидрогеназы 1 [Salehi M. et al., 2005]. Этот фермент выявляется во многих тканях. Он превращает неактивную форму гормона (кортизон у человека или 11-дегидрокортикостерон у грызунов) в активную - кортизол или кортикостерон, соответственно [Walker B.R., Andrew R., 2006]. Таким образом, этот фермент способствует накоплению жировой ткани, преимущественно висцеральной, развитию метаболического синдрома и сахарного диабета II типа [Селяницкая В.Г., 2012; Lee M.-J. et al., 2014]. Однако до конца не ясно, почему ожирение может вызывать повышение содержания кортизола/кортикостерона в плазме крови. Возможно, при ожирении это связано с функциональным дисбалансом системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники [Bjorntorp P., Rosmond R., 2000; Salehi M. et al., 2004].

При ожирении у крыс нами не выявлено статистически значимых различий показателей содержания в сыворотке крови IGF-1 по сравнению с животными контрольной группы. В ряде исследований *in vitro* и *in vivo* показано, что изменение содержания инсулиноподобного фактора роста (IGF-1) в плазме крови связано с инсулинорезистентностью, ожирением, дислипидемией, заболеваниями сердечно-сосудистой системы и сахарным диабетом [Alemán J.O., 2014; Aguirre G.A. et al., 2016]. Кроме того, в условиях гипергликемии и гиперинсулинемии IGF-1 обладает митогенным и антиапоптотическим эффектам при ожирении, что многие исследователи связывают с развитием карцином различной локализации [Alemán J.O. et al., 2014; Martinez-Useros J., Garcia-Foncillas J., 2016].

Также в сравниваемых группах мы не обнаружили достоверного изменения концентрации эпидермального фактора роста EGF в сыворотке

крови. EGF является одной из ключевых молекул сложных молекулярных каскадов, приводящих к развитию рака, в том числе рака толстой кишки [Lien G.-S. et al., 2014]. При ожирении повышается уровень лептина, который стимулирует экспрессию EGF-рецепторов, что приводит к усилению пролиферации опухолевых клеток и ингибирует апоптоз [Acosta A., Camilleri M., 2014].

В нашей работе не выявлено достоверных различий содержания провоспалительных (ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-2) и противовоспалительного (ИЛ-4) цитокинов в культуральной жидкости клеток селезенки, не стимулированных и стимулированных конканавалином-A, у крыс контрольной группы и с ожирением. Таким образом, у крыс с ожирением не нарушается баланс уровня про- и противовоспалительных цитокинов. Данные литературы по результатам оценки содержания про- и противовоспалительных цитокинов противоречивы, и в большинстве работ исследования проводили на материале периферической крови. Определение содержания цитокинов в периферической крови позволяет оценить только их секрецию, а в культуральной жидкости клеток селезенки – их секрецию и продукцию [Ярилин А.А., 2010]. Работы по определению продукции цитокинов клетками селезенки у экспериментальных животных в литературе отсутствуют.

При увеличении массы висцеральной жировой ткани и инсулинорезистентности клетки жировой ткани - адипоциты, активированные моноциты и макрофаги, секретируют провоспалительные цитокины и адипокины, включая так называемую «триаду воспаления» - ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6 [Tilg H., Moschen A.R., 2006; Ouchi N. et al., 2011; Divella R. et al., 2016]. ФНО- α и ИЛ-1 β , секретируемые адипоцитами висцеральной жировой ткани у грызунов и людей, влияют на чувствительность к инсулину изменяя экспрессию рецептора инсулина IRS-1 и переносчика [Boulangé C.L. et al., 2016]. Так, в работе D.B. Panagiotakos et

al. (2005) продемонстрировано повышение содержания в плазме крови ИЛ-6 и ФНО- α у мужчин и женщин с ожирением по сравнению с людьми с нормальным весом (на 42 и 30%, соответственно) и с центральным ожирением по сравнению с равномерным распределением жира (на 46 и 28% соответственно). Следует отметить, что в этой работе были исследованы 1518 мужчин и 1524 женщины, а показатели ИЛ-6 и ФНО- α и других маркеров воспаления (С-реактивного белка, количества лейкоцитов) находились в прямой зависимости от веса, ИМТ, объема талии, бедер и их соотношения [Panagiotakos D.B. et al., 2005]. Р.А. Kern et al. (2001) не обнаружили повышение содержания ФНО- α в плазме крови у людей с высоким ИМТ, но выявили увеличение ИЛ-6. В экспериментальных работах у мышей, потреблявших рацион с высоким содержанием жиров, выявлено повышение концентрации ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6 в плазме крови [Yook J.S. et al., 2017] и их мРНК в жировой ткани [Kim K.-A. et al., 2012].

По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением в периферической крови возрастает абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов (CD3⁺ и CD45R+CD3⁻ клетки соответственно). Литературные сведения о субпопуляционном составе лимфоцитов немногочисленны и противоречивы. В ряде работ при ожирении у людей оценивали содержание лимфоцитов в периферической крови. Так, в исследовании А. Yoshimura et al. (2015) авторы сравнивали 2 группы студентов, отличающихся по ИМТ (20-22 кг/м² и более 35 кг/м²), и выявили, что при ожирении в крови повышается количество лейкоцитов и моноцитов, но не лимфоцитов. Причем количество лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов коррелирует с инсулинорезистентностью, дислипидемией, объемом жировой ткани и концентрацией печеночных ферментов (АСТ, АЛТ, холинэстеразы и гамма-глутамилтрансферазы) [Yoshimura A. et al., 2015]. Т. Magrone et al. (2017) выявили увеличение абсолютного количества CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ и CD16⁺CD56⁺ лимфоцитов у людей с ожирением [Magrone T. et al., 2017]. Однако по данным K. van der Weerd et al. (2012) при ожирении у людей

повышается содержание CD4⁺ и T_H2 Т-клеток, но не CD8⁺ [Weerd K. et al., 2012]. В нашей работе не обнаружено увеличения абсолютного количества Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), активированных Т-хелперов (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻) и регуляторных Т-клеток у крыс с ожирением (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Выявленное нами увеличение в периферической крови абсолютного количества Т- и В- лимфоцитов, очевидно, отражает активацию процессов их дифференцировки и миграции.

В нашем исследовании установлено, что у крыс Спрейг-Доули с ожирением повышается содержание эндотоксина в сыворотке крови на 18%, что согласуется с данными от том, что высококалорийное питание, богатое жирами и углеводами, вызывает изменения состава микробиоты и повышение уровня бактериального ЛПС [Lumeng C.N., 2013; Everard A., Cani P.D., 2013]. C.B. De La Serre et al. (2010) у крыс с ожирением выявили повышение концентрации ЛПС в плазме крови. У людей высокий уровень ЛПС в сыворотке крови коррелирует с выраженность висцерального ожирения и инсулинорезистентностью [Moreira A.P.B. et al. 2015; Lassenius M.I. et al. 2016]. ЛПС связывается с TLR-4 и через активацию NF-κB индуцирует экспрессию фактора хемотаксиса моноцитов MCP-1, обеспечивающего миграцию макрофагов в очаг воспаления [Deshmane S.L., 2009; Mancuso P., 2016]. Однако у крыс с алиментарным ожирением провоспалительные эффекты ЛПС на системном уровне по данным исследования цитокинового профиля отсутствуют. Они, очевидно, нивелируются за счет высокого содержания кортикостерона, который у крыс с ожирением повышался по сравнению с контрольной группой.

По данным морфологического исследования у крыс Спрейг-Доули с ожирением нами выявлены признаки локального воспаления в висцеральной жировой ткани - короноподобные структуры с воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и CD68-положительными макрофагами. По данным ряда авторов количество макрофагов в жировой ткани коррелирует с

инсулинорезистентностью [Weisberg S.P. et al., 2003; Lumeng C.N et al., 2007; Lumeng C.N et al., 2014], а появление короноподобных структур является индикатором процессов воспаления в жировой ткани [Cinti S., 2005; Spencer M. et al., 2010]. По данным A. Sica, A. Mantovani (2012) и T. McLaughlin et al. (2017) в короноподобных структурах преобладают «классически активированные» провоспалительные макрофаги M1 типа. В нашей работе по данным, полученным с помощью метода проточной цитофлюориметрии, в гомогенате жировой ткани у крыс Спрейг-Доули с ожирением увеличивается количество CD68 положительных макрофагов, но не CD163 положительных. Гликопротеин CD163 экспрессируется на клеточной мембране тканевых макрофагов, но его экспрессия не характерна для моноцитов, макрофагов в легких и микроглии. CD163 описывают как маркер альтернативно активированных макрофагов M2 типа [Lau S.K. et al., 2004; Fabrick B.O. et al., 2005]. Гликопротеин CD68 экспрессируется на поверхности и мембранах лизосом моноцитов крови и тканевых макрофагов и является классическим панмакрофагальным маркером, хотя известно, что слабая экспрессия этого маркера возможна в лимфоцитах, фибробластах и эндотелиальных клетках [Barros M.H.M. et al., 2013]. Таким образом, выявленные у крыс с ожирением короноподобные структуры в жировой ткани и увеличение CD68-положительных клеток отражают развитие воспалительного процесса в жировой ткани.

В нашей работе у крыс с ожирением выявлены изменения состава микрофлоры ободочной кишки: в составе пристеночной микрофлоры снизилось содержание одного из преобладающих в норме типов - *Bacteroidetes*. Во многих исследованиях, показано изменение состава микрофлоры при ожирении, в частности типов *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и их соотношения [DiBaise J.K, 2012; Yang J.Y., Kweon M.N., 2016]. По данным ряда авторов для ожирения характерно увеличение количества представителей типа *Firmicutes* и уменьшение *Bacteroidetes* [McPhee J.B., Schertzer J.D., 2015; Winer D.A., 2016; Baothman O.A. et al., 2016]. Однако в

других работах продемонстрированы противоположные сдвиги в составе микрофлоры, в том числе увеличение представителей порядка *Bacteroidales* [Hamilton M.K. et al., 2015; Boulange C.L. et al., 2016].

Кроме того, по нашим данным в просветной микрофлоре при ожирении снижается содержание вида *Akkermansia muciniphila* у крыс с ожирением. Известно, что количество *A. muciniphila* в просветной микрофлоре уменьшается у людей и экспериментальных животных при ожирении, включая мышей ob/ob с дефектом гена лептина [McPhee J.B., Schertzer J.D., 2015]. Кроме того, количество *A. muciniphila* в составе микрофлоры положительно коррелирует с содержанием муцинов на поверхности слизистой оболочки ободочной кишки [Derrien M. et al., 2016; Everard A. et al., 2013; Schneeberger M. et al., 2015]. Таким образом, снижение содержания *A. muciniphila* взаимосвязано со снижением толщины слоя муцинов и повышенной проницаемостью эпителия кишечника, в частности, для эндотоксинов, которые активируют в первую очередь воспалительные реакции в слизистой оболочке ободочной кишки [Alemán J.O. et al., 2014].

По данным морфологического исследования эпителиального барьера слизистой оболочки ободочной кишки у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой выявлено уменьшение размеров бокаловидных клеток. Обнаружено уменьшение объемной доли ШИК-позитивных бокаловидных клеток, а также снижение интенсивности окрашивания в них нейтральных (ШИК-положительных) и высоко сульфатированных (альциан-позитивных) гликопротеинов у крыс ожирением. L.G. Teixeira et al. (2011) и F. Reichardt et al. (2013) в непродолжительных экспериментах длительностью 8-12 недель не выявили в слизистой оболочке толстой кишки различий показателей количества бокаловидных клеток у мышей контрольной группы и с ожирением [Teixeira L.G. et al., 2011]. Напротив, K.M. Hamilton et al. (2015) при исследовании слепой кишки у крыс, потреблявших в течение 6 недель корм с высоким содержанием жиров, обнаружили снижение числа

бокаловидных клеток на крипту после первой недели эксперимента, но не в более отдаленные сроки (6 недель). По данным Н.А. Золотовой и О.В. Макаровой (2016) снижение числа бокаловидных клеток в ободочной кишке коррелирует с тяжестью язвенного колита, а нарушения структурных и физико-химических свойств слизи играют важную роль в механизмах развития язвенного колита, повышая проницаемость кишечного барьера.

Таким образом, по нашим данным у крыс при длительном потреблении высококалорийного рациона (40 недель) нарушается состояние эпителиально-слизистого барьера ободочной кишки: снижается объемная доля ШИК-позитивных бокаловидных клеток и интенсивность окрашивания в них нейтральных и высоко сульфатированных гликопротеинов, что сочетается со снижением содержания в просветной микрофлоре *A. muciniphila*, разрушающего муцины.

Подобные нарушения не были выявлены в кратковременных экспериментах при ожирении у лабораторных животных. Однако следует отметить, что такие изменения состояния эпителиального барьера слизистой оболочки кишки и, в частности, размера бокаловидных клеток, их числа и особенностей биохимического состава их секрета, при ожирении аналогичны изменениям в кишке при выраженном воспалительном процессе - язвенном колите [Золотова Н.А., Макарова О.В., 2016]. Показатель количества хромогранин-позитивных эпителиальных клеток при ожирении не изменяется.

По данным морфологического исследования у крыс Спрейг-Доули с ожирением по сравнению с контролем в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) ободочной кишки нами выявлено увеличение количества клеточных элементов в соединительной ткани между криптами и в базальном отделе (на 29 и 34%, соответственно). Среди них было достоверно увеличено относительное содержание лимфоцитов и нейтрофилов (на 65% и 25% соответственно). Количество плазмоцитов в сравниваемых группах

статистически значимо не отличалось. Кроме того, у крыс с ожирением повысился в 2 раз показатель относительного количества макрофагов (CD68 положительных клеток), а относительная объёмная плотность CD68 положительно окрашенных структур в СПСО увеличилась в 4,1 раза.

Данные литературы об изменениях клеточного состава СПСО кишки при ожирении немногочисленны и противоречивы. В двух непродолжительных экспериментальных исследованиях не было выявлено инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки ободочной кишки. Так, F. Reichardt et al. (2013) не обнаружили инфильтрации СПСО макрофагами у мышей, потреблявших корм с высоким содержанием жиров в течение 12 недель. L.G. Teixeira et al. (2011) в эксперименте длительностью 8 недель также не обнаружили признаков воспалительной инфильтрации в слизистой оболочке и подслизистой основе толстой кишки у мышей с ожирением. Однако авторы показали, что у мышей с ожирением повышалось относительное количество нейтрофилов (GR1+), моноцитов и макрофагов (МОМА+) и активированных макрофагов (МОМА+ CD80+) [Teixeira L.G. et al., 2011]. Следует отметить, что в работе L.G. Teixeira et al. (2011) было обнаружено, что воспалительная инфильтрация у мышей с колитом на фоне ожирения выражена сильнее, чем у мышей с колитом без ожирения, и она характеризовалась увеличением относительного количества активированных Т-лимфоцитов (CD4+ CD69+).

В отличие от других экспериментальных исследований в работе Н. Luck et al. (2015) обнаружено увеличение абсолютного числа лимфоидных клеток в толстой кишке у мышей, потреблявших корм с высоким содержанием жиров в течение 12-16 недель. Причем, авторы выявили повышение абсолютного и относительного содержания CD8+ Т-лимфоцитов и продуцирующих ИФН- γ Th1 клеток, а относительное количество CD4+ Foxp3+ регуляторных Т-лимфоцитов снизилось. По данным Н. Luck et al. (2015) у людей с ожирением в толстой и тонкой кишке наблюдались

аналогичные изменения клеточного состава: повышалось количество T-bet⁺ и CD8⁺ клеток, а регуляторных T-клеток снижалось [Luck H. et al., 2015]. Однако следует отметить, что материалом для данного клинического исследования были участки кишки вне зоны опухоли, полученные при хирургической резекции по поводу рака толстой кишки. Авторы отмечают, что выявленные ими провоспалительные изменения состава лимфоидных клеток не были ассоциированы с морфологическими признаками хронического или острого воспаления в кишке [Luck H. et al., 2015].

Таким образом, в экспериментальных и клинических работах представлены данные об изменении состава клеток толстой кишки при ожирении, а именно повышении количества нейтрофилов, макрофагов и некоторых субпопуляций лимфоцитов, что согласуется с нашими данными и отражает реактивные изменения локального компартмента иммунной системы.

По данным окрашивания пикросириусом красным с оценкой в поляризованном свете у крыс Спрейг-Дули с ожирением в СПСО ободочной кишки по сравнению с контрольной группой выявлены изменения фибриллярного компонента внеклеточного матрикса – увеличение относительной площади незрелых волокон между криптами и зрелых в базальном отделе СПСО.

Внеклеточный матрикс представлен в основном фибриллярными коллагенами I–III типов и его ремоделирование, очевидно, связано с изменением активности матриксных металлопротеиназ (ММП), таких как коллагеназы и желатиназы. Синтез и секреция металлопротеиназ осуществляется нейтрофилами, макрофагами, фибробластами, эндотелиальными и эпителиальными клетками [Маркелова Е.В. и соавт., 2016]. Ремоделирование матрикса стенки ободочной кишки при ожирении является сложным процессом, который регулируется многими молекулами. Транскрипция и экспрессия протеаз регулируется гормонами, цитокинами,

такими как интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6), и факторами роста (EGF, HGF, TGF β , ФНО- α). Тканевые ингибиторы металлопротеаз (ТИМП) ограничивают протеолиз тканей и разрушение экстрацеллюлярного матрикса, вызванное активными ММП. Транскрипция ТИМП регулируется теми же цитокинами и факторами роста, которые контролируют экспрессию ММП, включая TGF β , ФНО α , ИЛ-1, ИЛ-6 [Ярмолинская М.И и соавт., 2012].

Таким образом, увеличение относительной площади незрелых и зрелых волокон между криптами и в базальном отделе СПСО отражает усиление процессов образования коллагена и ремоделирование внеклеточного матрикса СПСО, что вероятно связано с провоспалительной активацией макрофагов и других клеток локальной иммунной системы кишки.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным литературы алгоритм воспроизведения моделей ожирения на лабораторных животных, длительно находившихся на адипогенном рационе, не разработан и существующие модели недостаточно охарактеризованы. В работе была создана воспроизводимая у 85% животных модель ожирения, основанная на использовании в течение 40 недель высококалорийного рациона с высоким содержанием жиров и углеводов. Модель детально охарактеризована по морфологическим и биохимическим параметрам. Результаты исследования показали, что через 40 недель у крыс неустойчивых к высококалорийному рациону развилось ожирение. У них увеличился ИМТ, масса тела и жировой ткани, окружающей придаток семенника, а также отношение массы тела и жировой ткани. По данным морфологического исследования у крыс выявлены характерные для ожирения изменения внутренних органов: в печени - жировая дистрофия, в поджелудочной железе - липоматоз, в жировой ткани придатка семенников - гипертрофия адипоцитов и короноподобные структуры. По данным биохимического исследования ожирение у крыс Спрейг-Доули характеризуется гиперинсулинемией и тенденцией к повышению концентрации глюкозы, что отражает нарушения регуляции метаболизма углеводов. Кроме того, у крыс с ожирением выявлено повышение уровня триглицеридов и снижение содержания холестерина, а также уменьшение концентрации стероидных половых гормонов - эстрадиола, общего и свободного тестостерона.

У крыс Спрейг-Доули с ожирением обнаружено повышение содержания эндотоксина в сыворотке крови, что согласуется с данными о том, что высококалорийное питание, богатое жирами и углеводами, вызывает изменения состава микробиоты и повышение уровня бактериального ЛПС. Однако провоспалительные эффекты эндотоксина у животных с ожирением, очевидно, нивелируются за счет высокого содержания кортикостерона. Нами не выявлено достоверных различий содержания провоспалительных

цитокинов (ФНО- α , ИНФ- γ , ИЛ-2) и противовоспалительного (ИЛ-4) в культуральной жидкости клеток селезенки, не стимулированных и стимулированных конканавалином-А у крыс контрольной группы и с ожирением. По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением в периферической крови возрастает абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов (CD3⁺ и CD45R⁺CD3⁻ клетки соответственно).

По данным морфологического исследования у крыс Спрейг-Доули с ожирением выявлены признаки локального воспаления в висцеральной жировой ткани - короноподобные структуры с воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и CD68-положительными макрофагами.

На экспериментальной модели ожирения установлено, что в ободочной кишке изменяется состав пристеночной микрофлоры, снижается содержание одного из преобладающих в норме типов – *Bacteroidetes*. Кроме того, впервые выявлено снижение содержания в просветной микрофлоре вида *Akkermansia muciniphila* у крыс с ожирением.

Впервые в данной работе проведено исследование морфологических изменений толстой кишки в сочетании с изменениями качественного состава основных таксонов кишечной микрофлоры - *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. На экспериментальной модели ожирения установлено, что в ободочной кишке нарушается эпителиальный барьер. У крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой выявлено уменьшение размеров бокаловидных клеток, снижение объемной доли ШИК-позитивных бокаловидных клеток и интенсивности окрашивания в них нейтральных (ШИК-положительных) и высокосульфатированных (альциан-позитивных) гликопротеинов. Таким образом, снижение содержания высокосульфатированных и нейтральных гликопротеинов в составе муцинов сочетается с повышением проницаемости эпителиального барьера, что приводит к увеличению содержания эндотоксина в периферической крови. Важную роль в этих процессах играет снижение содержания *Akkermansia muciniphila*, связанное с истончением слоя

муцинов. При ожирении в ободочной кишке наблюдаются реактивные изменения, обусловленные активацией локального компартмента иммунной системы, которые характеризуются увеличением относительного содержания CD68-положительных макрофагов, лимфоцитов и нейтрофилов, что сочетается с усилением процессов ремоделирования коллагенового матрикса СПСО ободочной кишки.

6. ВЫВОДЫ

1. Разработана и охарактеризована по морфологическим и биохимическим параметрам воспроизводимая у 85% крыс Спрейг-Доули модель алиментарного ожирения, основанная на длительном использовании, в течение 40 недель, высококалорийного рациона с повышенным содержанием пальмового масла и фруктозы.

2. Алиментарное ожирение у животных характеризуется повышением на 24% индекса массы тела, в 2.7 раз массы жировой ткани, окружающей придаток семенника, и увеличением в ней в 2 раза размера адипоцитов, а также жировой дистрофией печени и липоматозом поджелудочной железы. Развитие ожирения сопровождается метаболическими нарушениями: гиперинсулинемией, повышением уровня триглицеридов, а также уменьшением концентрации в сыворотке крови стероидных половых гормонов – общего, свободного тестостерона и эстрадиола.

3. По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением сохраняется баланс уровня продуцируемых клетками селезенки провоспалительных цитокинов - ИЛ-2, ИНФ- γ и ФНО- α и противовоспалительного - ИЛ-4, что обусловлено повышением содержания в сыворотке крови кортикостерона, который ингибирует воспалительный ответ. В периферической крови возрастает абсолютное количество Т- и В-лимфоцитов, что отражает активацию процессов их дифференцировки и миграции.

4. В жировой ткани у животных с ожирением выявляется большое количество короноподобных структур с воспалительной инфильтрацией лимфоцитами и CD68-положительными макрофагами. По данным проточной цитофлуориметрии, в популяции клеток, выделенных из жировой ткани, в 2 раза повышается содержание CD68-положительных макрофагов.

5. По данным оценки состава микрофлоры ободочной кишки методом полимеразной цепной реакции, при ожирении у крыс в составе пристеночной микрофлоры снижается содержание бактерий типа *Bacteroidetes*, в просветной микрофлоре - вида *Akkermansia muciniphila*, разрушающего муцины.

6. При ожирении нарушается состояние эпителиального барьера слизистой оболочки ободочной кишки: снижается объемная доля ШИК-позитивных бокаловидных клеток и интенсивность окрашивания в них нейтральных и высокосульфатированных гликопротеинов. Показатель количества хромогранин-позитивных эпителиальных клеток при ожирении не изменяется. В сыворотке крови возрастает уровень эндотоксина, что отражает увеличение проницаемости эпителиального барьера.

7. По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением в слизистой оболочке ободочной кишки развиваются реактивные изменения с увеличением количества клеточных элементов и среди них - относительного содержания лимфоцитов, нейтрофилов и CD68-положительных макрофагов, а также возрастает относительная доля зрелых и незрелых коллагеновых волокон.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ — аланинаминотрансфераза

АСТ — аспартатаминотрансфераза

ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения

ГЛЮТ — глюкозный транспортёр

ДК — дендритные клетки

ЖКТ — желудочно-кишечного тракта

ИЛ — интерлейкин (Interleukin, IL)

ИМТ — индекса массы тела

ИНФ- γ — интерферон- γ

ИФА — иммуноферментный анализ

КМБ — кишечная микробиота

ЛПВП — липопротеины высокой плотности

ЛПНП — липопротеины низкой плотности

ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности

ЛПС — бактериальные липополисахариды

мРНК — матричная Рибонуклеиновая Кислота

МЭЛ — межэпителиальные лимфоциты

ПЦР — полимеразная цепная реакция

СЖК — свободные жирные кислоты (

СПСО — собственная пластинка слизистой оболочки

ФНО- α — фактор некроза опухолей α (Tumor Necrosis Factor, TNF α)

CLS — короноподобные структуры (Crown-Like Structures)

DAMP — эндогенные сигналы опасности (Danger-Associated Molecular Pattern)

DIO — животные, не устойчивые к высококалорийному рациону; крысы с ожирением (Diet Induced Obesity, gainers)

DR — животные, устойчивые к высококалорийному рациону (Diet Resistant, resisters)

EGF — эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor)

FIAF — фактор жировой ткани, индуцируемый голоданием, ангиопоэтин-подобный белок 4 (Fasting-Induced Adipose Factor)

HIF— гипоксией-индуцируемый фактор (Hypoxia-Inducible Factor)

IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста, ИФР (Insulin-Like Growth Factor 1)

IKKB — ингибитор киназы каппа В (Inhibitor of Kappa B Kinase)

IRS — субстрат рецептора инсулина (Insulin Receptor Substrate)

JNK — c-Jun-N-терминальная киназа (c-Jun N-terminal Kinase)

MALT — мукозальная иммунная система (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)

MCP-1 — фактор хемотаксиса моноцитов (Monocyte Chemoattractant Protein-1 или CCL2),

MIF — макрофагингибирующий фактор (Macrophage Migration Inhibition Factor)

NF-κB — ядерный фактор «каппа-би» (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NOD — NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors; NLR)

NPY — нейропептид Y (Neuropeptide Y)

PAI-1 — ингибитор-1 активатора плазминогена (Plasminogen Activator Inhibitor-1)

PAMP— образы патогенности (Pathogen-Associated Molecular Pattern)

SCFA — короткоцепочечные жирные кислоты (Short-Chain Fatty Acids)

TGF-β — трансформирующий фактор роста-β (Transforming Growth Factor-β)

TLR — толл-подобные рецепторы (Toll-Like Receptors)

UCP1 — термогенин (Thermogenin Uncoupling Protein 1)

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева Е.В., Хомякова Т.И., Макарова О.В. Морфологические изменения слизистой оболочки ободочной кишки и состав просветной микрофлоры у орхизектомированных половозрелых самцов крыс Вистар // Андрология и генитальная хирургия. 2015. Т.4. С.35-39.
2. Берштейн Л.М. Внегонадная продукция эстрогенов (роль в физиологии и патологии). СПб: Наука .1998. 172 с.
3. Вельков В.В. Свободные жирные кислоты: новые возможности ранней диагностики инсулинорезистентности и мониторинга тяжести ишемии // Альманах клинической медицины. 2010. Т.23. С.60-66.
4. Греков Е.А., Кирпатовский В.И., Голованов С.А., Дрожжева В.В., Казаченко А.В. Оценка влияния метаболического синдрома, андрогенного дефицита и стресса на развитие хронической болезни почек и печени у самцов белых крыс // Экспериментальная и клиническая урология. 2012. Т.4. С.8-13.
5. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Бутрова С.А. Жировая ткань как эндокринный орган // Ожирение и метаболизм. 2006. Т.1. С.6-12.
6. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Романцова Т.И. Патогенетические аспекты ожирения // Ожирение и метаболизм. 2004. Т.1. С.3-9.
7. Денисенко А.Д. Ожирение и атеросклероз: роль адипокинов // Медицинский академический журнал. 2010. Т.4. С.45-49.
8. Довжикова И.В. Кортизол при беременности // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. Т6 (1). С.226-229.
9. Золотова Н.А., Макарова О.В. Барьерная роль муцинов толстой кишки в норме и при язвенном колите // КЭМ. 2014. Т.19 (3). С.69-74.
10. Калинин С.Ю., Тюзиков И.А., Ворслов Л.О., Тишова Ю.А., Греков Е.А., Фомин А.М. Ожирение (инсулинорезистентность) и бесплодие – две стороны одной медали: патогенетические взаимодействия и возможности современной фармакотерапии // Consilium medicum. 2015. Т. 17 (4). С.51-58.

11. Карповец Т.П., Конопельнюк В.В., Галенова Т.И., Савчук А.Н., Остапченко Л.И. Высококалорийная диета как фактор развития преддиабета у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т.11. С.582-585.
12. Козырева П.М., Сафронова А.М., Старовойтов М.Л. Анализ фактического питания и пищевого статуса различных групп населения // Вестник Российского мониторинга экономического положения и здоровья населения НИУ ВШЭ (RLMS-HSE). Вып. 4: отв. ред. П. М. Козырева. М.: Нац. исслед. ун-т «Высшая школа экономики», 2014. 207 с.: С. 131-165 [Электронный ресурс] / https://www.hse.ru/data/2014/08/19/1314648100/Vestnik%20RLMS-HSE_2014.pdf. Дата обращения: 03.04.2017.
13. Корниенко Е.А., Нетребенко О.К. Ожирение и кишечная микробиота: современная концепция взаимосвязи // Педиатрия. 2012. Т.91 (2) С.11-12
14. Кузнецов Б.А. Определитель позвоночных животных фауны СССР. В 3-х частях. Часть 3. Млекопитающие // М.: Просвещение. 1975 г. 208 с.
15. Кучерявый Ю.А. Мальнутриция при хроническом панкреатите: механизмы патогенеза // Consilium Medicum. 2015. Т.8. С.42-46.
16. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., Егорова Е.Н., Миняев М.В., Петрова М.Б. Диетически индуцированные животные модели Метаболического синдрома // Верхневолжский медицинский журнал. 2015. Т.14 (2). С.34-39.
17. Лямина С.В., Малышев И.Ю. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа // Фундаментальные исследования. 2014. Т.10. С.930-935.
18. Макарова М.Н., Крышень К.Л., Алякринская А.А., Рыбакова А.В., Макаров В.Г. Характеристика микрофлоры кишечника у человека и лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. 2016. Т.4. С.86-93.

19. Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л., Бирко О.Н. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // Иммунопатология, Аллергология, Инфектология. 2016. Т.2. С.11-12.
20. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. В 2-х томах. Т. 2. М.: Мир. 1993. 415 с.
21. Международная классификация болезней (МКБ-10) [Электронный ресурс] / <http://мкб-10.рф/ozhirenie/>. Дата обращения: 03.04.2017.
22. Монастырская Е.А. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. 2008. Т.6 (4). С.31-39
23. Мяделец О.Д., Мяделец В.О., Соболевская И.С., Кичигина Т.Н. Белая и бурая жировые ткани: взаимодействие со скелетной мышечной тканью // Вестник ВГМУ. 2014. Т.5. С.32-44.
24. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера в трех томах. Том 2. Биоэнергетика и метаболизм // М.: Бином. Лаборатория знаний. 2014. 636с.
25. Николаев А.Я., Осипов Е.В. Биохимия инсулинозависимого сахарного диабета // Биохимические основы патологических процессов: учеб. пособие / под ред. Е.С. Северина. М.: Медицина, 2000. С.266-278.
26. Овсянко Е.В., Пахомова Ю.В., Овсянко Я.У., Васильева О.В., Залавина С.В., Виноградов А.С. Структурно-функциональная организация регионарного лимфатического аппарата толстой кишки интактных животных // Медицина и образование в Сибири. 2014. Т.2.
27. Петренко В.М. Форма и топография ободочной кишки у белой крысы // Успехи современного естествознания. 2011. Т.12. С.17-21.
28. Проблема ожирения: краткие статистические данные [Электронный ресурс] / <http://www.euro.who.int/ru/health-topics/noncommunicable-diseases/obesity/data-and-statistics>. Дата обращения: 03.04.2017

29. Решетняк М.В, Хирманов В.Н., Зыбина Н.Н., Фролова М.Ю., Сакута Г.А., Кудрявцев В.Н. Модель метаболического синдрома, вызванного кормлением фруктозой: патогенетические взаимосвязи обменных нарушений // Медицинский Академический Журнал. 2011. Т.11 (3). С.23-27.
30. Роживанов Р.В. Синдром гипогонадизма у мужчин // Ожирение и метаболизм. 2014. Т.2. С.30-34. doi: 10.14341/omet20141230-34.
31. Ройтберг Е.Г. Метаболический синдром / Под ред. Г.Е. Ройтберг. М.: МЕДпресс-информ. 2007. 224 с.
32. Романцова Т.И. Эпидемия ожирения: очевидные и вероятные причины // Ожирение и метаболизм. 2011. Т.1. С.5-19.
33. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов. М.: Медицина. 1996. 543 с.
34. Селятицкая В.Г. Глюкокортикоидные гормоны: от процессов адаптации к экологическим факторам севера до метаболических нарушений при диабете // Бюллетень СО РАМН. 2012. Т.32 (1). С.13-20.
35. Тихонов Е.А. Структурные изменения агрегированных лимфоидных узелков толстой кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т.159 (5). С.622–625.
36. Тихонов Е.А., Голиченков В.А., Макарова О.В., Михайлова Л.П. Возрастные изменения популяции энтерохромаффинных клеток и содержания серотонина в разных отделах ободочной кишки у крыс Вистар // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. Т.20 (4). С.49–54.
37. Шварц В. Жировая ткань как орган иммунной системы // Цитокины и воспаление. 2009. Т.8 (4). С.3-10.
38. Шварц В., Ногаллер А. Ожирение и кишечная микрофлора // Врач. 2014. Т.10. С.39-43.

39. Шварц В.Я. Воспаление жировой ткани: враг или друг? // Цитокины и воспаление. 2013. Т.12 (1-2). С.13-21.
40. Шишкина В.С., Ильинская О.П, Челомбитко М.А., Тарарак Э.М. М1 и М2 макрофаги в разных типах атеросклеротических поражений сонных артерий человека // Клиническая и профилактическая медицина: опыт и новые открытия: сборник материалов международной конференции. МЦНИП Киров. 2015. С.36–47.
41. Яглов В.В., Яглова Н.В. Новые концепции биологии диффузной эндокринной системы: итоги и перспективы ее изучения // Вестник РАМН. 2012. С.74-81.
42. Яглова Н.В., Яглов В.В. Новые аспекты исследования гистогенеза жировых тканей // КЭМ. 2015. Т.3 (15). С.68-71.
43. Ярилин А.А. Иммунология: учебник // М.: ГЭОТАР- Медиа, 2010. 752 с.
44. Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // Ж. акуш. и жен. болезни. 2012. Т.1. С.113-125.
45. Acosta A., Camilleri M. Gastrointestinal morbidity in obesity // Ann N Y Acad Sci. 2014. V.1311 (11). P.42–56. doi:10.1111/nyas.12385.
46. Adult Obesity in the United States [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://stateofobesity.org/adult-obesity/>. Дата обращения: 15.04.2017].
47. Aguirre G.A., Rodríguez De Ita J., de la Garza R.G., Castilla-Cortazar I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome // Journal of Translational Medicine. 2016. V.14 (3). doi: 10.1186/s12967-015-0762-z.
48. Akagiri S., Naito Y., Ichikawa H., Mizushima K., Takagi K., Handa O., Kokura S., Yoshikawa T.A. Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice // Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2008. V.42. P.150–157.

49. Al Mushref M., Srinivasan S. Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility // *Annals of Translational Medicine*. 2013. V.1 (2). P.14-17. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2012.11.01.
50. Aleman J.O., Eusebi L.H., Ricciardiello L., Patidar K., Sanyal A.J., Holt P.R.. Mechanisms of Obesity-induced gastrointestinal neoplasia // *Gastroenterology*. 2014. V.146 (2). P.357-73. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.051.
51. Altintas M.M., Azad A., Nayer B., Contreras G., Zaias J., Faul C., Nayer A. Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice // *Journal of Lipid Research*. 2011. V.52 (3). P.480–488. doi:10.1194/jlr.M011338.
52. Angelova P., Boyadjiev N. A review on the models of obesity and metabolic syndrome in rats // *Trakia Journal of Sciences*. 2013. V.11 (1). P.5-12.
53. Arai S., Maehara N., Iwamura Y., Honda S., Nakashima K., Kai T., Ogishi M., Morita K., Kurokawa J., Mori M., Motoi Y., Miyake K., Matsuhashi N., Yamamura K., Ohara O., Shibuya A., Wakeland E.K., Li Q.Z., Miyazaki T. Obesity-associated autoantibody production requires AIM to retain the immunoglobulin M immune complex on follicular dendritic cells // *Cell Rep*. 2013. V.25 (3). P.1187-98. doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.006.
54. Axelsen L.N., Lademann J.B., Petersen J.S., Holstein-Rathlou N.-H., Ploug T., Prats C., Pedersen H.D., Kjølbye A.L. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010. V.298. P.1560–1570.
55. Backhed F., Ding H., Wang T. Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage // *PNAS*. 2004. V.101. P.15718-15723.
56. Backhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice // *PNAS*. 2007. V.104 (3). P.979–984. doi:10.1073/pnas.0605374104.

57. Badrick T., Turner P. Review and Recommendations for the Component Tests in the Liver Function Test Profile // Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2016. V.31 (1). P.21–29. doi:10.1007/s12291-015-0493-1.
58. Baothman O.A., Zamzami M.A., Taher I., Abubaker J., Abu-Farha M. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes // Lipids in Health and Disease. 2016. V.15 (108). doi:10.1186/s12944-016-0278-4.
59. Bardou M., Barkun A.N., Martel M. Obesity and colorectal cancer // Gut. 2013. V.62 (6). P.933-947. doi:10.1136/gutjnl-2013-304701.
60. Barros M.H.M., Hauck F., Dreyer J.H., Kempkes B., Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages // PLoS ONE. 2013. V.8 (11), e80908. doi:10.1371/journal.pone.0080908.
61. Basaranoglu M., Basaranoglu G., Sabuncu T., Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease // World Journal of Gastroenterology. 2013. V.19 (8). P.1166–1172. doi:10.3748/wjg.v19.i8.1166.
62. Basaranoglu M., Basaranoglu G., Sabuncu T., Sentürk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease // World Journal of Gastroenterology. 2013. V.19 (8). P.1166-1172. doi:10.3748/wjg.v19.i8.1166.
63. Bjorntorp P., Rosmond R. Obesity and cortisol // Nutrition. 2000. V.16 (10). P.924-36.
64. Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. V.117 (6). P.241-50. doi: 10.1055/s-0029-1192044.
65. Boqué N., Campión J., Paternain L., García-Díaz D.F., Galarraga M., Portillo M.P., Milagro F., Ortiz de Solórzano C., Martínez J.A. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. // J Physiol Biochem. 2009. V. 65(4). P.387-95. doi: 10.1007/BF03185934.
66. Botros M., Sikaris K.A. The De Ritis Ratio: The Test of Time // The Clinical Biochemist Reviews. 2013. V.34 (3). P.117–130.

67. Boulangé C.L., Neves A.L., Chilloux J., Nicholson J.K., Dumas M.-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease // *Genome Medicine*. 2016. V.8 (42). doi:10.1186/s13073-016-0303-2.
68. Boutros M., Maron D. Inflammatory Bowel Disease in the Obese Patient // *Clin Colon Rectal Surg*. 2011. V.24 (4). P.244–252. doi:10.1055/s-0031-1295687.
69. Brown J.C., Meyerhardt J.A. Obesity and Energy Balance in GI Cancer // *J Clin Oncol*. 2016. V.34 (35). P.4217-4224. doi:10.1200/JCO.2016.66.8699.
70. Buettner R., Parhofer K., Woenckhaus M., Wrede C., Kunz-Schughart L.A., Schölmerich J., Bollheimer L.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types // *J Mol Endocrinol*. 2006. V.36 (3). P.485-501. doi: 10.1677/jme.1.01909.
71. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D., Neyrinck A.M., Fava F. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance // *Diabetes*. 2007. V.56. P.1761–72. doi: 10.2337/db06-1491.
72. Capasso M., Rashed Alyahyawi A., Spear S. Metabolic Control of B Cells: More Questions than Answers // *Frontiers in Immunology*. 2015. V.6 (80). doi:10.3389/fimmu.2015.00080.
73. Chang S., Graham B., Yakubu F., Lin D., Peters J.C., Hill J.O. Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats // *Am J Physiol*. 1990. V.259. P.1103-1110.
74. Cheroutre H., Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes // *Nat Rev Immunol*. 2011. V.11 (7). P.445-456. doi:10.1038/nri3007.
75. Choe S.S., Huh J.Y., Hwang I.J., Kim J.I., Kim J.B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders // *Frontiers in Endocrinology*. 2016. V.7 (30). <http://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>.
76. Chow S., Hedley D., Grom P., Magari R., Jacobberger J.W., Shankey T.V. Whole blood fixation and permeabilization protocol with red blood cell lysis

for flow cytometry of intracellular phosphorylated epitopes in leukocyte subpopulations // *Cytometry A*. 2005. V.67 (1). P.4-17. doi:10.1002/cyto.a.20167.

77. Cinti S., Mitchell G., Barbatelli G., Murano I., Ceresi E., Faloia E., Wang S., Fortier M. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans // *Journal of Lipid Research*. 2005. V.46 (11). P.2347–2355. doi:10.1194/jlr.M500294-JLR200.
78. Corcoran S.E., O'Neill L.A. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation // *J Clin Invest*. 2016. V.126 (10). P.3699-3707. doi:10.1172/JCI84431.
79. Cornelius P., MacDougald O.A., Lane M.D. Regulation of adipocyte development // *Annu. Rev. Nutr.* 1994. V.14. P.99–129. doi:10.1146/annurev.nu.14.070194.000531.
80. De La Serre C.B., Ellis C.L., Lee J., Hartman A.L., Rutledge J.C., Raybould H.E. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010. V.299 (2). P.440–448. doi:10.1152/ajpgi.00098.2010.
81. De Pergola G., Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer // *J Obes*. 2013. V.291546. doi: 10.1155/2013/291546.
82. Deng J.-Y., Huang J.-P., Lu L.-S., Hung L.-M. Impairment of cardiac insulin signaling and myocardial contractile performance in high-cholesterol/fructose-fed rats // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007. V.293. P.978–987. doi:10.1152/ajpheart.01002.2006.
83. Derrien M., Belzer C., de Vos W.M. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions // *Microb Pathog*. 2017. V.106. P.171-181. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.
84. Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., Sawaya B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009. V.29 (6). P.313–326. doi:10.1089/jir.2008.0027.

85. Devkota S., Wang Y., Musch M.W., Leone V., Fehlner-Peach H. Dietary fat-induced taurocholic acid production promotes pathobiont and colitis in IL-10^{-/-} mice // *Nature*. 2012. V.487 (7405). P.104-108. doi:10.1038/nature11225.
86. Dhindsa S., Furlanetto R., Vora M., Ghanim H., Chaudhuri A., Dandona P. Low Estradiol Concentrations in Men With Subnormal Testosterone Concentrations and Type 2 Diabetes // *Diabetes Care*. 2011. V.34 (8). P.1854-1859. doi:10.2337/dc11-0208.
87. DiBaise J.K., Frank D.N., Mathur R. Impact of the Gut Microbiota on the Development of Obesity: Current Concepts // *Am J Gastroenterol Suppl*. 2012. V.1. P.22–27. doi:10.1038/ajgsup.2012.5.
88. Divella R., De Luca R., Abbate I., Naglieri E., Daniele A. Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation // *Journal of Cancer*. 2016. V.7 (15). P.2346–2359. doi:10.7150/jca.16884.
89. Dobrian A.D., Davies M.J., Prewitt R.L., Lauterio T.J. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity // *Hypertension*. 2000. V.35. P.1009-1015.
90. Donath M.Y., Shoelson S.E. Type 2 diabetes as an inflammatory // *Nat Rev Immunol*. 2011. V.11 (2). P.98-107. doi: 10.1038/nri2925.
91. Erridge C., Attina T., Spickett C.M., Webb D.J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation // *Am J Clin Nutr*. 2007. V.86 (5). P.1286-92.
92. Everard A., Belzer C., Geurts L., Ouwerkerk J.P., Druart C., Bindels L.B., Guiot Y., Derrien M., Muccioli G.G., Delzenne N.M., Willem M.V., Cani P.D. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity // *PNAS*. 2013. V.110 (22). P.9066-9071. doi:10.1073/pnas.1219451110.
93. Everard A., Cani P.D. Diabetes, obesity and gut microbiota // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013. V.27 (1). P.73-83. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.007.

94. Fabbrini E., Sullivan S., Klein S. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications // *Hepatology*. 2010. V.51 (2). P.679–689. doi:10.1002/hep.23280.
95. Fabrick B.O. Dijkstra C.D., van den Berg T.K. The macrophage scavenger receptor CD163 // *Immunobiology*. 2005. V.210. P.153–160. doi:10.1016/j.imbio.2005.05.010.
96. Festi D., Colecchia A., Sacco T., Bondi M., Roda E., Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance // *Obes Rev*. 2004. V.5 (1). P.27-42.
97. Friedman J.M., Leibel R.L., Siegel D.S., Walsh J., Bahary N. Molecular mapping of the mouse Ob mutation // *Genomics*. 1991. V.11 (4). P.1054-62.
98. Fui M.N.T., Dupuis P., Grossmann M. Lowered testosterone in male obesity: mechanisms, morbidity and management // *Asian Journal of Andrology*. 2014. V.16 (2). P.223-231. doi:10.4103/1008-682X.122365.
99. Gadjia A.M., Pellizzon M.A., Ricci M.R., Ulman E.A Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rodent Models animal // *LABNEWS*. 2007. V.74. P.775-793.
100. Ghibaudi L., Cook J., Farley C., van Heek M., Joyce H.J. Fat Intake Affects Adiposity, Comorbidity Factors, and Energy Metabolism of Sprague-Dawley Rats // *Obes Res*. 2002. V.10 (9). P.956-63.
101. Guo X., Xia X., Tang R., Zhou J., Zhao H., Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs // *Lett Appl Microbiol*. 2008. V.47 (5). P.367-73. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x.
102. Hamilton M.K., Boudry G., Lemay D.G., Raybould H.E. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015. V.308 (10). P.840–851. doi:10.1152/ajpgi.00029.2015.

103. Harms M., Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential // *Nature Medicine*. 2013. V.19. P.1252–1263. doi:10.1038/nm.3361.
104. Hatton G.B., Yadav V., Basit A.W., Merchant H.A. Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans // *J Pharm Sci*. 2015. V.104 (9). P.2747-76. doi: 10.1002/jps.24365.
105. Hewagalamulage S.D., Lee T.K., Clarke I.J., Henry B.A. Stress, cortisol and obesity: a role for cortisol responsiveness in identifying 2 individuals prone to obesity // *Domest Anim Endocrinol*. 2016. V.56. P.112-20. doi: 10.1016/j.domaniend.2016.03.004.
106. Hosogai N., Fukuhara A., Oshima K., Miyata Y., Tanaka S., Segawa K., Furukawa S., Tochino Y., Komuro R., Matsuda M., Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation // *Diabetes*. 2007. V.56. P.901–911.
107. Ip B.C., Hogan A.E., Nikolajczyk B.S. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: of men and mice // *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2015. V.26 (2). P.91–100. doi:10.1016/j.tem.2014.12.001.
108. Kararli T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals // *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 1995. V.16 (5). P.351–380.
109. Karrasch T., Schaeffler A. Adipokines and the role of visceral adipose tissue in inflammatory bowel disease // *Annals of Gastroenterology: Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*. 2016. V.29 (4). P.424–438. doi:10.20524/aog.2016.0077.
110. Kennedy A.J., Ellacott K.L.J., King V.L., Hasty A.H. Mouse models of the metabolic syndrome // *Disease Models & Mechanisms*. 2010. V.3. P.156-166.
111. Kern P.A., Ranganathan S., Li C., Wood L., Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance // *Am J Physiol Endocrin Metab*. 2001. V.280 (5). P.745-51.

112. Kim C.H., Park J., Kim M. Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids, T Cells, and Inflammation // Immune Network. 2014. V.14 (6). P.277-288. doi:10.4110/in.2014.14.6.277.
113. Kim K.-A., Gu W., Lee I.-A., Joh E.-H., Kim D.-H. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway // PLoS ONE. 2012. V.7 (10), e47713. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>.
114. König J., Wells J., Cani P.D., García-Ródenas C.L., MacDonald T., Mercenier A., Brummer R.-J. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease // Clinical and Translational Gastroenterology. 2016. V.7 (10), e196. <http://doi.org/10.1038/ctg.2016.54>.
115. Kyrgiou M., Kalliala I., Markozannes G., Gunter M.J., Paraskeva E., Gaba H., Martin-Hirsch P., Tsilidis K.K. Adiposity and cancer at major anatomical sites: umbrella review of the literature // BMJ. 2017. V.28 (356;j477). doi: 10.1136/bmj.j477.
116. Lassenius M.I., Ahola A.J., Harjutsalo V., Forsblom C., Groop P.-H., Lehto M. Endotoxins are associated with visceral fat mass in type 1 diabetes // Scientific Reports. 2016. V.6 (38887). doi:10.1038/srep38887.
117. Lau S.K., Chu P.G., Weiss L.M. CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples // Am J Clin Pathol. 2004. V.122 (5). P.794-801. doi:10.1309/qhd6-yfn8-1kqx-uuh6.
118. Laughlin M.R. Normal Roles for Dietary Fructose in Carbohydrate Metabolism // Nutrients. 2014. V.6 (8). P.3117-3129. doi:10.3390/nu6083117.
119. Laughlin M.R., Bantle J.P., Havel P.J., Laughlin M.R., Bantle J.P., Havel P.J., Parks E., Klurfeld D.M., Teff K., Maruvada P. Clinical Research Strategies for Fructose Metabolism // Advances in Nutrition. 2014. V.5 (3). P.248–259. <http://doi.org/10.3945/an.113.005249>.

120. Lauterio T.J., Bond J.P., Ulman E.A. Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations // *J Nutr.* 1994. V.124. P.2172–2178.
121. Lecomte V., Kaakoush N.O., Maloney C.A., Raipuria M., Huinao K.D., Mitchell H.M., Morris M.J. Changes in Gut Microbiota in Rats Fed a High Fat Diet Correlate with Obesity-Associated Metabolic Parameters // *PLoS ONE.* 2015. V.10 (5), e0126931. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126931>.
122. Lee M.-J., Pramyothin P., Karastergiou K., Fried S.K. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014. V.1842 (3). P.473–481. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.029.
123. Leopoldo A.S., Lima-Leopoldo A.P., Nascimento A.F., Luvizotto R.A.M., Sugizaki M.M., Campos D.H.S., da Silva D.C.T., Padovani C.R., Cicogna A.C. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2016. V.49 (4), e5028. doi:10.1590/1414-431x20155022016.
124. Levin B.E., Dunn-Meynell A.A., Balkan B., Keesey R.E. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats // *Am J Physiol.* 1997. V.273 (2). P.725–30.
125. Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I. Obesity alters gut microbial ecology // *PNAS.* 2005. V.102 (31). P.11070–11075. doi:10.1073/pnas.0504978102.
126. Li H., Lelliott C., Håkansson P., Ploj K., Tuneld A., Verolin-Johansson M., Benthem L., Carlsson B., Storlien L., Michaëlsson E. Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice // *Metabolism.* 2008. V.57 (12). P.1704–10. doi: 10.1016/j.metabol.2008.07.029.
127. Li J., Lin S., Vanhoutte P.M., Woo C.W., Xu A. Akkermansia Muciniphila Protects Against Atherosclerosis by Preventing Metabolic Endotoxemia-

- Induced Inflammation in Apoe^{-/-} Mice // *Circulation*. 2016. V.14 (133, 24). P.2434-46. doi: 10.1161/circulationaha.115.019645.
128. Liebman T. The Role of Cortisol and Abdominal Obesity in the Epidemic of Type 2 Diabetes // *Undergraduate Research Journal for the Human Sciences*. 2010. T.9. (1).
 129. Lien G.-S. et al., 2014 Epidermal Growth Factor Stimulates Nuclear Factor- κ B Activation and Heme Oxygenase-1 Expression via c-Src, NADPH Oxidase, PI3K, and Akt in Human Colon Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(8), e104891
 130. Lien G.-S., Wu M.-S., Bien M.-Y., Chen C.-H., Lin C.-H., Chen B.-C. Epidermal Growth Factor Stimulates Nuclear Factor- κ B Activation and Heme Oxygenase-1 Expression via c-Src, NADPH Oxidase, PI3K, and Akt in Human Colon Cancer Cells // *PLoS ONE*. 2014. V.9 (8). e104891. doi:10.1371/journal.pone.0104891.
 131. Lin N., Simon M.C. Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation // *J Clin Invest*. 2016. V.126 (10). P.3661-3671.
 132. Long M.D., Crandall W.V., Leibowitz I.H., Duffy L., Rosario F. The Prevalence and Epidemiology of Overweight and Obesity in Children with Inflammatory Bowel Disease // *Inflammatory Bowel Diseases*. 2011. V.17 (10). P.2162–2168. doi:10.1002/ibd.21585.
 133. Lucas S., Verwaerde C., Wolowczuk I. Is the adipose tissue the key road to inflammation? *Immunology and Immunogenetics Insights*. 2009. V.1. P.3–14.
 134. Luck H., Tsai S., Chung J., Clemente-Casares X., Ghazarian M., Revelo X.S., Lei H., Luk C.T., Shi S.Y., Surendra A., Copeland J.K., Ahn J., Prescott D., Rasmussen B.A., Chng M.H., Engleman E.G., Girardin S.E., Lam T.K., Croitoru K., Dunn S., Philpott D.J., Guttman D.S., Woo M., Winer S., Winer D.A. Regulation of obesity-related insulin resistance with gut anti-inflammatory agents // *Cell Metab*. 2015. V.7. (21, 4). P.527-42. doi: 10.1016/j.cmet.2015.03.001.

135. Lumeng C.N. Innate Immune Activation in Obesity // *Molecular Aspects of Medicine*. 2013. V.34 (1). P.12–29. doi:10.1016/j.mam.2012.10.002.
136. Lumeng C.N., Bodzin J.L., Saltiel A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization // *The Journal of clinical investigation*. 2007. V.117. P.175-184.
137. Lumeng C.N., Martinez-Santibañez G., Cho K.W., Lumeng C.N. Imaging white adipose tissue with confocal microscopy // *Methods in Enzymology*. 2014. V.537. P.17–30. doi:10.1016/B978-0-12-411619-1.00002-1.
138. Lustig R.H. Fructose: metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol // *J Am Diet Assoc*. 2010. V.110 (9). P.1307-21. doi: 10.1016/j.jada.2010.06.008.
139. Lutz T.A., Woods S.C. Overview of Animal Models of Obesity // *Current protocols in pharmacology*. 2012. V.5 (61). P.1-22. doi:10.1002/0471141755.ph0561s58.
140. Magrone T., Jirillo E., Spagnoletta A., Magrone M., Russo M.A., Fontana S., De Pergola G. Immune Profile of Obese People and In Vitro Effects of Red Grape Polyphenols on Peripheral Blood Mononuclear Cells // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. V.9210862. <http://doi.org/10.1155/2017/9210862>.
141. Malafaia A.B., Nassif P.A., Ribas C.A., Ariede B.L., Sue K.N., Cruz M.A. Obesity induction with high fat sucrose in rats // *Arq Bras Cir Dig*. 2013. V.26 (Suppl 1). P.17-21.
142. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation // *ImmunoTargets and Therapy*. 2016. V.5. P.47-56. doi:10.2147/ITT.S73223.
143. Manna P., Jain S.K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies // *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2015. V.13 (10). P.423–444. doi:10.1089/met.2015.0095.
144. Marques C., Meireles M., Norberto S., Leite J., Freitas J., Pestana D., Calhau C. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar

- and Sprague-Dawley Rat // *Adipocyte*. 2016. V.5 (1). P.11–21. doi:10.1080/21623945.2015.1061723.
145. Martinez-Useros J., Garcia-Foncillas J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue // *Journal of Translational Medicine*. 2016. V.14 (21). doi: 10.1186/s12967-016-0772-5.
 146. Matsuda A., Makino N., Tozawa T., Shirahata N., Honda T., Ikeda Y., Kawata S. Pancreatic Fat Accumulation, Fibrosis, and Acinar Cell Injury in the Zucker Diabetic Fatty Rat Fed a Chronic High-Fat Diet // *Pancreas*. 2014. V.43 (5). P.735–743. doi:10.1097/mpa.0000000000000129.
 147. McLaughlin T., Ackerman S.E., Shen L., Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity // *J Clin Invest*. 2017. V.127 (1). P.5-13. doi: 10.1172/JCI88876.
 148. McMurray F., Patten D.A., Harper M.-E. Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in Obesity // *Silver Spring*. 2016. V.24 (11). P.2301-2310. doi: 10.1002/oby.21654.
 149. McPhee J.B. Schertzer J.D. Immunometabolism of obesity // *Clinical Science*. 2015. V.129. P.1083–1096. doi: 10.1042/CS20150431.
 150. Mitrou P., Raptis S.A., Dimitriadis G. Insulin action in morbid obesity: a focus on muscle and adipose tissue // *Hormones*. 2013. V.12 (2). P.201-13.
 151. Mohanan S., Tapp H., McWilliams A., Dulin M. Obesity and asthma: Pathophysiology and implications for diagnosis and management in primary care // *Experimental Biology and Medicine*. 2014. V.239 (11). P.1531–1540. doi:10.1177/1535370214525302.
 152. Moreira A.P.B., Alves R.D., Teixeira T.F., Macedo V.S., de Oliveira L.L., Costa N.M., Bressan J., do Carmo Gouveia Peluzio M., Mattes R., de Cassia Gonçalves Alfenas R. Higher plasma lipopolysaccharide concentrations are associated with less favorable phenotype in overweight/obese men // *Eur J Nutr*. 2015. V.54 (8). P.1363-70. doi:10.1007/s00394-014-0817-6.

153. Mowat A.M., Agace W.W. Regional specialization within the intestinal immune system // *Nature Reviews Immunology*. 2014. V.14 (10). P.667-85. doi:10.1038/nri3738.
154. Murano I., Barbatelli G., Parisani V., Latini C., Muzzonigro G., Castellucci M., Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice // *J Lipid Res*. 2008. V.49 (7). P.1562-8. doi:10.1194/jlr.m800019-jlr200.
155. Nakajima K. Low serum amylase and obesity, diabetes and metabolic syndrome: A novel interpretation // *World Journal of Diabetes*. 2016. V.7 (6). P.112–121. doi:10.4239/wjd.v7.i6.112.
156. Ng T.K., Hassan K., Lim J.B., Lye M.S., Ishak R. Nonhypercholesterolemic effects of a palm-oil diet in Malaysian volunteers // *Am J Clin Nutr*. 1991. V.53 (4). P.1015-1020.
157. Nilsson C., Raun K., Yan F., Larsen M.O., Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity // *Acta Pharmacol Sin*. 2012. V.33 (2). P.173–181. doi: 10.1038/aps.2011.203.
158. Odia O.J., Ofori S., Maduka O. Palm oil and the heart: A review // *World J Cardiol*. 2015. V.7 (3). P.144-9. doi: 10.4330/wjc.v7.i3.144.
159. O'Flanagan C.H., Bowers L.W., Hursting S.D. A weighty problem: metabolic perturbations and the obesity-cancer link // *Horm Mol Biol Clin Investig*. 2015. V.23 (2). P.47-57. doi: 10.1515/hmbci-2015-0022.
160. Oishi Y., Manabe I. Integrated regulation of the cellular metabolism and function of immune cells in adipose tissue // *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016. V.43 (3). P.294-303. doi: 10.1111/1440-1681.12539.
161. Oliveira A.G. Acute exercise induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization in diet-induced obese rats // *Obesity (Silver Spring)*. 2013. V.21 (12). P.2545-56. doi: 10.1002/oby.20402.
162. Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Okamoto Y., Maeda K., Kuriyama H., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Funahashi T., Matsuzawa Y. Adiponectin, adipocyte-derived

- plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through cAMP-dependent pathway // *Circulation*. 2000. V.102. P.1296–1301.
163. Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Yannakoulia M., Chryschoou C., Stefanadis C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study // *Atherosclerosis*. 2005. V.183 (2). P.308-315.
 164. Peterson L.W., Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis // *Nat Rev Immunol*. 2014. V.14 (3). P.141-53. doi: 10.1038/nri3608.
 165. Pezzilli R., Calculli L. Pancreatic steatosis: Is it related to either obesity or diabetes mellitus? // *World Journal of Diabetes*. 2014. V.5 (4). P.415–419. doi:10.4239/wjd.v5.i4.415.
 166. Pickett-Blakely O. Obesity and Irritable Bowel Syndrome: A Comprehensive Review // *Gastroenterology & Hepatology*. 2014. V.10 (7). P.411–416.
 167. Qiu Y., Yang Y., Yang H. The unique surface molecules on intestinal intraepithelial lymphocytes: from tethering to recognizing // *Dig Dis Sci*. 2014. V. 59 (3). P.520-9.
 168. Queipo-Ortuño M.I., Seoane L.M., Murri M., Pardo M., Gomez-Zumaquero, J.M., Cardona F., Tinahones F.J. Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels // *PLoS ONE*. 2013. V.8 (5), e65465. doi:10.1371/journal.pone.0065465.
 169. Reichardt F., Baudry C., Gruber L., Mazzuoli G., Moriez R., Scherling C., Schemann M. Properties of myenteric neurones and mucosal functions in the distal colon of diet-induced obese mice // *The Journal of Physiology*. 2013. V.591 (20). P.5125–5139. doi:10.1113/jphysiol.2013.262733.
 170. Rippe J.M., Angelopoulos T.J. Sucrose, High-Fructose Corn Syrup, and Fructose, Their Metabolism and Potential Health Effects: What Do We Really Know? // *Advances in Nutrition*. 2013. V.4 (2). P.236-245. doi:10.3945/an.112.002824.

171. Roda G., Sartini A., Zambon E., Calafiore A., Marocchi M., Caponi A., Roda, E. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases // *World Journal of Gastroenterology*. 2010. V.16 (34). P.4264–4271. doi:10.3748/wjg.v16.i34.4264.
172. Ross M.H., Pawlina W., 2016 *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* (7th Edition) // Wolters Kluwer Health. Print book. P.254-269; 584-625
173. Salehi M., Ferenczi A., Zumoff B. Obesity and cortisol status // *Horm Metab Res*. 2005. V.37 (4). P.193-7.
174. Sampey B.P., Vanhoose A.M., Winfield H.M., Freemerman A.J., Vanhoose A.M., Winfield H.M., Freemerman A.J., Muehlbauer M.J., Fueger P.T., Makowski L. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet // *Obesity* (Silver Spring). 2011. V.19 (6). P.1109–1117. doi: 10.1038/oby.2011.18 .
175. Schipper H.S., Prakken B., Kalkhoven E., Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism // *Trends Endocrinol Metab*. 2012. V.23 (8). P.407-15. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.011.
176. Schneeberger M., Everard A., Gómez-Valadés A.G., Matamoros S., Ramírez S., Delzenne N.M., Claret R.G.M., Cani P.D. Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice // *ScientificReports*. 2015. V.5. Srep.16643. doi:10.1038/srep16643.
177. Semenza G.L. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 // *Physiology* (Bethesda). 2009. V.24. P.97-106. doi: 10.1152/physiol.00045.2008.
178. Sharma A.M., Kushner R.F. A proposed clinical staging system for obesity // *Int J Obes*. 2009. V.33 (3). P.289-95. doi: 10.1038/ijo.2009.2.
179. Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K., Tzameli I., Yin H., Flier J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance // *Journal of*

- Clinical Investigation. 2006. V.116 (11). P.3015-3025. doi:10.1172/JCI28898.
180. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. The Journal of Clinical Investigation. 2012. V.122 (3). P.787-795. doi:10.1172/JCI59643.
 181. Sievenpipera J.L., de Souza R.J., Cozma A.I., Chiavaroli L., Ha V., Mirrahimi A. Fructose vs. glucose and metabolism: do the metabolic differences matter? // Curr Opin Lipidol. 2014. V.25 (1). P.8-19. doi: 10.1097/mol.0000000000000042.
 182. Silva F.A.R., Rodrigues B.L., Ayrisono M. de L.S., Leal R.F. 2016 The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease // Gastroenterology Research and Practice. 2016. V.16. Article ID 2097274. doi:10.1155/2016/2097274.
 183. Singh S., Sharma A.N., Murad M.H., Buttar N.S., El-Serag H.B., Katzka D.A., Iyer P.G. Central Adiposity Is Associated With Increased Risk of Esophageal Inflammation, Metaplasia, and Adenocarcinoma: A Systematic Review and Meta-analysis // Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association. 2013. V.11 (11). P.1399-1412. doi:10.1016/j.cgh.2013.05.009.
 184. Sleder J., Chen Y.D., Cully M., Reaven G. Hyperinsulinemia in fructose-induced hypertriglyceridemia in rat // Metabolism. 1980. V.4. P.303-305.
 185. Smits M.M., van Geenen E.J.M. The clinical significance of pancreatic steatosis // Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 2011. V.8. P.169-177. doi:10.1038/nrgastro.2011.4.
 186. Smolinska S., Groeger D., O'Mahony L. Biology of the microbiome: interactions with the host immune response // Gastroenterol Clin North Am. 2017. V.46 (1). P.19-35. doi: 10.1016/j.gtc.2016.09.004.
 187. Spencer M., Yao-Borengasser A., Unal R., Rasouli N., Gurley C.M., Zhu B. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation // American

- Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism. 2010. V.299 (6). P.1016–1027.
188. Tambo A., Roshan M.H.K., Pace N.P. The Microbial Hypothesis: Contributions of Adenovirus Infection and Metabolic Endotoxaemia to the Pathogenesis of Obesity // International Journal of Chronic Diseases. 2016. V.2016. Article ID 7030795. doi.org/10.1155/2016/7030795.
 189. Tchernof A., Després J.P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update // *Physiol Rev.* 2013. V.93 (1). P.359-404. doi:0.1152/physrev.00033.2011.
 190. Teixeira L.G., Leonel A.J., Aguilar E.C., Batista N.V., Alves A.C., Coimbra C.C., Alvarez Leite J.I. The combination of high-fat diet-induced obesity and chronic ulcerative colitis reciprocally exacerbates adipose tissue and colon inflammation // *Lipids in Health and Disease.* 2011. V.10 (204). doi:10.1186/1476-511X-10-204.
 191. Tilg H., Moschen A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity // *Nature Reviews Immunology.* 2006. V.6. P.772-783. doi :10.1038/nri1937.
 192. Toida S., Takahashi M., Shimizu H., Sato N., Shimomura Y., Kobayashi I. Effect of high sucrose feeding on fat accumulation in the male Wistar rat // *Obes Res.* 1996. V.4 (6). P.561-568.
 193. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest // *Nature.* 2006. V.444 (7122). P.1027-1031.
 194. Vdoviakova K., Petrovova E., Maloveska M., Kresakova L., Teleky, J., Elias M.Z.J., Petrasova D. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat // *Gastroenterology Research and Practice.* 2016. Article ID 2632368. doi:10.1155/2016/2632368.
 195. Walker B.R., Andrew R. Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease // *Ann NY Acad Sci.* 2006. V.1083. P.165-184.

196. Wang Q., Bing C., Al-Barazanji K., Mossakowaska D.E., Wang X.M., McBay D.L., Neville W.A., Trayhurn P., Williams G. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y // *Diabetes*. 1997. V.3. P.335–341.
197. Weerd K., Dik W.A., Schrijver B., Schweitzer D.H., Langerak A.W., Drexhage H.A. , Kiewiet R.M., van Aken M.O., van Huisstede A., van Dongen J.J.M., van der Lelij A.J., Staal F.J.T., van Hagen P.M. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype // *Diabetes*. 2012. V.61. P.401–408.
198. Weisberg S.P., McCann D., Desai M. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue // *J. Clin. Invest*. 2003. V.112. P.1796-1808.
199. Windemuller F., Xu J., Rabinowitz S.S., Hussain M.M., Schwarz S.M. Lipogenesis in Huh7 cells is promoted by increasing the fructose: Glucose molar ratio // *World Journal of Hepatology*. 2016. V.8 (20). P.838-843. doi:10.4254/wjh.v8.i20.838.
200. Winer D.A., Luck H., Tsai S., Winer S. The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance // *Cell Metabolism*. 2016. V.23 (3). P.413 – 426. doi: 10.1016/j.cmet.2016.01.003.
201. Winer D.A., Winer S., Dranse H.J., Lam T.K. Immunologic impact of the intestine in metabolic disease // *J Clin Invest*. 2017. V.127 (1). P.33-42. doi: 10.1172/jci88879.
202. World Health Organisation "Waist Circumference and Waist-Hip Ratio, Report of a WHO Expert Consultation" (PDF). [Электронный ресурс] / http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_report_waistcircumference_and_waisthip_ratio/en/. Дата обращения: 03.04.2017.
203. Wu J., Boström P., Sparks L.M., Ye L., Choi J.H., Giang A.H. Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human // *Cell*. 2012. V.150 (2). P.366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.01.

204. Wu J., Cohen P., Spiegelman B.M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? // *Genes & Development*. 2013. V.27 (3). P.234-250. doi:10.1101/gad.211649.112.
205. Yang J.-Y., Kweon M.-N. The gut microbiota: a key regulator of metabolic diseases // *BMB Reports*. 2016. V.49 (10). P.536–541. doi:10.5483/BMBRep.2016.49.10.144.
206. Ye J. Adipose Tissue Vascularization: its role in chronic inflammation // *Curr Diab Rep*. 2011. V.11 (3). P.203-210. doi: 10.1007/s11892-011-0183-1.
207. Yook J.S., Kim K.A., Kim M., Cha Y.S. Black Adzuki Bean (*Vigna angularis*) Attenuates High-Fat Diet-Induced Colon Inflammation in Mice // *J Med Food*. 2017. V.20 (4). P.367-375. doi: 10.1089/jmf.2016.3821.
208. Yoshimura S., Ohnishi C., Orito Kawahara Y., Takasaki H., Takeda H., Sakamoto N., Hashino S. Association of peripheral total and differential leukocyte counts with obesityrelated complications in young adults // *Obesity Facts*. 2015. V.8 (1). P.1–16. doi: 10.1159/000373881.