

На правах рукописи

Чернышева Мария Борисовна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Макарова Ольга Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник
клинического отдела ФБУН «Московский
НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора,
Щербаков Иван Тимофеевич

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
отдела патоморфологии, клеточной биологии и
биохимии ФГБНУ «Центральный научно-
исследовательский институт туберкулеза»,
Ерохина Мария Владиславовна

Ведущая организация: Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации (394036, г. Воронеж, ул. Студенческая, д.10)

Защита диссертации состоится _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте <http://www.morfolhum.ru//>

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ожирение широко распространено среди населения всего мира и 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 внутренних 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, 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 [Cani 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.

Цель исследования. Изучить морфологические изменения эпителиального барьера и локального компартмента 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-Доули, 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.

Объект и предмет исследования – слизистая оболочка ободочной кишки и ее изменения при экспериментальном алиментарном ожирении.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов в области строения и функции структурных компонентов эпителиального барьера ободочной кишки и патогенеза алиментарного ожирения.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций, соответствующие научной тематике.

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

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*.

Теоретическая и практическая значимость работы. 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.

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.

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.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, 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» (Пушино, 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).

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

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликованы 7 работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук и 4 публикации представлены в материалах конференций.

Внедрение результатов работы. Материалы диссертационного исследования используются в лекционном курсе на кафедре клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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”). 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. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира.

Массометрические методы. Определяли массу и длину тела у крыс контрольной и опытной групп на разных сроках 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 у животных определяли массу жировой ткани, окружающей придаток правого и левого семенника, сердца и печени.

Гистологические методы. 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”, Япония). Обезвоженные образцы заключали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (“Sakura”, Япония). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме модели Microm HM340E (“Thermo Scientific”, США) и окрашивали их гематоксилином и эозином.

Гистохимические методы. Для выявления в бокаловидных клетках высокосульфатированных и нейтральных муцинов проводили окраску соответственно альциановым синим рН 1.0 по Моури (Гистолайн, ООО “Элемент”, Россия) и ШИК-реакцию (“БиоВитрум”, Россия). Окрашивание препаратов опытной и контрольной группы осуществляли одновременно. Для выявления нейтральных жиров кусочки печени 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 (Polisciencs, США), окрашенные препараты исследовали в поляризованном свете.

Иммуногистохимические методы. Энтероэндокринные клетки выявляли с помощью антител к хромогранину А (Rabbit polyclonal to Chromogranin A, “Abcam”, Великобритания). 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). Для визуализации реакции применяли набор Dako (DAB) EnVision-HRP (“Agilent Technologies”, США). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

Морфометрические методы. При морфометрическом исследовании подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) ободочной кишки на стандартной площади среза (1000 мкм^2). Проводили дифференцированный подсчет клеточных элементов (на 1000 клеток) в СПСО с определением относительного количества нейтрофилов, лимфоцитов, плазмочитов, 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 мкм^2). Проводили оценку содержания CD68-положительных макрофагов в СПСО. Определяли абсолютное количество бокаловидных клеток на крипту. Для определения их объёмной доли измеряли площадь СПСО, занимаемую 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 оценивали в поляризованном свете распределение и относительную площадь коллагеновых волокон, окрашенных пикросириусом красным.

На гистологических срезах жировой ткани, окружающей придаток семенника, определяли абсолютные показатели площади срезов адипоцитов. Для морфометрического исследования получали снимки гистологических препаратов на микроскопе 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/).

Культуральные методы. Для изучения цитокинового профиля суспензию клеток селезенки в количестве 1×10^6 /мл культивировали в ростовой среде 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 . Для определения относительного содержания макрофагов в жировой ткани, окружающей придаток семенника, использовали методику, описанную В. Weigmann et al. (2007). Полученную клеточную суспензию фиксировали по протоколу S. Chow et al. (2005) и хранили в течение 1 месяца при -70°C .

Биохимическое исследование. Кровь получали из шейной вены у животных, наркотизированных диэтиловым эфиром. Сыворотку крови хранили при температуре -70°C в течение 1 мес. В ней определяли уровень аспаратаминотрансферазы (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).

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 (тест-системы фирмы “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 (“Nucult Biotech”, Нидерланды).

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). 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).

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*). 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). Праймеры были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия). О содержании матрицы судили по величине порогового цикла в реакции qPCR.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика модели алиментарного ожирения по массометрическим, биохимическим, иммунологическим параметрам и морфологическим проявлениям

После отбора животных, устойчивых и неустойчивых к высококалорийному рациону, в итоговых экспериментальных группах масса тела у крыс с ожирением была выше, чем в контрольной группе на 18% (рис. 1А). Медиана значений ИМТ у животных контрольной группы была меньше, чем при ожирении на 24%. (рис. 1Б). По сравнению с контрольной группой у животных с ожирением увеличилась масса жировой ткани, окружающей придаток семенника, в 2,2 раза. Масса печени и сердца возросла на 35,4% и 20% соответственно.

При морфологическом исследовании у крыс с ожирением выявлена верифицированная при окраске суданом III жировая дистрофия печени от минимально до максимально выраженной, а в поджелудочной железе - слабо и умеренно выраженный липоматоз. В сердце у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой при микроскопическом исследовании каких-либо различий не обнаружено. По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением показатель площади среза адипоцита был увеличен в 2 раза (рис. 1В). В жировой ткани выявлены скопления макрофагов и лимфоцитов вокруг адипоцитов – короноподобные структуры. Показатель относительного количества CD68-положительных макрофагов среди клеток, выделенных из

жировой ткани у крыс с ожирением, был выше, чем в контрольной группе, в 1,9 раз (рис. 1Г). Таким образом, выявленные у крыс с ожирением короноподобные структуры в жировой ткани и увеличение CD68-положительных макрофагов, отражают развитие воспалительного процесса в жировой ткани.

При биохимическом исследовании сыворотки крови концентрация глюкозы у крыс с ожирением варьировала (рис. 2А), и различий этого показателя не выявлено ($p = 0,27$). Однако концентрации инсулина у крыс опытной группы достоверно увеличивалась по сравнению с контролем (рис. 2Б), что отражает нарушения регуляции метаболизма углеводов. У крыс с ожирением изменился липидный профиль сыворотки крови: выявлено достоверное повышение концентрации триглицеридов (рис. 2В), характерное для высокого потребления жиров. Однако содержание холестерина снижалось (рис. 2Г), что может быть связано с особенностями рациона, а именно использованием пальмового масла, которое содержит насыщенные жирные кислоты, но не холестерин. Данные литературы о влиянии потребления пальмового масла на содержание холестерина в сыворотке крови противоречивы. Однако, результаты, подобные нашим, были получены рядом авторов [Ng T.K. et al., 1991; Odia O. et al., 2015]. По содержанию в сыворотке крови α -амилазы, ЛПВП, ЛПНП, факторов роста - IGF-1 и EGF, АСТ и коэффициенту Ритиса не выявлено различий между сравниваемыми группами. Показатель активности АЛТ у крыс с ожирением снижался и составил 36,8 (29,8; 40,2) ед/л у крыс опытной группы и 50,6 (47,4; 53,0) у контрольной ($p < 0,05$).

У крыс с ожирением в сыворотке крови выявлено также снижение концентрации половых стероидных гормонов – тестостерона (общего и свободного) и эстрадиола (табл.), что согласуется с данными о том, что при ожирении у мужчин уменьшается уровень тестостерона и концентрация глобулина, связывающего половые гормоны, в периферической крови [Калинченко С.Ю. и соавт., 2015; Fui M.N.T. et al., 2014]. По данным S. Dhindsa et al. (2011) ожирение у мужчин может сопровождаться одновременным снижением содержания как тестостерона, так и эстрадиола, что совпадает с полученными нами результатами.

При ожирении у крыс выявлено повышение содержания кортикостерона в сыворотке крови (рис. 3А), что соответствует результатам, полученным при исследовании людей и лабораторных животных с ожирением [Bjorntorp P., Rosmond R., 2000; Salehi M. et al., 2005]. Однако до конца не ясно, почему ожирение может вызывать повышение содержания глюкокортикоидов 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].

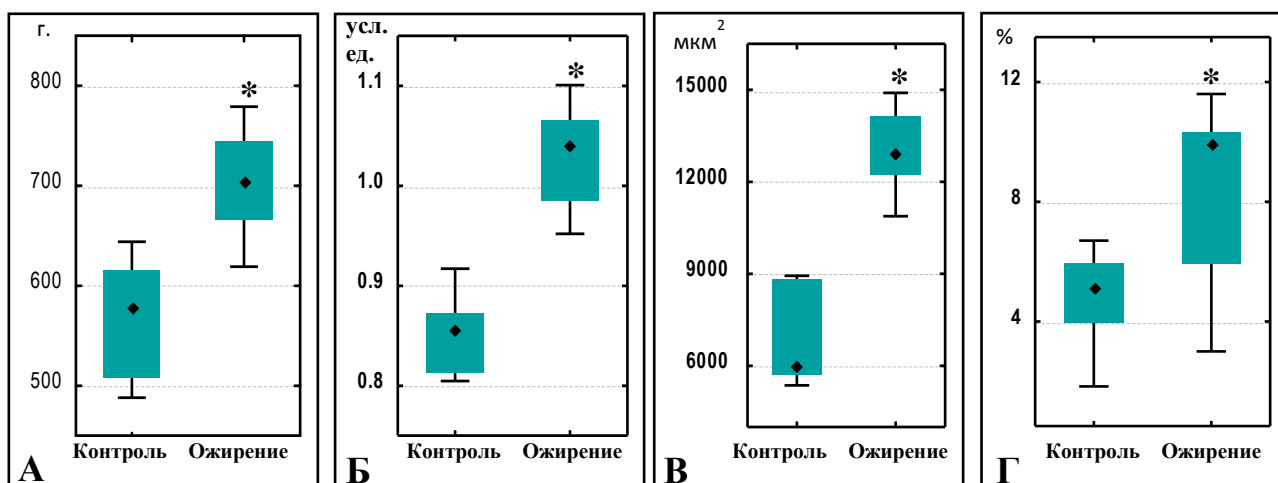


Рисунок 1. А - масса тела; Б – ИМТ; В - показатели площади срезов адипоцитов в жировой ткани, окружающей придаток семенника, у крыс контрольной группы и с ожирением; Г - показатель относительного количества CD68-положительных клеток среди клеток, выделенных из жировой ткани у крыс контрольной группы и с ожирением Me (25L; 75U). * – $p < 0,05$

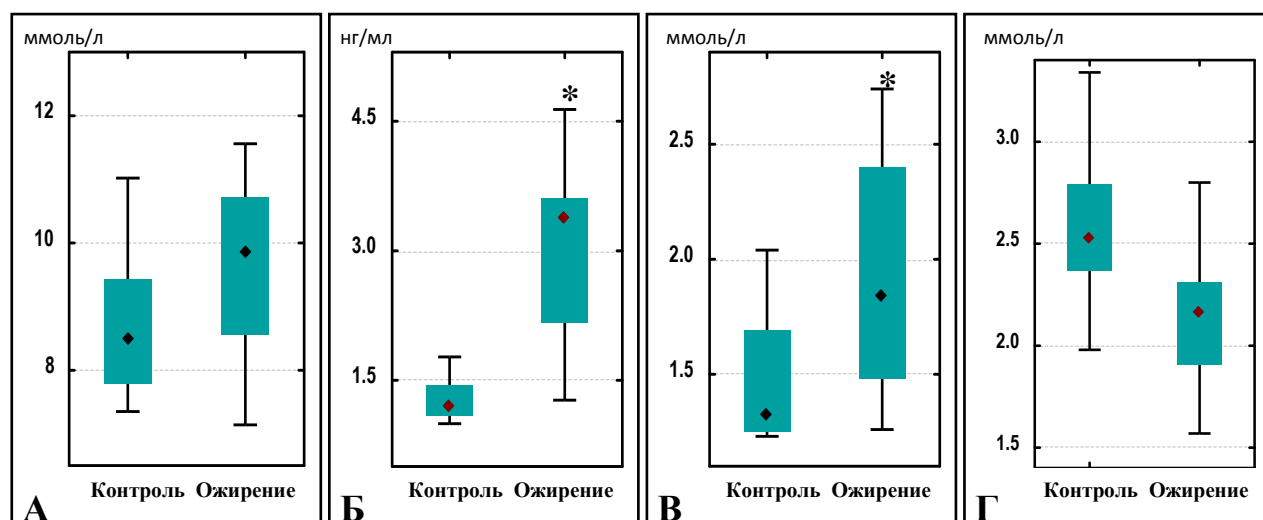


Рисунок 2. Биохимические показатели у крыс контрольной группы и с ожирением. А - глюкоза; Б - инсулин; В – триглицериды; Г – холестерин; Me (25L; 75U). * – $p < 0,05$

Таблица.

Содержание стероидных половых гормонов в сыворотке крови у крыс контрольной группы и с ожирением, Me (25L; 75U)

Параметры	Группа наблюдения		Порог доверительной вероятности (p)
	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, пг/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

В нашем исследовании обнаружено, что у крыс Спрейг-Доули с ожирением повышается содержание эндотоксина в сыворотке крови на 18% (рис. 3Б), что согласуется с данными о том, что высококалорийное питание, богатое жирами и углеводами, вызывает изменения состава микробиоты и повышение уровня бактериального липополисахарида (ЛПС) в сыворотке крови [Lumeng C.N., 2013; Everard A., Cani P.D., 2013]. ЛПС связывается с TLR-4, что приводит к активации NF-κB, индуцирующего экспрессию фактора хемотаксиса моноцитов MCP-1, который обеспечивает миграцию макрофагов в очаг воспаления [Deshmane S.L., 2009; Mancuso P., 2016]. Повышение уровня эндотоксина отражает нарушения проницаемости эпителиального барьера толстой кишки и обуславливает активацию воспаления в жировой ткани. В связи с этим представляло интерес оценить системные иммунологические изменения при экспериментальном алиментарном ожирении.

Методом проточной цитофлуориметрии выявлено повышение абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3+ клетки), показатели их количества в контрольной и опытной группе составили 4,76 (4,68; 5,44) и 6,16 (5,45; 6,53) млн/мл ($p < 0,05$), соответственно. Увеличилось также абсолютное содержание В-лимфоцитов (CD45R+CD3- клетки), которое составило в контрольной группе - 3,19 (2,23; 3,57), а в опытной - 3,83 (3,53; 4,04) млн/мл ($p < 0,05$). Очевидно, повышение абсолютного количества Т- и В-лимфоцитов отражает активацию процессов их дифференцировки и миграции. Между сравниваемыми группами не выявлено различий по абсолютному и относительному количеству Т-хелперов (CD3+CD4+CD8- клетки), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3+CD8+CD4- клетки), активированных Т-хелперов (CD4+CD25+Foxp3-) и регуляторных Т-лимфоцитов (CD4+CD25+Foxp3+).

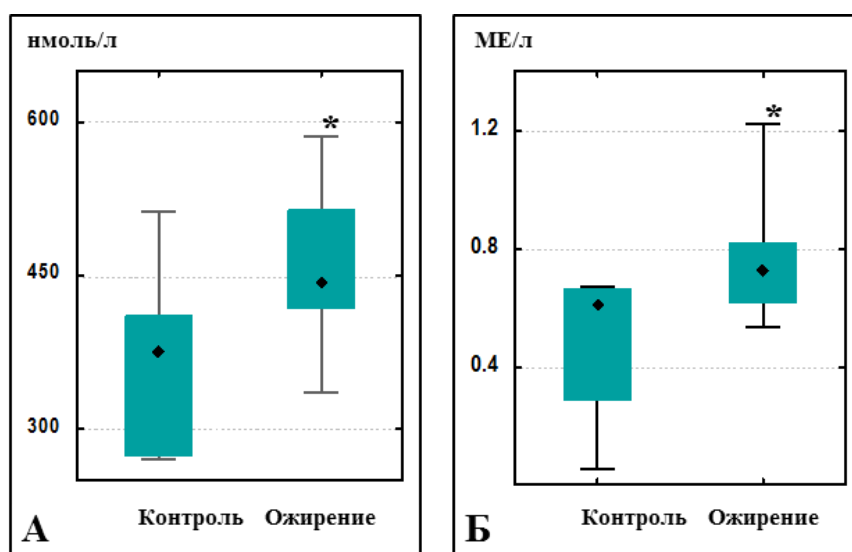


Рисунок 3. Содержание кортикостерона (А) и уровень эндотоксина (Б) в сыворотке крови у крыс контрольной и опытной групп. Ме (25L; 75U). * – $p < 0,05$

В нашей работе выявлено отсутствие различий между опытной и контрольной группами по содержанию ИЛ-2 ИЛ-4, ИНФ- γ и ФНО- α в культуральной жидкости клеток селезенки, не стимулированных и стимулированных конканавалином-А. Таким образом, активных проявлений воспаления на системном уровне на данных сроках развития ожирения не обнаружено, что, очевидно, связано с противовоспалительным действием кортикостерона, содержание которого у крыс с ожирением повышалось по сравнению с контрольной группой.

Морфофункциональные изменения слизистой оболочки и локального компартмента иммунной системы ободочной кишки при экспериментальном алиментарном ожирении

При морфологическом исследовании дистального отдела ободочной кишки у крыс обеих группы эпителиальная выстилка не нарушена и представлена каемчатым цилиндрическим эпителием (рис. 4). Крипты глубокие с узкими просветами. Размеры бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке крипт на качественном уровне у крыс с ожирением меньше по сравнению с контролем (рис. 4). Между криптами в строме СПСО и ее базальном отделе - рыхлая волокнистая соединительная ткань с диффузно рассеянными клеточными элементами. Обращает на себя внимание увеличение числа клеточных элементов в СПСО, но они распределены равномерно и не образуют скоплений в базальном отделе, как при хроническом колите (рис. 4). Выявленные изменения отражают активацию локального компартмента иммунной системы ободочной кишки и являются реактивными, а не воспалительными, так как классические проявления воспалительной реакции - альтерация и экссудация - отсутствуют.

По данным морфометрического исследования у крыс с ожирением по сравнению с контрольной группой выявлено увеличение количества клеточных элементов в СПСО, которое составило 29% - между криптами и 34% - в базальном отделе (рис. 5 А, Б). Среди клеточных элементов увеличилось на 65% относительное количество лимфоцитов (рис. 6А). Содержание нейтрофилов возросло на 37% (рис. 6Б), что, очевидно, отражает усиление процессов их миграции в просвет кишки. Относительное количество хромогранин-позитивных энтероэндокринных клеток в эпителии слизистой оболочки в сравниваемых группах не различалось. В СПСО ободочной кишки при ожирении показатель относительного количества CD68-положительных макрофагов у крыс с ожирением повысился в 2 раза по сравнению с контрольной группой, что соответствует выявленным изменениям в жировой ткани (рис. 6В).

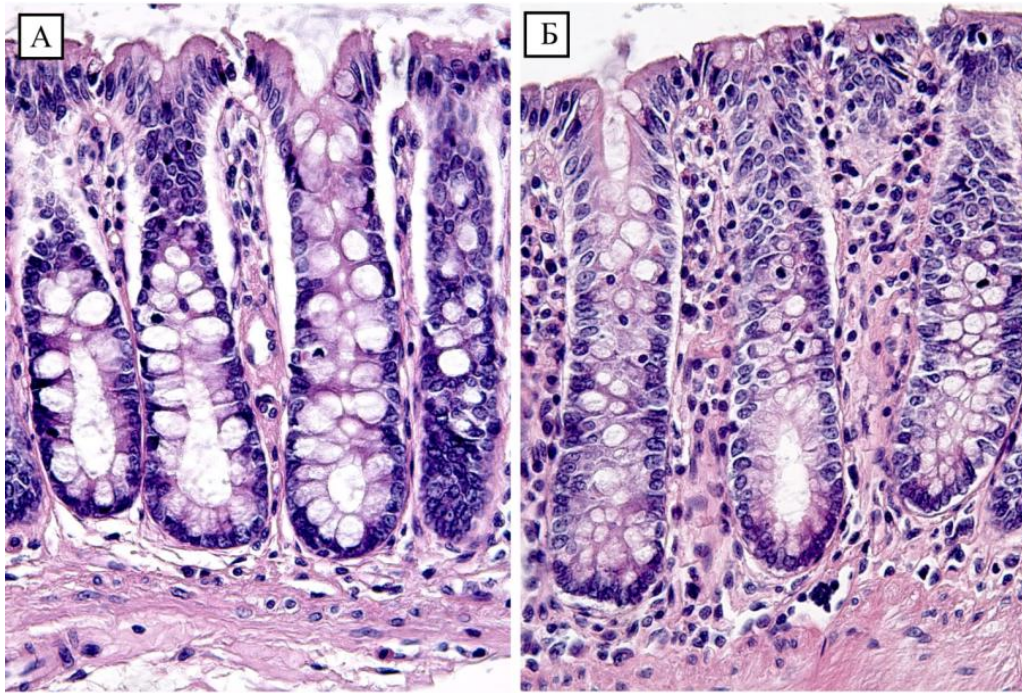


Рисунок 4. Толстая кишка крыс контрольной группы (А) и с ожирением (Б). При ожирении в СПСО увеличено количество клеточных элементов, а бокаловидные клетки менее крупные (Б), чем в контрольной группе (А). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Кроме того, известно, что содержание вида *Akkermansia muciniphila* уменьшается при ожирении как у людей, так и у мышей с дефектом гена лептина [McPhee J.B., Schertzer J.D., 2015]. Однако в литературе отсутствуют данные о количестве этих бактерий у крыс при ожирении. Мы установили, что в просветной микрофлоре ободочной кишки у крыс содержание вида *A. muciniphila* снижается (рис. 7). Следует отметить, что количество бактерий вида *A. muciniphila* положительно коррелирует с содержанием муцинов на поверхности слизистой оболочки ободочной кишки. Это косвенно отражает истончение слоя муцинов и взаимосвязано с повышенной проницаемостью эпителия кишечника, в частности, для эндотоксина, который активирует, в первую очередь, воспалительные реакции в слизистой оболочке ободочной кишки [Aleman J.O. et al., 2014].

По сравнению с контрольной группой у крыс с ожирением выявлено значительное уменьшение объемной плотности ШИК-положительного содержимого бокаловидных клеток (рис 8, 9А). Однако количество бокаловидных клеток на крипту между группами не различалось. Кроме того, в бокаловидных клетках снижались показатели интенсивности окрашивания муцинов. У крыс с ожирением значительно снизилась интенсивность окрашивания как нейтральных ШИК-положительных гликопротеинов, так и высокосульфатированных, выявляемых при окрашивании альциановым синим (рис 9 Б, В).

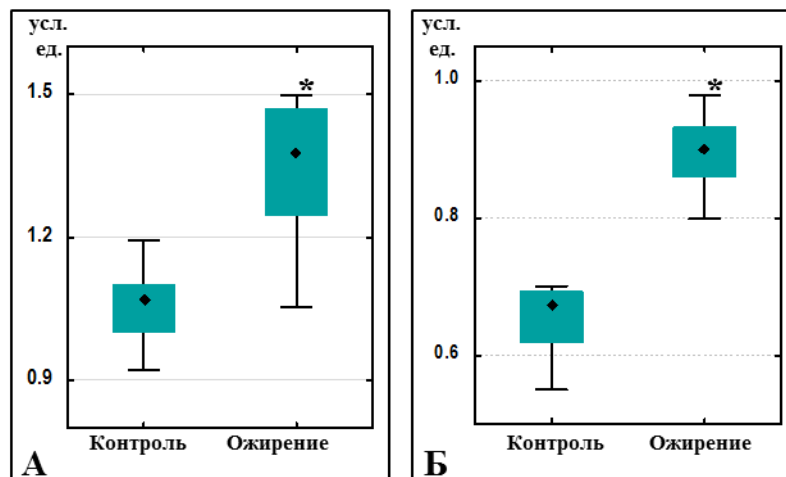


Рисунок 5. Относительный показатель количества клеточных элементов на стандартной площади в СПСО ободочной кишки между криптами (А) и в базальном отделе (Б) у крыс контрольной и опытной групп. Ме (25L; 75U). * – $p < 0,05$

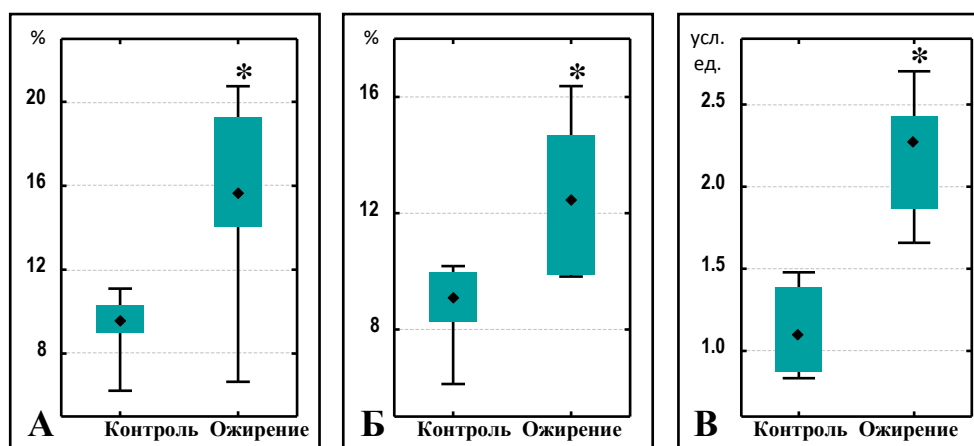


Рисунок 6. Относительное количество лимфоцитов (А), нейтрофилов (Б) и макрофагов (В) среди клеточных элементов в СПСО ободочной кишки у крыс контрольной и опытной групп. Ме (25L; 75U). * – $p < 0,05$

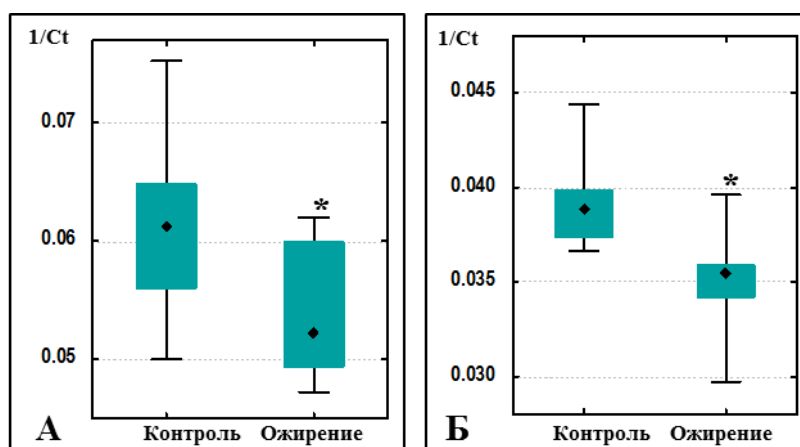


Рисунок 7. Содержание *Bacteroidetes* (А) в составе просветной микрофлоры и *Akkermansia muciniphila* (Б) в составе пристеночной микрофлоры ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением. Ме (25L; 75U). * – $p < 0,05$

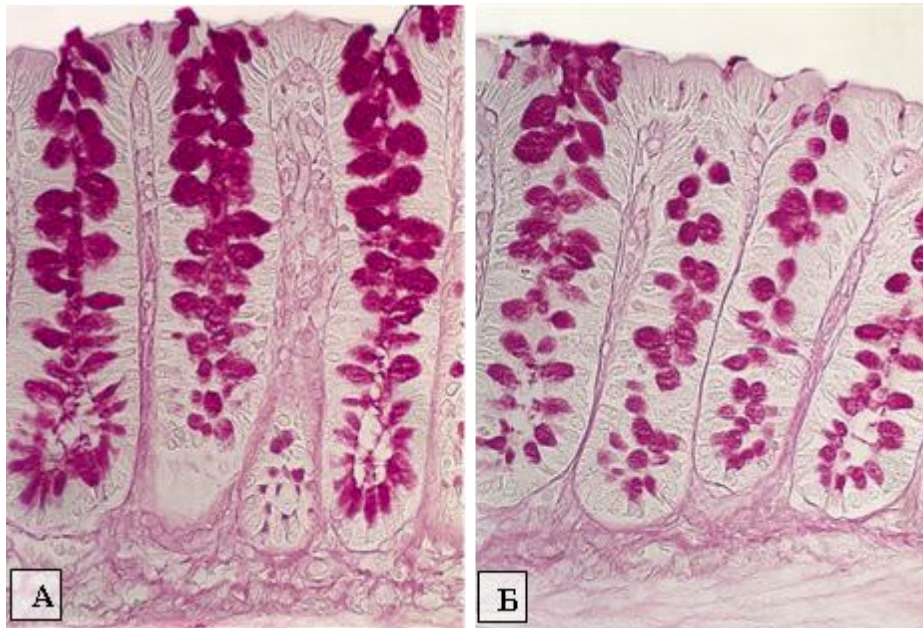


Рисунок 8. Гистохимическая характеристика бокаловидных клеток дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы (А) и с ожирением (Б). ШИК-реакция. Ув. 400.

L.G. Teixeira et al. (2011) и F. Reichardt et al. (2013) в непродолжительных экспериментах длительностью 8-12 недель не обнаружили в слизистой оболочке толстой кишки различий показателей количества бокаловидных клеток у мышей контрольной группы и с ожирением [Teixeira L.G. et al., 2011]. 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 высокосульфатированных гликопротеинов, что сочетается со снижением содержания в просветной микрофлоре вида *Akkermansia muciniphila*, разрушающего муцины. По данным окрашивания пикросириусом красным с оценкой в поляризованном свете в СПСО выявлены изменения фибриллярного компонента, а именно увеличение относительной площади незрелых волокон между криптами и зрелых в базальном отделе. Относительная объемная доля незрелых коллагеновых волокон желто-зеленого цвета между криптами увеличилась в 1,3 раза (рис. 10А), а объемная доля зрелых оранжево-красных волокон в базальных отделах - в 1.6 раза (рис. 10Б). Изменение показателей относительной доли зрелых и незрелых коллагеновых волокон в СПСО отражает усиление процессов образования и разрушения коллагена, что может быть обусловлено провоспалительной активацией макрофагов и других клеток локальной иммунной системы кишки, продуцирующих ферменты, разрушающие коллагеновые волокна.

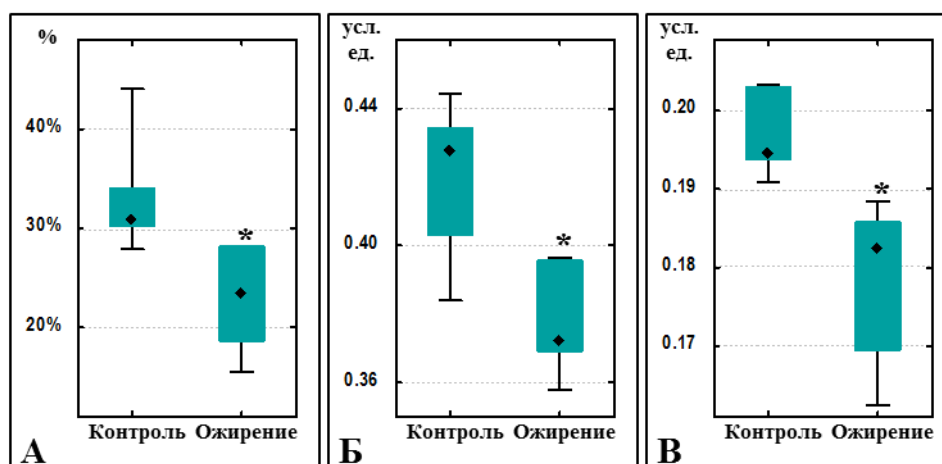


Рисунок 9. Морфометрическая характеристика бокаловидных клеток дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной и опытной групп. А - объёмная доля бокаловидных клеток (ШИК-реакция); Б и В - интенсивность окрашивания секрета бокаловидных у крыс контрольной группы и с ожирением. Б – нейтральные муцины (ШИК-реакция); В – высокосульфатированные муцины (окраска альциановым синим). Ме (25L; 75U). * – $p < 0,05$

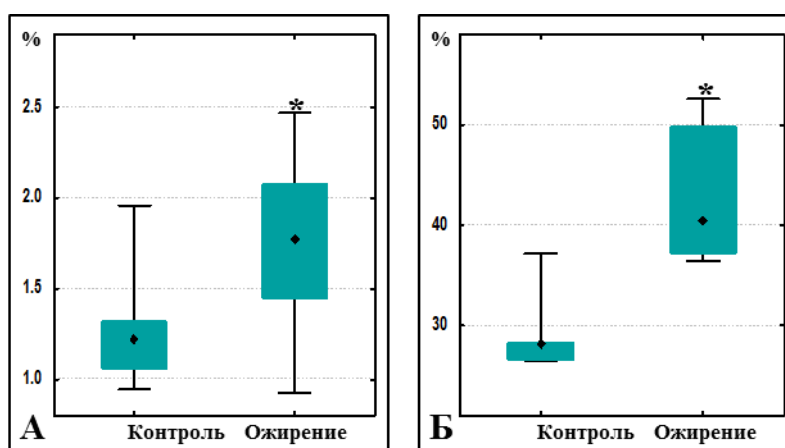


Рисунок 10. Морфометрическая характеристика окрашенных пикросирусом красным волокон дистального отдела ободочной кишки у крыс контрольной группы и с ожирением. А - относительная объёмная доля коллагеновых волокон желто-зеленого цвета в СПСО между криптами; Б - относительная объёмная доля коллагеновых волокон оранжево-красных волокон в базальных отделах СПСО. Ме (25L; 75U). * – $p \leq 0,05$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным литературы алгоритм воспроизведения моделей ожирения у лабораторных животных, длительно находившихся на адипогенном рационе, не разработан и существующие модели недостаточно охарактеризованы. В нашей 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 увеличались 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, уменьшение концентрации стероидных половых гормонов - эстрадиола, общего и свободного тестостерона, а также повышение содержания кортикостерона.

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 CD68-положительными макрофагами и лимфоцитами.

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 - *Fermicutes* 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.

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 раза 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Чернышева М.Б., Макарова М.А., Цветков И.С. Морфологические изменения внутренних органов у крыс при длительном избыточном потреблении углеводов и жиров // Морфологические ведомости. 2014. - №3. - С.74-78
2. Чернышева М.Б., Цветков И.С., Диатроптов М.Е., Макарова О.В. Морфологические изменения внутренних органов и метаболические нарушения при экспериментальном алиментарном ожирении // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. - Т. 17 . -№1. - С.44-51.
3. Чернышева М.Б., Цветков И.С., Козловская Г.В., Макарова О.В. Морфологические изменения ободочной кишки у крыс Спрейг-Доули при ожирении // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. - Т. 19.- №3. С.54-62.
4. Чернышева М.Б., Цветков И.С., Пономаренко Е.А., Михайлова Л.П. Морфологические изменения, биохимические и иммунологические нарушения при экспериментальном ожирении // Журнал анатомии и гистопатологии. 2015. - Т. - 4. - №3. - С. 133. Всероссийская научная конференция с международным участием «Экологические аспекты морфогенеза» г. Воронеж. 12-14 ноября 2015 г.
5. Чернышева М.Б., Цветков И.С., Мхитаров В.А. Морфология внутренних органов и жировой ткани у крыс при длительном избыточном потреблении углеводов и жиров // Сборник тезисов. 2015. С. 382. 19 международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века». Пушино. 20-24 апреля 2015 г.
6. Чернышева М.Б., Цветков И.С., Козловская Г.В., Козловский Ю.Е. Морфологические изменения слизистой оболочки толстой кишки и состава ее просветной микрофлоры при экспериментальном алиментарном ожирении // Сборник научных трудов. 2016. С. 200-201. Научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. 6-7 апреля 2016 г.
7. Козловская Г.В., Чернышева М.Б., Цветков И.С., Козловский Ю.Е. Качественные и количественные изменения состава микробиома у крыс с ожирением // Сборник материалов 2016. С. 112. XV Всероссийское совещание с международным участием и восьмая Школа по эволюционной физиологии, Санкт-Петербург. 17-22 октября 2016 г.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЛТ — аланинаминотрансфераза
АСТ — аспаратаминотрансфераза
ВОЗ — Всемирная Организация Здравоохранения
ИЛ — интерлейкин (Interleukin, IL)
ИМТ — индекс массы тела
ИНФ- γ — интерферон- γ
ИФА — иммуноферментный анализ
ЛПВП — липопротеины высокой плотности
ЛПНП — липопротеины низкой плотности
ЛПС — липополисахарид
ПЦР — полимеразная цепная реакция
СПСО — собственная пластинка слизистой оболочки
ФНО- α — фактор некроза опухолей α (Tumor Necrosis Factor, TNF α)
EGF — эпидермальный фактор роста (Epidermal Growth Factor)
HIF — гипоксией-индуцируемый фактор (Hypoxia-Inducible Factor)
IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста, ИФР (Insulin-Like Growth Factor 1)
NF- κ B — ядерный фактор «каппа-би» (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
TLR — толл-подобные рецепторы (Toll-Like Receptors)

Соискатель

Чернышева М.Б.