

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

На правах рукописи

Золотова Наталья Александровна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ ПРИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ КОЛИТЕ**

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

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1. Сравнительная анатомическая и гистологическая характеристика толстой кишки у человека и мыши.....	11
2.2. Язвенный колит.....	16
2.3. Роль реакций врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе язвенного колита.....	25
2.4. Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите.....	28
2.5. Экспериментальные модели язвенного колита.....	51
2.6. Заключение к обзору литературы.....	64
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	65
3.1. Животные и дизайн эксперимента.....	65
3.2. Методы исследования.....	67
4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	76
4.1. Клинические проявления экспериментального острого и хронического колита.....	76
4.2. Морфологическая характеристика стенки ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите.....	81
4.3. Морфометрическое исследование распространенности язвенного и воспалительного процессов в разных отделах ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите.....	90
4.4. Морфометрическое исследование состава воспалительного инфильтрата в дистальном отделе ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите.....	94

4.5. Изменения продукции цитокинов в стенке медиального отдела ободочной при экспериментальном остром и хроническом колите	98
4.6. Изменения эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите.....	104
4.6.1. Ультраструктурное исследование поверхности эпителиальной выстилки ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите	104
4.6.2. Изменение числа энтероэндокринных клеток в разных отделах ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите	114
4.6.3. Морфологическое и морфометрическое исследование бокаловидных клеток в разных отделах ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите.....	118
4.6.4. Исследование экспрессии мРНК секреторного муцина <i>Muc2</i> и трансмембранных муцинов <i>Muc1</i> , <i>Muc3</i> и <i>Muc13</i> в медиальном отделе ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите	132
4.6.5. Изменение экспрессии мРНК белков плотных контактов клаудинов CLDN2 и CLDN4 в медиальном отделе ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите	135
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	138
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	189
7. ВЫВОДЫ.....	192
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	194
9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	198

1. ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в толстой кишке по сравнению с другими органами содержится максимальное количество микроорганизмов и пищевых антигенов (Kim Y.S., Ho S.B., 2010). В физиологических условиях эпителиальный барьер толстой кишки препятствует проникновению бактерий и токсических веществ во внутреннюю среду организма и предотвращает развитие воспалительного процесса. Эпителиальный барьер состоит из слоя слизи, гликокаликса и собственно эпителиальной выстилки, он создает механический барьер для бактерий и крупных молекул, участвует в регуляции иммунных реакций и состава комменсальной микрофлоры (Могильная Г.М., Могильная В.Л., 2007; Roda G. et al., 2010; Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014). Нарушение структуры и функции эпителиального барьера может приводить к развитию ряда заболеваний толстой кишки, в частности язвенного колита (ЯК) (Peterson L.W., Artis D., 2014).

Язвенный колит – распространенное хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание толстой кишки (Ватутин Н.Т. и соавт., 2015; Ивашкин В.Т. и соавт. 2017). Течение этого заболевания сопровождается развитием множества осложнений, при длительном течении ЯК у 10% больных развивается колоректальный рак (Сергиенко Е.И., 2012; Ватутин Н.Т. и соавт., 2015). Этиология ЯК неясна, в связи с чем существующие методы лечения и диагностики недостаточно эффективны (Тертычный А.С. и соавт., 2014; Щукина О.Б. и соавт., 2014; Ивашкин В.Т. и соавт. 2017). Несомненно, важную роль в развитии ЯК играет нарушение барьерной функции толстой кишки, что приводит к транслокации кишечной микрофлоры во внутреннюю среду организма и развитию воспалительного процесса (Ткачев А.В. и соавт., 2012; Antoni L. et al., 2014).

При ЯК наблюдаются множественные нарушения разных звеньев эпителиального барьера толстой кишки, касающиеся продукции и барьерных свойств слизи, строения гликокаликса, клеточного состава эпителиальной выстилки, строения плотных контактов, взаимодействия с микрофлорой и

иммунной системой (Roda G. et al., 2010; Antoni L. et al., 2014). Однако исследования на клиническом материале затруднены из-за отсутствия возможности установить инициальные стадии заболевания и сформировать группы, репрезентативные по полу, возрасту, длительности течения ЯК и схеме лечения. Поэтому для исследования этиологии и патогенеза ЯК разработан ряд экспериментальных моделей. Наиболее легко выполнимой и высоко воспроизводимой моделью, адекватной ЯК человека, является колит, индуцированный декстрансульфатом натрия (ДСН) (Randhawa P.K. et al., 2014; Gadaleta R.M., Garcia-Irigoyen O., Moschetta A., 2017). Эта модель широко используется для изучения механизмов развития ЯК и доклинической оценки эффективности лекарственных средств (Perše M., Cerar A., 2012).

В ряде работ на модели ДСН-индуцированного колита проводилось изучение нарушений эпителиального барьера ободочной кишки (Hall L.J. et al., 2011; Ahmad R. et al., 2014; Yan B. et al., 2015; Coutinho de Sousa B. et al., 2017), однако полученные результаты во многом противоречивы и фрагментарны. Кроме того, данные разных авторов сложно сопоставлять, так как в работах варьируют концентрация ДСН, сроки его воздействия и выведения животных из эксперимента, не всегда учитывается пол. В литературе отсутствуют сведения об ультраструктурных изменениях эпителиального барьера, изменениях гистохимических свойств слизи, различиях патологического процесса между отделами ободочной кишки, противоречивы и фрагментарны данные об изменении состава гликокаликса при остром колите. При хроническом колите, кроме того, не изучены изменения проницаемости слизи для бактерий, клеточного состава эпителиальной выстилки и межклеточных контактов.

Таким образом, изучение нарушений эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите является актуальным.

Цель исследования. Изучить структурные, цитофизиологические и молекулярно-биологические изменения эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать клинические проявления и морфологические изменения ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите.
2. Определить распространенность язвенного и воспалительного процессов, изменения состава инфильтрата слизистой оболочки ободочной кишки и продукции цитокинов в ней при экспериментальном остром и хроническом колите.
3. Исследовать ультраструктурные изменения эпителиального барьера при экспериментальном остром и хроническом колите.
4. Оценить изменение количества хромогранин А-позитивных энтероэндокринных клеток при экспериментальном остром и хроническом колите.
5. Изучить цитофизиологические изменения бокаловидных клеток при экспериментальном остром и хроническом колите.
6. Оценить изменения экспрессии мРНК трансмембранных муцинов *Muc1*, *Muc3*, *Muc13* и секреторного муцина *Muc2*, а также белков плотных контактов – клаудинов 2 и 4 при экспериментальном остром и хроническом колите.

Объект и предмет исследования – эпителиальный барьер ободочной кишки, его изменения при экспериментальном остром и хроническом колите.

Теоретической и методологической базой диссертации являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов в области строения и функции компонентов эпителиального барьера толстой кишки и патогенеза колита, индуцированного декстрансульфатом натрия.

Информационной базой исследования являются научные статьи в рецензируемых журналах, монографии, материалы конференций соответствующей научной тематики.

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

Научная новизна

Впервые у самцов мышей линии C57BL/6 охарактеризованы региональные цитофизиологические различия секреторных клеток ободочной кишки. Установлено, что количество выявляемых энтероэндокринных и бокаловидных клеток на крипту возрастает от проксимального к дистальному отделу ободочной кишки, наибольшие размеры бокаловидные клетки имеют в медиальном отделе, а содержание в них как высокосульфатированных, так и нейтральных муцинов в дистальном отделе выше, чем в медиальном.

Впервые показано, что при остром и хроническом колите, индуцированном 1% раствором ДСН у самцов мышей C57BL/6, изменения секреторных эпителиальных клеток и выраженность язвенно-воспалительного процесса имеют региональные особенности. При остром колите цитофизиологические изменения бокаловидных клеток наиболее выражены в дистальном отделе, что коррелирует с наибольшей выраженностью язвенно-воспалительного процесса, а при хроническом колите – в проксимальном отделе, хотя в нем воспалительный процесс выражен минимально. Изменение числа энтероэндокринных клеток наблюдается только при остром колите в медиальном отделе.

При остром колите ультраструктурные и молекулярно-биологические изменения компонентов эпителиального барьера ободочной кишки характеризуются истончением гликокаликса, большим количеством бактерий в непосредственной близости от эпителиальных клеток, повышенной экспрессией мРНК «порообразующего» клаудина 2 и сниженной – одного из основных структурных компонентов гликокаликса – муцина *Muc3*.

При хроническом колите ультраструктурные нарушения эпителиального барьера не выражены, но наблюдаются повышение продукции мРНК ассоциированного с процессами канцерогенеза трансмембранного муцина *Muc1*, компенсаторное повышение секреторного *Muc2* и снижение *Muc13*, отсутствие которого обуславливает более тяжелое течение экспериментального колита; повышена экспрессия клаудина 2.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в исследовании данные расширяют представления о механизмах развития острого воспалительного процесса, его хронизации и региональных особенностях при экспериментальном колите у животных и язвенном колите у человека. Данные о структурных, цитофизиологических и молекулярно-биологических нарушениях эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном колите послужат основой для разработки новых подходов к диагностике и лечению язвенного колита у человека.

Методология и методы исследования

Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: оценка клинических проявлений колита и массометрия, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические методы, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция в реальном времени, метод электронной микроскопии, статистические методы.

Положения, выносимые на защиту

1. На экспериментальной модели острого колита выявлены выраженные нарушения эпителиального барьера ободочной кишки: ультраструктурные повреждения эпителиальных клеток, повышение экспрессии гена «порообразующего» белка плотных контактов клаудина 2, снижение числа выявляемых энтероэндокринных и бокаловидных клеток и содержания в последних сульфомуцинов, истончение гликокаликса и уменьшение экспрессии его основного структурного компонента – муцина *Muc3*, тесный контакт большого числа бактерий с эпителиальной выстилкой.

2. При хроническом колите по сравнению с острым изменения эпителиального барьера менее выражены и характеризуются повышением экспрессии основного компонента слизи муцина *Muc2* и уменьшением его сульфатирования; изменением экспрессии муцинов гликокаликса – повышением *Muc1* и снижением *Muc13*, повышенной экспрессией «порообразующего» клаудина 2.

3. При остром и хроническом колите цитофизиологические изменения бокаловидных клеток и распространенность язвенно-воспалительного процесса имеют региональные различия. При остром колите язвенно-воспалительный процесс и цитофизиологические изменения бокаловидных клеток максимально выражены в дистальном отделе ободочной кишки. При хроническом колите воспалительный процесс наиболее выражен в дистальном отделе, а изменения бокаловидных клеток – в проксимальном.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой группы, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных методов исследования, корректным применением статистических методов анализа, критическим анализом результатов исследования в сопоставлении с актуальными литературными данными.

Материалы диссертации доложены на VI Архангельской международной медицинской научной конференции молодых ученых и студентов (к 80-летию Северного медицинского государственного университета) (Архангельск, 2013), Международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014), Всероссийской научной конференции «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016), Международной конференции «PhD Scientific Days 2017» (Будапешт, 2017).

Личное участие автора заключалось в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей, из них 3 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 7 публикаций 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Сравнительная анатомическая и гистологическая характеристика толстой кишки у человека и мыши

Толстая кишка – терминальный отдел желудочно-кишечного тракта, в котором завершаются процессы переваривания пищи, всасываются вода и ионы, формируются каловые массы. В целом у человека и мыши толстая кишка имеет сходное строение. В ней выделяют 3 отдела: слепую, ободочную и прямую кишку. Стенка всех отделов толстой кишки устроена единообразно и состоит из слизистой оболочки (СО), выстланной однослойным призматическим эпителием, подслизистой основы (ПО), мышечной оболочки, состоящей из кольцевого и продольного слоев мышечных клеток, и серозной оболочки. Сравнительная анатомическая и гистологическая характеристика толстой кишки у человека и мыши детально описана в книге Р.М. Treuting et al. (2012)

Слепая кишка – начальный отдел толстой кишки, представляет собой мешок, в который открывается подвздошная кишка. На границе подвздошной и слепой кишки расположен илеоцекальный клапан. У человека слепая кишка относительно короткая, имеет слепо замкнутый вырост – червеобразный отросток, в стенке которого расположено большое количество лимфоидных узелков. У мышей слепая кишка составляет до трети длины всей толстой кишки, содержит большое количество бактерий, ферментирующих остатки пищи. Бактерии синтезируют свободные жирные кислоты, витамины К, группы В и некоторые другие. Червеобразный отросток у мышей отсутствует, но есть скопление лимфоидных узелков в узкой апикальной зоне слепой кишки.

Ободочная кишка – наиболее длинный отдел толстой кишки, расположенный между слепой и прямой кишкой. Ободочную кишку человека разделяют на восходящую, поперечную, нисходящую и сигмовидную. У мыши деление ободочной кишки на отделы несколько иное, а именно: выделяют проксимальный отдел, который поднимается из правой подвздошной области к желудку, где переходит в короткий поперечный отрезок – медиальный отдел, и

далее идет дистальный отдел, переходящий в прямую кишку. У людей продольный мышечный слой слепой и ободочной кишки образует три отдельные продольные ленты – *taenia coli*. Эти ленты короче, чем остальные слои толстой кишки, в связи с чем между лентами образуются складки – гаустры. В толстой кишке мышцей *taenia coli* и гаустры отсутствуют, продольный мышечный слой равномерно распределен по окружности кишки. У человека СО по всей длине ободочной кишки образует поперечные складки, которые в дистальном направлении становятся более выраженными. У мыши СО слепой кишки и проксимальной части ободочной кишки образует поперечные складки, в медиальном отделе она гладкая, а в дистальном – формирует продольные складки.

Прямая кишка у человека имеет длину около 12 см, заканчивается в зоне зубчатой линии, где переходит в анальный канал длиной 2-3 см с 5-10 продольными складками СО, которые называются колонны Морганьи. Прямая кишка у мышей очень короткая, всего 1-2 см, СО толстой кишки резко переходит в СО анального канала, выстланную плоским эпителием (Treuting P.M. et al., 2012).

Помимо деления на слепую, ободочную и прямую кишку, также выделяют правую и левую толстую кишку. Правый отдел толстой кишки человека состоит из червеобразного отростка, слепой, восходящей ободочной и части поперечной ободочной кишки, расположенной до срединной линии живота, что примерно соответствует у мыши слепой кишке и проксимальной части ободочной кишки. Левый отдел толстой кишки у человека начинается в зоне поперечной ободочной кишки, спроецированной на срединную линию живота, включает нисходящую ободочную и прямую кишку, заканчивающуюся анальным отверстием. Левый отдел толстой кишки человека соответствует медиальному и дистальному отделам толстой кишки мыши (Treuting P.M. et al., 2012). Деление толстой кишки на левый и правый отделы связано с разной частотой возникновения и особенностями течения воспалительных и опухолевых заболеваний в этих отделах. Так, при язвенном колите на начальной стадии, как правило, поражается дистальный отдел толстой кишки, а затем патологический процесс постепенно

распространяется в проксимальном направлении (van der Post S., Hansson G.C., 2014). Известно, что левый и правый отделы толстой кишки различаются по источнику развития, экспрессии генов, кровоснабжению, метаболизму, абсорбционной активности, количественному и качественному составу микрофлоры. Так правый отдел у млекопитающих образуется из дистальной половины эмбриональной средней кишки, и кровь в него поступает по верхней брыжеечной артерии, а левый отдел развивается из задней кишки и кровоснабжается из нижней брыжеечной артерии (van der Post S., Hansson G.C., 2014). В правом отделе толстой кишки у человека капиллярная сеть многослойная, а в левом – однослойная (Iacopetta B., 2002). Правый и левый отделы различаются по уровню экспрессии более чем 1000 генов, ряду белков плазматической мембраны, метаболизму глюкозы, полиаминов и масляной кислоты, концентрации желчных кислот (Glebov O.K. et al., 2003; van der Post S., Hansson G.C., 2014). В направлении от восходящей ободочной кишки к сигмовидной снижается интенсивность всасывания воды и ионов (Fukuda S. et al., 1986), возрастают показатель pH (Evans D.F. et al., 1988) и апоптотический индекс эпителиальных клеток (Liu L.U. et al., 1999). По сравнению с левым отделом, в правом выше экспрессия белков теплового шока *HSP25*, *HSP70*, тол-подобного рецептора *TLR2* и ниже – *TLR4*, причем такое распределение экспрессии определяется составом микрофлоры (Hu S. et al., 2010; Wang Y. et al., 2010).

Стенка толстой кишки и у человека, и у мыши состоит из СО, продольного и кольцевого мышечных слоев и покрыта серозной оболочкой. У обоих видов млекопитающих СО выстлана однослойным призматическим эпителием, формирующим трубчатые железы, ориентированные перпендикулярно поверхности СО – крипты Либеркюна. Основными эпителиальными клетками толстой кишки являются столбчатые всасывающие колоноциты, бокаловидные и энтероэндокринные (ЭЭК) клетки (Treuting P.M. et al., 2012). Кроме них в состав эпителия входят стволовые и прогениторные клетки, М-клетки, а также малочисленные tuft-клетки, функция которых еще не вполне ясна (Noah T.K. et al., 2011). Клетки Панета у человека встречаются в червеобразном отростке и слепой

кишке, но, как правило, отсутствуют в нижележащих отделах толстой кишки. У мышей в СО толстой кишки клеток Панета нет (Treuting P.M. et al., 2012).

Собственная пластинка слизистой оболочки (СПСО) у человека и мыши содержит капилляры и лимфатические сосуды, а также лимфоциты и плазматические клетки. Присутствуют как диффузно распределенные лимфоциты, так и их скопления в виде кластеров и лимфоидных узелков. Лимфоидные узелки могут располагаться в СПСО, в ПО или проходить через мышечную пластинку, занимая одновременно и СПСО, и ПО. Эозинофилы, тучные клетки и макрофаги являются нормальными компонентами СПСО, но их количество меньше, чем лимфоцитов и плазматических клеток. В норме в СПСО толстой кишки выявляется небольшое количество диффузно рассеянных нейтрофилов (Treuting P.M. et al., 2012).

ПО отделена от СПСО мышечной пластинкой, состоящей из 2-3 рядов гладкомышечных клеток. В ПО у человека много жировой ткани, которая отсутствует у мышей.

Мышечная оболочка у человека и мыши состоит из внутреннего кольцевого и внешнего продольного слоев. Энтеральная нервная система у обоих видов представлена нервными ганглиями и связанными с ними нервными волокнами, которые формируют подслизистой (мейснерово) и межмышечное (ауэрбахово) нервные сплетения (Treuting P.M. et al., 2012).

Таким образом, толстая кишка мыши и человека имеет общий план строения, но есть различия (Табл. 1), которые следует учитывать при экстраполяции данных с экспериментальных животных на человека.

Таблица 1

Различия строения толстой кишки у человека и мыши по Treuting P.M. et al. (2012).

Параметры	Человек	Мышь
Общая длина толстой кишки	1-1,5 м	14 см
Слепая кишка	Короткая, около 5 см длиной; специальной функции не выполняет	3-4 см длиной, что составляет до трети длины всей толстой кишки; в ней происходит ферментация остатков пищи бактериями и синтез витаминов К и группы В
Аппендикс	Есть	Нет, но много лимфоидной ткани в апикальной части слепой кишки
Продольные ленты и гаустры	Есть	Нет
Ободочная кишка	Поперечные складки СО по всей длине, их выраженность в дистальном направлении увеличивается	В проксимальном отделе – поперечные складки СО, в медиальном – нет складок, в дистальном – продольные складки
Прямая кишка	8-15 см длиной	Очень короткая, 1-2 мм длиной
Клетки Панета	Встречаются в червеобразном отростке и слепой кишке	В толстой кишке отсутствуют
ПО	Много жировой ткани	Тонкая, не содержит адипоцитов

2.2. Язвенный колит

ЯК – хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание толстой кишки, при котором воспалительный процесс локализован преимущественно в СО (Шапошников В.И., 2013). При ЯК воспалительный процесс развивается, как правило, сначала в прямой кишке, и затем он постепенно распространяется в проксимальном направлении, охватывая все отделы толстой кишки, а иногда и дистальный отдел тонкой (Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А., 2009; Koutroubakis I.E., 2010; van der Post S., Hansson G.C., 2014; Cioffi M. et al., 2015).

ЯК относительно широко распространен среди населения мира, и в последние годы отмечается рост частоты его встречаемости (Ткачев А.В. и соавт., 2012; Shi X.Z., Winston J.H., Sarna S.K., 2011; Shokrani M., 2012). В экономически развитых странах Европы, Северной Америки и Австралии распространенность ЯК наиболее высока и составляет 80-120 человек на 100 тыс. (Ватутин Н.Т. и соавт., 2015), а в Московской области РФ – 20,4 на 100 тыс. населения (Belousova E.A., 2006). Смертность при этом заболевании зависит от своевременной диагностики и лечения. В США, Северной Европе и Великобритании ее показатель составляет 6 случаев на 1 млн населения (Ткачев А.В. и соавт., 2012). ЯК поражает преимущественно молодых людей трудоспособного возраста (средний возраст манифестации заболевания 20-40 лет) и нередко приводит к инвалидизации (Ткачев А.В. и соавт., 2012).

Клиническая симптоматика ЯК разнообразна и зависит от локализации и тяжести течения воспалительного процесса. Основными симптомами являются кишечные кровотечения (наблюдаются в 80% случаев), диарея (52%) и боли в животе (47%). Кроме того, могут отмечаться тенезмы, запоры, анальные трещины (Ткачев А.В. и соавт., 2012). При эндоскопическом исследовании – основном методе диагностики ЯК, выявляются отек и гиперемия СО толстой кишки, стертый сосудистый рисунок, эрозии и язвы, исчезновение гаустр (Ватутин Н.Т. и соавт., 2015). В периоды обострения заболевания могут наблюдаться системные проявления: лихорадка, слабость, снижение массы тела, анемия, лейкоцитоз и

тромбоцитоз (Ткачев А.В. и соавт., 2012). На первый план в клинической картине часто выходят внекишечные проявления. Так в 15% случаев при ЯК наблюдается остеопороз, в 10% - изъязвления полости рта, в 5-10% - артрит, в 3% - склерозирующий холангит, в 0,5-2% пустулезно-язвенный токсико-аллергический дерматит, в 0,6% - гангренозная пиодермия, в 0,3% - тромбоз глубоких вен, в 0,2% - тромбоемболия легочной артерии (Ватутин Н.Т. и соавт., 2015). При длительном течении ЯК приблизительно у 10% больных развивается колоректальный рак (Сергиенко Е.И., 2012).

Классификацию ЯК проводят по ряду признаков (Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А., 2009):

I. По клиническому течению

- Острая форма – характеризуется бурным началом заболевания с выраженными местными и общими симптомами.
- Фульминантная (молниеносная) форма – развивается быстро, почти всегда характеризуется тотальным поражением толстой кишки, развитием осложнений (токсическая дилатация толстой кишки, перфорация), что в большинстве случаев требует срочного хирургического вмешательства.
- Хроническая форма
- Рецидивирующая форма – наиболее распространенная форма. Эпизоды обострения длительностью 4-12 недель сменяются периодами ремиссии.
- Непрерывная форма – клинические симптомы сохраняются более 6 месяцев.

II. По локализации

- Дистальный колит – поражается прямая кишка или прямая и сигмовидная кишка
- Левосторонний колит – воспалительный процесс распространяется от прямой кишки до середины поперечно-ободочной.
- Тотальный колит (в ряде случаев с ретроградным илеитом) – поражается вся толстая кишка.

III. По тяжести клинических проявлений (активность заболевания)

- Легкая форма – частота дефекаций не превышает 4-ех раз в сутки с небольшим количеством крови в кале; повышенная утомляемость; лихорадка и тахикардия отсутствуют; отмечается лишь небольшая болезненность по ходу толстой кишки; увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) до 26 мм/ч. При эндоскопическом исследовании выявляются отечность, гиперемия СО, поверхностные, нередко многочисленные эрозии, переходящие в изъязвления, неравномерное утолщение СО.
- Среднетяжелая форма – стул 4-8 раз в сутки с кровью; повышение температуры тела, отсутствие аппетита, снижение массы тела, слабость, кишечные колики, признаки дегидратации, бледность, тахикардия, снижение артериального давления; болезненность и урчание в области толстой кишки, но растяжение толстой кишки отсутствует; часто выявляются анемия, лейкоцитоз, увеличение СОЭ. При эндоскопическом исследовании толстой кишки определяется выраженная гиперемия, отечность СО, множественные эрозии, язвы, покрытые слизью, гноем, фибрином.
- Тяжелая форма – стул чаще 8 раз в сутки с кровью, слизью, нередко с примесями гноя; температура тела выше 38°C; тахикардия; боли в животе, отсутствие аппетита; вздутие живота; снижение массы тела более чем на 10%; выраженная анемия, увеличение СОЭ, гипоальбуминемия. При эндоскопическом исследовании определяются резкая гиперемия, отечность СО, множественные эрозии, язвы, покрытые гноем и фибрином.

Этиология ЯК неясна. Не найдено ни определенного инфекционного, ни пищевого агента или какого-либо другого экзогенного фактора, вызывающего ЯК (Ткачев А.В. и соавт., 2012). Предполагают, что механизмы развития ЯК связаны с множеством факторов: генотипом, возрастом, особенностями питания, стрессами и др. (Ткачев А.В. и соавт., 2012).

Выявлено около 47 генных локусов, ассоциированных с ЯК, причем 26 из них являются общими для ЯК и другого воспалительного заболевания кишечника

– болезни Крона. Наиболее изучена связь ЯК с мутациями в генах лейкоцитарных антигенов человека *HLA* и молекул сигнальных путей *IL10* и *IL23*, что указывает на важную роль нарушений функционирования иммунной системы в развитии ЯК. Также существует связь с дефектами эпителиального барьера: ЯК ассоциирован с мутациями генов *ECM1* (ExtraCellular Matrix protein 1), кадгерина1, *HNF4a* (Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha) и ламинина β 1 (Thompson A.I., Lees C.W., 2011). Влияние генотипа на развитие ЯК подтверждается высокой частотой развития этого заболевания у родственников. Причем родственники первой степени родства имеют риск развития ЯК в десятки раз выше, чем в общей популяции. Однако величина конкордантности по ЯК у монозиготных близнецов относительно невелика: всего 6-14%, следовательно, факторы среды не менее важны для развития ЯК, чем генетические (Ткачев А.В. и соавт., 2012).

Важными предрасполагающими факторами ЯК по данным А.А. Элиной (2013) являются:

- 1) погрешности питания – нерегулярный прием пищи, употребление некачественных продуктов и пищевых аллергенов (выявлены у 88,2% больных),
- 2) прием лекарственных средств – антибиотиков, нестероидных противовоспалительных средств, оральных контрацептивов (у 32,5% больных),
- 3) стресс (у 19,6% больных).

Риск развития ЯК повышается при питании продуктами с высоким содержанием жиров, углеводов и животного белка и низким содержанием клетчатки («западная диета»). Курение снижает риск развития ЯК, но повышает – болезни Крона. Отказ от курения повышает риск развития ЯК и нередко приводит к обострению заболевания (Legaki E., Gazouli M., 2016). У больных с функциональными расстройствами органов пищеварения частота развития ЯК по сравнению со здоровой популяцией повышена в 16 раз (Ткачев А.В. и соавт., 2012). Обсуждается влияние на развитие ЯК изменения состава микробиома кишечника, дефицита витамина Д, загрязнения атмосферного воздуха, поступления в организм тяжелых металлов и др. (Legaki E., Gazouli M., 2016).

В настоящее время общепринятой является гипотеза о том, что в основе патогенеза ЯК лежит неадекватный иммунный ответ на кишечные антигены, развивающийся у генетически предрасположенных индивидов (Ткачев А.В. и соавт., 2012; Thompson A.I., Lees C.W., 2011). В толстой кишке человека содержатся фрагменты пищи и обитает огромное множество разнообразных бактерий, необходимых для нормальной работы желудочно-кишечного тракта. С другой стороны, кишечник – барьерный орган, через который в организм могут попадать патогенные микроорганизмы и повреждающие вещества. В связи с этим в норме в толстой кишке поддерживается баланс между толерантностью к антигенам пищи и комменсальной микрофлоры и иммунными реакциями на патогены. Считается, что при ЯК этот баланс смещается в сторону провоспалительных реакций, и снижается толерантность к нормальным компонентам кишечного содержимого (Ткачев А.В. и соавт., 2012; de Mattos V.R. et al., 2015). У больных ЯК выявляются высокие титры антител к различным антигенам кишечных бактерий. Вместе с тем, при воспалении происходит разрушение клеток СО и развивается иммунный ответ на эндогенные молекулы. У 66,7% больных выявляются антитела к перинуклеарным нейтрофильным антигенам (pANCA). У больных ЯК выявляются антиэндотелиальные и антиэпителиальные антитела (Ткачев А.В. и соавт., 2012). Однако механизмы нарушения регуляции иммунного ответа неясны. Очевидно, важную роль в инициации ЯК играет нарушение барьерной функции толстой кишки, что приводит к транслокации кишечной микрофлоры во внутреннюю среду организма и развитию воспалительного процесса (Ткачев А.В. и соавт., 2012; Coskun M., 2014).

Так как причины возникновения и развития ЯК неизвестны, существующие методы лечения мало эффективны. На сегодняшний день ЯК считается медикаментозно неизлечимым заболеванием и требует постоянной дорогостоящей поддерживающей терапии, основной целью которой является достижение продолжительной ремиссии заболевания (Щукина О.Б. и соавт., 2014). Базисная терапия ЯК проводится препаратами 5-аминосалициловой

кислоты, которые оказывают выраженное противовоспалительное действие за счет угнетения липо- и циклооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты, подавляют образование активированными нейтрофилами супероксидных радикалов, обладают иммуномодулирующей активностью, блокируют синтез медиаторов воспаления (цитокинов, простагландинов, лейкотриенов и др.), тормозят миграцию, секреторную и фагоцитарную активность нейтрофилов, продукцию иммуноглобулинов и др. Стандартная схема лечения также включает кортикостероиды системного и местного действия и нестероидные иммуносупрессоры (Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А., 2009; Циммерман Я.С., Циммерман И.Я., Третьякова Ю.И., 2013). В последние годы стала проводиться терапия антицитокиновыми препаратами: показана высокая эффективность лечения антителами к фактору некроза опухоли альфа (TNF α), однако из-за выраженных побочных эффектов их применение ограничивается тяжелыми формами заболевания, резистентными к другим методам терапии (Парфенов А.И., 2012). Современным направлением терапии ЯК является использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга. Внутривенное введение аллогенных МСК достоверно увеличивает продолжительность ремиссии и снижает риск развития рецидива (Парфенов А.И., 2012; Князев О.В. и соавт., 2015). Несмотря на совершенствование методов лечения ЯК, их эффективность остается недостаточной. Согласно исследованиям последних 20 лет, ремиссия в течение 3–7 лет после постановки диагноза сохраняется лишь у 25% больных, ежегодные рецидивы заболевания возникают у 18%. Из-за неэффективности консервативной терапии или развития осложнений около 20% больных в течение 10 лет от момента постановки диагноза переносят колэктомию. При этом частота ранних послеоперационных осложнений составляет при плановых вмешательствах около 10 %, при экстренных до 60–80 %, а летальность - от 12 до 50 % (Князев О.В. и соавт., 2015)

Важной проблемой ЯК является его диагностика. Неясная этиология, отсутствие четкой клинической картины, внекишечные проявления затрудняют диагностику этого заболевания. В нашей стране в течение первого года болезни

диагноз ЯК устанавливается только в 25% случаев, а в остальных правильный диагноз ставится на протяжении 3-12 лет от начала клинических симптомов заболевания. При поздней диагностике ЯК тяжелые осложнения развиваются у 29% больных (Ткачев А.В. и соавт., 2012). В практической медицине, кроме того, существует проблема дифференциальной диагностики ЯК. Дифференциальный диагноз проводится в первую очередь с болезнью Крона, инфекционными заболеваниями, паразитарными поражениями, синдромом раздраженного кишечника, полипами, трещинами, а также с такими редкими поражениями кишечника как туберкулез, дивертикулез, болезнь Уиппла (Сичинава И. В., Горелов А. В., 2009). Наиболее трудной является проблема дифференциальной диагностики ЯК и болезни Крона. Оба заболевания относятся к воспалительным заболеваниям кишечника, имеют неясную этиологию и сходную клиническую картину, а информативные диагностические лабораторные и иммунологические маркеры отсутствуют (Элина А.А., 2013).

Диагноз ЯК устанавливается на основании клинических, лабораторных, рентгенологических, эндоскопических данных и морфологического исследования биоптатов толстой кишки. Клиническая картина ЯК может быть очень разнообразна и неспецифична для данного заболевания. Классические лабораторные методы позволяют выявить наличие воспалительного процесса и оценить его тяжесть, но провести дифференциальную диагностику заболевания на их основе невозможно. Наиболее объективными методами диагностики ЯК являются рентгенологическое и эндоскопическое исследования толстой кишки с проведением биопсии и последующим морфологическим исследованием (Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012; Тертычный А.С. и соавт., 2014). Результаты гистологического исследования биоптатов порой являются единственным подтверждающим диагностическим методом в дифференциальной диагностике ЯК (Элина А.А., 2013). На макроскопическом уровне в толстой кишке при ЯК обнаруживаются многочисленные язвы разных размеров и формы. Для начальных стадий активной фазы характерны мелкие язвы, образующиеся при вскрытии крипт-абсцессов, поверхность СО при этом напоминает ткань, изъеденную

молью. В большинстве случаев встречаются крупные язвы неправильной формы с ровными или подрытыми краями. В отдельных наблюдениях язвы сливаются между собой, занимая практически всю поверхность толстой кишки, на которой остаются лишь небольшие полиповидные островки сохраненной СО. Дно крупных язв представлено грануляционной тканью с гладкой блестящей поверхностью. Также для ЯК характерны воспалительные полипы (псевдополипы), располагающиеся между язвами. Воспалительные полипы имеют гладкую поверхность без четкого деления на ножку и тело. В период ремиссии ЯК они сохраняются. При хронических формах ЯК на поверхности СО можно обнаружить различного размера аденомы. Отмечается значительное укорочение толстой кишки, но стенка толстой кишки обычно утолщается незначительно (Капуллер Л.Л., 2008).

Микроскопическая картина при ЯК варьирует в зависимости от длительности и тяжести течения заболевания. Характерной чертой ЯК является локализация воспалительного инфильтрата преимущественно в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) с редким проникновением его в подслизистую основу (ПО). СПСО диффузно и интенсивно инфильтрирована лимфоцитами, плазмócитами и нейтрофилами. Среди клеток воспалительного инфильтрата почти всегда обнаруживаются эозинофилы. В СПСО и ПО отмечается полнокровие сосудов (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И. 2012). В острой или активной стадии заболевания уменьшается количество бокаловидных клеток, в криптах преобладают цилиндрические клетки с крупными ядрами. Местами отмечаются поверхностные эрозии. В просвете крипт скапливаются сегментоядерные лейкоциты (криптит). При закрытии устьев таких крипт формируются крипт-абсцессы. Просвет их расширяется, эпителий атрофируется и часто разрушается в базальных отделах, воспалительный процесс в этой зоне распространяется на ПО. Вскрытие верхних отделов крипт-абсцессов приводит к формированию микроязв, занимающих территорию одной крипты, но проникающих на всю глубину СО. Микроязвы быстро сливаются, что приводит к формированию широких плоских язв с подрытыми краями (Капуллер Л.Л., 2008;

Маркова А.А., Кашкина Е.И. 2012). По мере уменьшения активности заболевания снижается число крипт-абсцессов, иногда они полностью исчезают. Размеры язв постепенно уменьшаются, они эпителизируются. Со временем СО утолщается, в ней могут обнаруживаться признаки реактивной гиперплазии в виде углубления крипт, появления в них большого числа крупных бокаловидных клеток при сохранении небольшого инфильтрата, представленного, преимущественно, плазмócитами с примесью лимфоцитов и эозинофилов (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И. 2012). К признакам хронического воспаления относятся нарушение архитектоники крипт, их атрофия, утолщение ПО за счет фиброза и разрастания в ней жировой ткани. Также на этой стадии заболевания в глубине крипт могут появляться клетки Панета и увеличиваться число ЭЭК. (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И. 2012).

Хотя эндоскопия остается золотым стандартом диагностики, оценки активности воспаления и процесса заживления при ЯК, она имеет ряд недостатков. Это инвазивная процедура, вызывающая дискомфорт у пациента, потенциально опасная, относительно дорогостоящая. Поэтому идет активный поиск биомаркеров, по которым можно было бы выявить воспаление в кишечнике, определить его активность и провести дифференциальную диагностику заболевания. Некоторые из таких биомаркеров уже хорошо зарекомендовали себя в клинической практике (Benítez J.M., García-Sánchez V., 2015). Одним из них является калпротектин – кальций- и цинк-связывающий белок, синтезируемый нейтрофилами. Он обладает антибактериальной активностью и способен индуцировать апоптоз. Нейтрофилы продуцируют калпротектин в очаге воспаления в СО, что приводит к повышению его уровня в кале. Фекальный калпротектин является более специфичным маркером воспаления СО толстой кишки, чем С-реактивный белок или скорость оседания эритроцитов. На основании результатов измерения фекального калпротектина можно различать органические и функциональные заболевания кишечника, оценивать активность заболевания и эффективность проводимого лечения, прогнозировать риск рецидивов (Benítez J.M., García-Sánchez V., 2015). Для

дифференциальной диагностики ЯК и болезни Крона уже используются тесты на циркулирующие антитела к аутоантигенам и антигенам кишечной микрофлоры. Антитела к цитоплазме нейтрофилов ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) выявляются у 2-28% больных болезнью Крона и у 20-85% больных ЯК, а антитела к клеткам *Saccharomyces cerevisiae* ASCA (Anti-*Saccharomyces Cerevisiae* Antibodies) обнаруживаются у 39-69% пациентов с болезнью Крона и у 5-15% больных ЯК (Cioffi M. et al., 2015).

Таким образом, ЯК - широко распространенное тяжелое хроническое заболевание, при длительном течении которого развиваются угрожающие жизни осложнения. Существующие методы лечения малоэффективны и на сегодняшний день ЯК считается медикаментозно неизлечимым заболеванием. Диагностика ЯК затруднена. Проблемы диагностики и лечения связаны с отсутствием четких представлений об этиологии и патогенезе заболевания. Согласно общепринятой гипотезе, ЯК обусловлен развитием у генетически предрасположенных лиц неадекватного иммунного ответа на кишечные антигены, что в первую очередь связано с нарушением барьерной функции кишечника.

2.3. Роль реакций врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе язвенного колита

Традиционно считается, что ведущую роль в патогенезе ЯК играет адаптивный иммунный ответ. Регуляция адаптивного иммунного ответа осуществляется преимущественно CD4⁺ Т-лимфоцитами (Geremia A. et al., 2014). В 1986 г. впервые обнаружили, что Т-хелперные клетки мышей по способности секретировать цитокины можно разделить на 2 субпопуляции: Th1 и Th2 (Mosmann T.R. et al., 1986). Первые секретируют IFN γ , IL-2, IL-3, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), вторые – IL-4, IL-5 и IL-3. Позже было показано, что баланс Th1/Th2 лимфоцитов определяет основную направленность иммунного ответа. Th1 клетки опосредуют клеточный иммунный ответ, направленный на борьбу с внутриклеточными патогенами, а Th2 клетки –

гуморальный ответ против внеклеточных патогенов (Ярилин А.А., 2010, Kaiko G.E. et al., 2008).

Показано, что Th1-лимфоциты дифференцируются под действием IL-12, IFN γ , IL-18, IL-23, IL-27, продуцируют цитокины IFN γ , IL-2, TNF α , TNF β , IL-3, GM-CSF и регулируют иммунную реакцию на патогены, локализующиеся в цитоплазме клеток. Для дифференцировки Th2-клеток необходим IL-4, они секретируют IL-4, IL-5, IL-13, IL-6, IL-9, IL-10, IL-11, IL-21, IL-25, IL-3, GM-CSF и опосредуют защиту от паразитов и внеклеточных патогенов. Среди цитокинов, продуцируемых лимфоцитами, выделяют ключевые для Th1- и Th2-клеток, поскольку они не только относительно специфичны для них, но и причастны к выполнению их основных эффекторных функций, индукции дифференцировки клеток этих субпопуляций, самоподдержанию, а также подавлению развития клеток противоположного типа. Для Th1-клеток таким ключевым цитокином является IFN γ , для Th2-клеток — IL-4 (Ярилин А.А., 2010).

Кроме Th1- и Th2-типов иммунного ответа, существует ответ, опосредованный Th17-лимфоцитами. Эти клетки играют ключевую роль в защите организма от внеклеточных микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Th17-лимфоцитами секретируют IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-17AF, IL-21, IL-22 и TNF α . Для образования Th17 клеток необходимы TGF β (Transforming Growth Factor β), IL-6, IL-1 β и IL-23, а такие цитокины как IFN γ , IL-4 и IL-27 подавляют их дифференцировку (Kaiko G.E. et al., 2008). Кроме того, был выявлен еще один тип Т-хелперных клеток – регуляторные Т-лимфоциты (Treg). Treg поддерживают аутоотолерантность и иммунный гомеостаз за счет подавления активации, пролиферации и эффекторных функций различных иммунных клеток. Treg секретируют IL-10, TGF β и IL-35. Для дифференцировки Treg необходим TGF β (Kaiko G.E. et al., 2008)

В ранних работах у больных ЯК не было выявлено повышения продукции ключевого Th1-цитокина IFN γ и было показано увеличение продукции Th2-цитокина IL-5, в связи с чем считалось, что для ЯК характерен иммунный ответ Th2-типа. Однако при ЯК не выявили повышения продукции ключевого Th2-

цитокина IL-4, что привело к появлению термина «атипичное Th2-состояние» (Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D., 2011). На данный момент сведения по экспрессии IL-4 и IFN γ при ЯК противоречивы. В ранних работах не было выявлено изменения уровня IFN γ при ЯК (Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D., 2011), но D.S. Pearl et al. (2011) обнаружили снижение его продукции в толстой кишке у больных ЯК, а в ряде исследований показано повышение его продукции в СО толстой кишки у больных ЯК (Конович Е.А и др., 2016; Masuda H. et al., 1995; Roda G. et al., 2011; Verma R., Verma N, Paul J. 2013). Продукция IL-4 при ЯК, согласно большинству источников, не изменяется (Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D., 2011; Roda G. et al., 2011; Múzes G. et al., 2012), но YUE Wen-jie et al. (2012) выявили его повышение особенно при тяжелом течении ЯК.

При ЯК установлено увеличение продукции IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-33, TNF α (Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D., 2011). Из них Th1-клетками может секретироваться TNF α , Th2-клетками – IL-5, IL-6 и IL-13, Th17-клетками – IL-6, IL-17A, TNF α .

Однако Т-хелперы являются не единственным источником указанных цитокинов, их могут продуцировать также клетки, относящиеся к врожденному звену иммунитета. Так, IL-6, IL-17A, TNF α , а также IFN γ , IL-1 β , IL-8, IL-18 и IL-33 продуцируется макрофагами; IL-6, IL-1 β , IL-18 – дендритными клетками, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, TNF α – эпителиальными клетками; IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α – нейтрофилами; IL-5, TNF α , IFN γ – эозинофилами; IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-18, TNF α – базофилами; IL-5, IL-13, IL-17A, TNF α , IFN γ – ILC (Innate Lymphoid Cells) – врожденными лимфоидными клетками (Ярилин А.А., 2010; Oswald I.P., 2006; Peterson L.W., Artis D., 2014; Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A., 2014).

А.М. Globig et al. (2014) исследовали методом проточной цитофлуориметрии субпопуляции CD4⁺ лимфоцитов, выделенных из биопсийного материала СО толстой кишки больных ЯК и здоровых людей. Согласно их данным, при ЯК по сравнению с нормой число Th1 клеток не изменяется, число Th2 клеток снижается, а при обострении возрастает количество Th17 и Treg лимфоцитов.

Данная картина противоречит концепции Th2-поляризации иммунного ответа при ЯК.

У больных ЯК повышается содержание нейтрофилов в СО, причем их число коррелирует с тяжестью течения заболевания. Использование анти-нейтрофильных антител, приводящее к снижению числа нейтрофилов, уменьшает тяжесть экспериментального ДСН-индуцированного колита у мышей (Wéra O, Lancellotti P, Oury C., 2016). В СО ободочной кишки при ЯК увеличивается число CD14⁺ макрофагов (Magnusson M.K. et al., 2016), дендритных клеток нескольких субпопуляций (Stagg A.J. et al., 2003) и NK клеток (Yadav P.K., Chen C., Liu Z., 2011); при обострении заболевания возрастает число эозинофилов (Nishitani H. et al., 1998).

Таким образом, при ЯК развивается сложная комплексная иммунная реакция, в которую вовлечены как врожденное, так и адаптивное звено иммунной системы. При этом заболевании не выявляется четкой поляризации адаптивного иммунного ответа по Th1/Th2/Th17 типам. Одним из основных методов оценки иммунных нарушений является исследование продукции цитокинов. Литературные сведения о продукции цитокинов при ЯК противоречивы.

2.4. Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите

В толстой кишке постоянно присутствует огромное множество комменсальных бактерий и пищевых антигенов, в тоже время в кишечник могут попадать и патогенные микроорганизмы. Макроорганизму необходимо сохранять толерантность к первым и развивать эффективный иммунный ответ на последние. Ведущую роль в реализации этой задачи играет эпителиальный барьер (Geremia A. et al., 2014). Нарушение функции эпителиального барьера может приводить к развитию воспалительного ответа на нормальные кишечные антигены, что, по мнению ряда авторов, является инициальным механизмом ЯК (Ткачев А.В. и соавт., 2012; Coskun M., 2014).

Эпителиальный барьер толстой кишки состоит из слоя слизи, гликокаликса и собственно эпителиальной выстилки (Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014). Эпителиальная выстилка толстой кишки представлена одним слоем цилиндрических клеток, среди которых основными типами являются всасывающие колоноциты, бокаловидные и ЭЭК. Эпителиоциты связаны между собой комплексом межклеточных контактов, поддерживающих целостность эпителиальной выстилки и препятствующих парацеллюлярному транспорту макромолекул и бактерий. Эпителиальные клетки кишечника (ЭЭК) участвуют в регуляции иммунных реакций. Они несут ряд рецепторов к PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns), могут выступать в роли непрофессиональных антигенпрезентирующих клеток, секретируют ряд цитокинов, таким образом регулируя реакции как врожденного, так и адаптивного звена иммунной системы. Апикальная поверхность всасывающих колоноцитов – преобладающего типа клеток, образующих выстилку люминальной поверхности кишки, покрыта плотным слоем трансмембранных гликопротеинов, выполняющих защитную и сенсорную функции - гликокаликсом. Бокаловидные клетки продуцируют слизь, образующую 2 слоя на поверхности эпителиальной выстилки. Внутренний слой слизи не проницаем для бактерий, внешний – служит субстратом для прикрепления и питания комменсальной микрофлоры. Также в состав слизи входят бактерицидные вещества, продуцируемые колоноцитами, и секреторные иммуноглобулины, продуцируемые плазмócитами СО (Roda G. et al., 2010; Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014).

Слой слизи

Первым барьером толстой кишки, защищающим внутреннюю среду организма от бактерий и повреждающих агентов, таких как просветные протеазы и желчные кислоты, является продуцируемая бокаловидными клетками слизь. Кишечная слизь препятствует адгезии и инвазии микроорганизмов, при этом она не мешает транспорту питательных веществ, служит субстратом для прикрепления и питания комменсальной микрофлоры, выступает в качестве

смазки, облегчая прохождение химуса по кишечнику (Deplancke B., Gaskins H.R., 2001). Основными структурными компонентами слизи являются муцины.

Муцины – это высокогликозилированные гликопротеины, состоящие из белковой оси (апомуцина) и множества O-связанных с ней олигосахаридных цепей (Могильная Г.М., Могильная В.Л., 2007; Jonckheere N., 2013). Обнаружено свыше 20 различных генов человека, кодирующих белковую часть муцинов, от MUC1 до MUC22 (HUGO Gene Nomenclature Committee). Характерной особенностью строения муцинов является наличие тандемных повторов с высоким содержанием пролина (P), треонина (T) и серина (S) – PTS-области. Их также называют муциновыми доменами или VNTR (Variable Number Tandem Repeats). Эти регионы в зрелых муцинах обильно O-гликозилированы. Из-за обильного гликозилирования муциновые домены приобретают жесткую вытянутую структуру, напоминающую «щетку для бутылок» (Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C., 2013).

По строению белковой оси выделяют два типа муцинов: секреторные и мембрано-ассоциированные. Большинство секреторных муцинов характеризуется высокой молекулярной массой, большой долей углеводов (50-80% молекулярной массы), они олигомеризуются и формируют трехмерные сети (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC19). Однако есть несколько секреторных муцинов с низкой молекулярной массой, которые не способны образовывать гели (MUC7, MUC8 и MUC9), их функции не вполне ясны. Для секреторных гель-образующих муцинов характерны регионы, отвечающие за димеризацию и олигомеризацию, образование трехмерных сетей: гомологи доменов фактора фон Виллебранда D и C (vWF-C, vWF-D) и C-терминальные, цистеин-узелковые домены. Все остальные известные муцины (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC14, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21, MUC22) являются мембранно-ассоциированными. Они встроены в плазматические мембраны клеток и существуют в мономерной форме. Мембранно-ассоциированные муцины содержат трансмембранные домены, сайты расщепления и ряд доменов, участвующих в передаче клеточных сигналов: SEA (Sea urchin sperm protein

Enterokinase and Agrin) модули, эпидермальный фактор роста (EGF)-подобные домены, цитоплазматические «хвостовые» домены и другие (Могильная Г.М., Могильная В.Л. , 2007; Corfield A.P., 2001; Jonckheere N., 2013).

Основную часть всех зрелых муцинов составляют углеводы. Именно они определяют основные физико-химические свойства данных молекул. Большинство углеводных цепей в муцинах связаны с белковой частью через атом кислорода (Pelaseyed T. et al., 2014). В PTS-областях они расположены так плотно, что полностью защищают белковую ось от разрушения протеазами. Гликаны муциновых доменов связывают большое количество воды, придавая муцину гелеобразные свойства. В состав муцинов также входит небольшое число N-связанных цепей, влияющих на субклеточное распределение, укладку полипептида, пути рециклирования. Все O-цепи содержат коровую структуру, у некоторых есть ось и большинство имеют периферические ответвления. Существует 8 различных коровых структур, все они содержат N-ацетил-D-галактозамин, через который присоединены к апомуцину. Осевые регионы состоят из чередующихся D-галактозных и N-ацетил-D-глюкозаминовых остатков. Периферические регионы O-цепей придают характерные черты муцинам и определяют их адгезивные свойства. На основе биохимических свойств периферических регионов гликанов, муцины делятся на нейтральные и кислые, а кислые на сульфатированные (сульфомуцины) и несulfатированные (сиаломуцины) (Corfield A.P., 2001; Deplancke B., 2001).

Основным структурным компонентом слизи, покрывающей эпителиальную выстилку толстой кишки у человека, является муцин MUC2. Слизь формирует 2 слоя: внутренний и внешний (Pelaseyed T. et al., 2014). Внутренний слой слизи плотный, не удаляется аспирацией, не проницаем для бактерий и частиц размером более 0,5 мкм. В дистальных отделах толстой кишки у человека он имеет толщину около 200-300 мкм, а у мыши - около 50 мкм (Pelaseyed T. et al., 2014). Внешний слой слизи более рыхлый, легко смывается и обильно заселен бактериями. Он образуется в результате частичной деградации и разрыхления муциновой сети внутреннего слоя слизи. Это превращение обеспечивается,

видимо, собственными протеазами кишечника, т.к. этот процесс наблюдается у мышей без кишечной микрофлоры, а ингибиторы протеаз предотвращают образование внешнего слоя слизи. Между внутренним и внешним слоями наблюдается резкая граница. Углеводы муцинов используются комменсальными бактериями в качестве источника питания. Многие бактерии имеют специализированные опероны для различных типов углеводных структур, в связи с чем особенности гликозилирования муцинов могут вносить вклад в селекцию бактерий (Pelaseyed T. et al., 2014).

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 (Deplancke B., Gaskins H.R., 2001).

Помимо муцинов в состав слизи входят также другие продукты бокаловидных клеток (фактор трилистника 3 (TFF3 – Trefoil factor 3), резистин-подобная молекула β (RELM β), и Fc- γ связывающий белок (FCGBP)), антимикробные пептиды, секретируемые эпителиальными и иммунными клетками, и секреторный IgA, продуцируемый плазмócитами (Kim Y.S., Ho S.B., 2010; Roda G. Et al., 2010).

TFF3 – небольшой белок, второй по количеству после MUC2 секреторный продукт бокаловидных клеток. Участвует в стабилизации муциновой сети и процессах регенерации эпителия. Показано, что TFF3 способствует миграции клеток, подавляет апоптоз, стимулирует иммунный ответ, опосредованный Толл-подобными рецепторами (TLR). TFF3-дефицитные мыши более чувствительны к ДСН-индуцированному колиту по сравнению с животными дикого типа (Kim Y.S., Ho S.B., 2010).

RELM β – небольшой богатый цистеином белок, синтезируется бокаловидными клетками, причем его продукция возрастает в каудальном направлении. RELM β практически отсутствует в ободочной кишке у мышей, лишенных микрофлоры, и его продукция значительно повышается при колонизации кишечника нормальной микрофлорой. Предполагается, что он

участвует в развитии иммунного ответа на бактерии и паразитов, регулирует баланс комменсальной микрофлоры, стимулирует продукцию MUC2 (Okubo H. et al., 2016; Kim Y.S., Ho S.B., 2010)

FCGBP – белок, способный связывать IgG через Fc домен. Секретируется бокаловидными клетками. Ковалентно связывается с MUC2, участвуя в стабилизации муциновой сети во внутреннем слое слизи (Kim Y.S., Ho S.B., 2010).

Антимикробные пептиды – обширная группа небольших белков (от 10 до 150 остатков аминокислот), являются важным компонентом врожденного иммунитета, способны уничтожать Грам (+) и Грам (–) бактерии, грибки, оболочечные вирусы, кроме того они могут влиять на апоптоз, заживление ран, и оказывать иммуномодулирующее действие (Wang G., 2014). Наиболее значимой группой антимикробных пептидов являются дефензины; α -дефензины секретируются преимущественно клетками Панета и нейтрофилами, β -дефензины – лимфоцитами и эпителиальными клетками, в том числе ободочной кишки. Человеческий β -дефензин 1 (HBD1 – Human Beta Defensin 1) в ободочной кишке экспрессируется конститутивно, на его концентрацию в слизи не влияют ни цитокины, ни бактерии. HBD2 присутствует в слизи в норме и его продукция значительно возрастает при обострении ЯК. Экспрессия *HBD3* и *HBD4* в норме в СО ободочной кишки очень низкая, но она возрастает при ЯК (Roda G. et al., 2010). Помимо β -дефезинов в составе слизи ободочной кишки выявлены кателицидин LL-37, убиквитин, лизоцим и другие антимикробные пептиды (Antoni L. Et al., 2013)

IgA – тип антител, синтезирующихся в барьерных органах в наибольшем количестве. IgA секретируется плазмоцитами СО, связывается с полимерным рецептором иммуноглобулина (pIgR) на базолатеральной поверхности ЭКК и переносится ими в просвет кишки. Секреторный IgA в составе слизи опсонизирует пищевые и бактериальные антигены, препятствует прикреплению бактерий к поверхности эпителиальной выстилки, участвует в регуляции состава микрофлоры, препятствует росту и инвазии патогенных микроорганизмов, способствует захвату антигенов М-клетками (Cerutti A., Rescigno M., 2008).

Показано, что в развитии ЯК важную роль играет нарушение барьерной функции внутреннего слоя слизи. У мышей с нокаутом гена *Muc2* (*Muc2^{-/-}*) отсутствует слой слизи на поверхности эпителиальной выстилки толстой кишки и развивается спонтанный колит (Corfield A.P. et al., 1993). На модели острого ДСН-индуцированного колита, показано, что после замены питьевой воды на 3% раствор ДСН в толстой кишке мышей внутренний слой слизи через 12 часов становится проницаемым для бактерий, через 24 часа он практически исчезает, а через 120 часов развивается воспалительная инфильтрация СО. Добавление 3% ДСН в культуральную среду эксплантов дистального отдела ободочной кишки мыши уже через 15 мин приводит к уменьшению толщины внутреннего слоя слизи вдвое и делает его проницаемым для частиц диаметром 2 мкм (Johansson M.E. et al., 2010). Повышение проницаемости внутреннего слоя слизи также было показано на мышинных моделях спонтанного колита – C57/Bl6 мыши дефицитные по гликотрансферазе C1GALT1 (Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1), интерлейкину IL-10, натрий-водородному обменнику SLC9A3 (SoLute Carrier family 9 member A3) и толл-подобному рецептору TLR5. У этих нокаутных животных имеется относительно сохранный внутренний слой слизи, однако на поверхности эпителиальных клеток ободочной кишки выявляются бактерии (Corfield A.P. et al., 1993). У больных ЯК при обострении заболевания также наблюдается повышение проницаемости внутреннего слоя слизи (Johansson M.E. et al., 2010).

При ЯК показано значительное уменьшение толщины слоя слизи в левой ободочной и прямой кишке, причем снижение толщины слизи коррелирует с активностью воспалительного процесса: на участках кишки со слабо выраженным воспалением или его отсутствием толщина слизи соответствует норме, а в области более тяжелых воспалительных изменений слизи мало или она отсутствует (Pullan R.D. et al., 1994). При ЯК выявлено снижение числа бокаловидных клеток, количества внутриклеточной и внеклеточной слизи, уменьшение в ней углеводных компонентов. Снижение числа бокаловидных клеток коррелирует с тяжестью ЯК у человека и варьирует от незначительного

уменьшения их количества с преобладанием клеток с мелкими, незрелыми вакуолями у больных с легким течением ЯК до выраженного снижения и иногда отсутствия у пациентов со среднетяжелым течением ЯК (Дорофеев А.Э., Василенко И.В., Рассохина О.А., 2013)

Постоянство слоя слизи определяется равновесием процессов секреции ее бокаловидными клетками, разрушения протеазами и гликозидазами, а также механического смывания содержимым кишки (Kim Y.S., Ho S.B., 2010). При ЯК значительно возрастает активность бактериальных протеаз (Bustos D. et al., 1998). В кале больных ЯК также возрастает активность сульфатаз и сиалат 0-ацетил эстеразы (Corfield A.P. et al., 1993; Tsai H.H. et al., 1995). Показано, что фекальные экстракты пациентов с ЯК эффективнее разрушают кишечный муцин по сравнению с экстрактами от здоровых лиц (Corfield A.P. et al., 1993).

При гистохимическом исследовании состава гликопротеинов слизи при ЯК выявлено увеличение сиалирования и снижение сульфатирования, снижение O-гликозилирования, укорочение олигосахаридных цепей, снижение O-ацетилирования муцинов (Дорофеев А.Э., Василенко И.В., Рассохина О.А., 2013; Corfield A.P. et al., 1993; Pullan R.D. et al., 1994; Corfield A.P. et al., 2001; Moehle C. et al., 2006; Senapati S. et al., 2010). Увеличение при ЯК количества сиаломуцинов, уменьшение O-ацетилирования и снижение сульфатирования муцинов коррелирует с воспалительным индексом (Corfield A.P. et al., 2001).

Таким образом, снижение количества слизи, изменения ее физических и биохимических свойств играют важную роль в патогенезе ЯК, приводя к повышению проницаемости слоя слизи для бактерий и способствуя их адгезии и инвазии.

Гликокаликс

Гликокаликс представляет собой плотный слой трансмембранных молекул, расположенных на апикальной поверхности эпителиальных клеток. Основными структурными компонентами гликокаликса толстой кишки являются мембрано-ассоциированные муцины (Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C., 2013). Эти

муцины имеют трансмембранный домен и выступают на 200-1500 нм над поверхностью эпителиальной клетки (Kim Y.S., Ho S.B., 2010).

В норме в эпителии ободочной кишки у взрослого человека экспрессируются мембрано-ассоциированные муцины MUC 1, 3A, 3B, 4, 12, 13, 17, 20, 21 и отсутствует MUC14 (Corfield A.P. et al., 2001; Higuchi T. et al., 2004; Longman R.J. et al., 2006; Moehle C. et al., 2006; Itoh Y. et al., 2008; Kim Y.S., Ho S.B., 2010; GeneCards: The Human Gene Database). Литературные данные о MUC15 и MUC16 противоречивы: в большинстве работ авторы указывают на их отсутствие в толстой кишке (Corfield A.P. et al., 2001; Longman R.J. et al., 2006; Moehle C. et al., 2006; Kim Y.S., Ho S.B., 2010; GeneCards: The Human Gene Database), однако, L.T. Pallesen et al. (2002) выявили экспрессию в ободочной кишке мРНК *MUC15*, а J.Yamamoto-Furusho et al. (2014) - экспрессию *MUC16*. Данные об экспрессии в ободочной кишке у человека недавно открытого *MUC22* в литературе не представлены.

Основными компонентами гликокаликса ЭКК у человека являются MUC3, MUC12 и MUC17. Их гены локализованы в одном геномном локусе и кодируют трансмембранные белки, состоящие приблизительно из 5000 аминокислотных остатков. Внеклеточные домены этих муцинов поднимаются над плазматической мембраной на высоту около 1 мкм (Pelaseyed T. et al., 2014).

Также в состав гликокаликса толстой кишки входит значительное количество муцина MUC13. Его внеклеточный домен короткий и представлен лишь 400 остатками аминокислот. Вероятно, он формирует следующую линию обороны и выступает сенсором бактерий, прошедших через слой длинных трансмембранных муцинов (Pelaseyed T. et al., 2014).

Муцины MUC1, MUC3, MUC12, MUC13 и MUC17 имеют во внеклеточной области домен SEA, автокаталитически расщепляющийся во время укладки гликопротеина. Образовавшиеся в результате расщепления две части молекулы удерживаются вместе за счет сильных нековалентных связей между четырьмя β -складчатыми слоями (2 в заякоренной части муцина, 2 во внешней). Предполагается, что такое строение молекул позволяет защитить апикальную

мембрану от механического повреждения, т.к. сила, необходимая для разрыва нековалентных связей SEA-домена ниже, чем сила, необходимая для разрыва плазматической мембраны (Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C., 2013).

Трансмембранные муцины содержат ряд сигнальных и регуляторных доменов. Во внеклеточной области муцинов MUC3, MUC4, MUC12, MUC13 и MUC17 содержатся EGF-подобные домены. Показано, что MUC4 посредством своего EGF-подобного домена принимает участие в сигнальных путях, регулирующих пролиферацию, миграцию и дифференцировку клеток. Для EGF-подобного домена MUC3 показано антиапоптотическое действие, а для MUC17 – подавление апоптоза и стимуляция миграции (Jonckheere N. et al., 2013). Цитоплазматические хвосты муцинов MUC3, MUC12 и MUC17 взаимодействуют с различными PDZ-белками, которые являются регуляторами апикальной организации и трансмембранного транспорта (Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C., 2013). Цитоплазматическая область MUC1 вовлечена во множество сигнальных путей: взаимодействует с Src киназами, проапоптотической киназой ABL, скэффолдовым белком GRB2 (Growth factor Receptor Bound protein 2), вызывающим активацию MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) пути, белками теплового шока HSP70 и HSP90, β -катенином и другими (Jonckheere N. et al., 2013).

При ЯК наблюдаются значительные изменения продукции трансмембранных муцинов. По данным иммуногистохимического исследования у больных ЯК уровень экспрессии *MUC1* в толстой кишке возрастает. При тяжелом ЯК выявлено усиление экспрессии мРНК *MUC1* в зоне крипт-абсцессов (Longman R.J. et al., 2006). У пациентов с ЯК обнаружены циркулирующие анти-MUC1 антитела (Longman R.J. et al., 2006). *MUC1* экспрессируется в эпителиальных выстилках многих органов, его физиологическая роль в толстой кишке до конца неясна. Показано, что проявления ДСН-индуцированного колита у *Muc1*-дефицитных мышей менее выражены, чем у дикого типа (Petersson J. et al., 2011).

По данным R.J. Longman et al. (2006) экспрессия гена *MUC3* при ЯК не изменяется. Однако А.Э. Дорофеев, И.В. Василенко и О.А. Рассохина (2013) с

помощью иммуногистохимического метода выявили снижение экспрессии *MUC3* у больных ЯК, а при тяжелом течении заболевания - отсутствие *MUC3* в бокаловидных клетках.

По данным R.J. Longman et al. (2006) экспрессия гена *MUC4* в ободочной кишке при ЯК не изменяется, а результаты С. Moehle et al. (2006) и А.Э. Дорофеева и соавт. (2013) указывают на ее снижение.

Экспрессия гена *MUC12* в толстой кишке у пациентов с ЯК статистически значимо снижается даже в неповрежденных участках СО (Moehle C. et al., 2006).

Относительно изменения экспрессии *MUC13* и *MUC17* в ободочной кишке человека при ЯК данных мало, и они противоречивы даже в рамках одного исследования. Так в работе С. Moehle et al. (2006) в СО толстой кишки у больных ЯК методом *micro-array* выявлено снижение уровней мРНК *MUC13* и *MUC17*, а методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени – их повышение. Senapati et al. (2010) иммуногистохимическим методом продемонстрировали значительное снижение экспрессии *MUC17* на поверхности и в криптах СО толстой кишки.

Данные относительно уровня *MUC20* при ЯК также неоднозначны: согласно исследованию методом *micro-array* экспрессия этого гена в ободочной кишке снижается, а согласно ПЦР в режиме реального времени – не изменяется (Moehle C. et al., 2006). J.Yamamoto-Furusho et al. (2014) выявили у больных с обострением ЯК снижение экспрессии генов *MUC16* и *MUC20* и уменьшение продукции соответствующих гликопротеинов, в период ремиссии – их повышение.

Данные относительно экспрессии при ЯК муцинов *MUC14*, *MUC15*, *MUC21* и *MUC22* в литературе отсутствуют.

Таким образом, трансмембранные муцины вносят существенный вклад в барьерные свойства эпителиальной выстилки и выполняют сенсорную роль. Изменения продукции трансмембранных муцинов имеют важное значение в патогенезе ЯК. Литературные данные по изучению мембрано-ассоциированных муцинов при ЯК противоречивы и фрагментарны.

Эпителиальные клетки ободочной кишки

СО толстой кишки выстлана однослойным столбчатым эпителием. Все эпителиальные клетки образуются из стволовых клеток, расположенных на дне крипт. Стволовые клетки дают начало прогениторным клеткам, которые, продвигаясь вверх по крипте, делятся и дифференцируются. На ранних этапах дифференцировки с помощью сигнального пути Notch разделяются 2 линии клеток: всасывающие и секреторные. Первая линия в дальнейшем дифференцируется в каемчатые колоноциты, вторая – в бокаловидные, ЭЭК и недостаточно хорошо изученные щеточные (tuft) клетки. Кроме того, выделяют еще два типа дифференцированных клеток кишки: М-клетки и «чашевидные» (cup) клетки, пути их дифференцировки еще неясны (Noah T.K., Donahue V., Shroyer N.F., 2011; Treuting P.M. et al., 2012). Время обновления эпителия толстой кишки составляет около 6 суток для каемчатых колоноцитов и бокаловидных клеток и около 4 недель для ЭЭК. Эпителиальные клетки, достигшие поверхности СО, вступают в апоптоз и десквамируются (Ross M.H., Pawlina W., 2006).

Стволовые клетки – мелкие цилиндрической формы со слабо развитой цитоплазмой и гладкими латеральными мембранами клетки, располагающиеся в глубине крипт. Из стволовых эпителиальных клеток происходят все эпителиоциты желудочно-кишечного тракта (Ross M.H., Pawlina W., 2006). Количество стволовых клеток точно неизвестно, по разным версиям их в каждой крипте от 1 до 6 (Bach S.P., Renahan A.G., Potten C.S., 2000).

Бескаемчатые колоноциты – цилиндрические клетки с базально расположенным ядром. Это недифференцированные клетки крипт, обладающие высокой митотической активностью. Содержат отдельные секреторные вакуоли с муцином. В верхней части крипт при дифференцировке в каемчатые колоноциты теряют секреторные вакуоли и приобретают щеточную каемку (Хэм А., Кормак Д., 1983; Ross M.H. Pawlina W., 2006).

Каемчатые колоноциты – высокие цилиндрические клетки с базально расположенным ядром, на апикальной поверхности которых локализовано множество плотно расположенных микроворсинок, увеличивающих

всасывающую поверхность кишки в 30–40 раз. Это преобладающий тип клеток ободочной кишки. Их микроворсинки покрыты гликокаликсом. Гликокаликс, микроворсинки и апикальная мембрана вместе образуют исчерченную каемку. Каемчатые колоноциты осуществляют всасывание продуктов гидролиза питательных веществ, воды и разнообразных ионов (Хэм А., Кормак Д., 1983; Ross M.H., Pawlina W., 2006; Noah T.K., Donahue B., Shroyer N.F., 2011). У больных ЯК при ультраструктурном исследовании наблюдается дезорганизация всасывающих клеток и повреждения микроворсинок (Myllärniemi H., Nickels J., 1980). При обострении ЯК показано значительное уменьшение всасывания ионов натрия и воды в толстой кишке (Barkas F. et al., 2013).

Бокаловидные клетки – клетки, имеющие форму бокала, суженные у основания, где находится ядро, с округлой широкой апикальной частью, заполненной секреторными везикулами. В ободочной кишке бокаловидных клеток примерно в 4 раза меньше, чем каемчатых колоноцитов. В апикальной части накапливаются гранулы муциногена, который при секреции связывает воду и образует слизь. Слизь, секретируемая бокаловидными клетками, увлажняет поверхность СО, способствует продвижению химуса, участвует в процессах пристеночного пищеварения, а также является первой линией защиты организма от эндогенных и экзогенных раздражителей, препятствует прикреплению и инвазии микроорганизмов (Хэм А., Кормак Д., 1983; Ross M.H., Pawlina W., 2006; Kim Y.S., Ho S.B., 2010; Noah T.K., Donahue B., Shroyer N.F., 2011). При ЯК у человека в толстой кишке показано снижение числа бокаловидных клеток, нарушения гликозилирования и сульфатирования муцинов (Парфенов А.И., 2012; Van Klinken B.J. et al., 1999; Hoebler C. et al., 2006; Kim Y.S., Ho S.B., 2010).

ЭЭК – клетки с узкой апикальной частью и широкой базальной частью, в которой локализованы секреторные гранулы. Они составляют около 1% эпителиальных клеток ободочной кишки. В ответ на стимулы из внешней и внутренней среды организма ЭЭК выделяют биогенные амины и пептидные гормоны, реализуя широкий диапазон биологических реакций. При ЯК у человека показано увеличение числа ЭЭК в толстой кишке (Gledhill A. et al., 1986; El-Salhy

M. et al., 1997; Rybakova M.G., Botina A.V., Solov'eva O.I. 2005). Основными типами ЭЭК толстой кишки являются EC-, L- и D-клетки. (Gunawardene A.R., Corfe B.M., Staton C.A., 2011; Noah T.K., Donahue B., Shroyer N.F., 2011).

Энтерохромоаффинные (EC) клетки - наиболее распространенный тип ЭЭК в желудочно-кишечном тракте. В проксимальном отделе толстой кишки они составляют более 70% всех ЭЭК. В дистальном направлении в толстой кишке их число остается примерно постоянным, но доля снижается (в прямой кишке они составляют 40%) за счет увеличения числа ЭЭК других типов. EC-клетки секретируют серотонин. Серотонин – является основным нейромедиатором в центральной нервной системе, в пищеварительной системе он стимулирует перистальтику и ускоряет транзит содержимого кишечника. Кроме того показано участие серотонина в регуляции иммунных реакций. Рецепторы к этому гормону выявлены на В- и Т-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках. Введение серотонина мышам на фоне потребления ДСН усугубляет течение острого ДСН-колита, а подавление продукции серотонина наоборот снижает тяжесть течения колита (Gunawardene A.R., Corfe B.M., Staton C.A., 2011; Noah T.K., Donahue B., Shroyer N.F., 2011; Manocha M, Khan W.I. 2012; Chen M. et al., 2016). Относительно изменения числа EC-клеток при ЯК литературные данные противоречивы: M.D. Coates et al. (2004) выявили снижение их числа и продукции серотонина, а M. El-Salhy et al. (1997) – повышение.

L-клетки – вторые по численности ЭЭК толстой кишки. Их количество увеличивается в дистальном направлении, и в прямой кишке они составляют примерно 14% ЭЭК. Их секреторными продуктами являются энтероглюкагоны (глюкагоноподобные пептиды 1 (GLP-1) и 2 (GLP-2), глицентин и оксинтомодулин) и пептид YY. GLP-1 стимулирует выработку инсулина в ответ на поглощение глюкозы и ингибирует секрецию желудочного сока. GLP-2 и глицентин стимулируют пролиферацию эпителия. Оксинтомодулин замедляет опорожнение желудка. Пептид YY подавляет опорожнение желудка и перистальтику кишечника, ингибирует секрецию желудочного сока и функцию экзокринных клеток поджелудочной железы, подавляет аппетит, стимулирует

пролиферацию эпителия СО (Gunawardene A.R., Corfe B.M., Staton C.A., 2011). При воспалительных заболеваниях кишечника в L-клетках толстой кишки снижается продукция пептида YY, а продукция энтерогликокагонов либо повышается, либо не изменяется (El-Salhy M. et al., 2013).

D-клетки встречаются на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, в толстой кишке они составляют 3-5% ЭЭК. Их основной секреторный продукт – соматостатин – гормон, подавляющий экзокринную функцию и секрецию всех гормонов желудочно-кишечного тракта. Также показано, что соматостатин участвует в регуляции иммунных реакций: он ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов Т-лимфоцитами и ЭКК. При воспалительных заболеваниях кишечника у человека показано снижение числа D-клеток и уровня соматостатина в крови (Gunawardene A.R., Corfe B.M., Staton C.A., 2011).

M-клетки (Мембранные или Микроскладчатые клетки) – клетки, расположенные в участках эпителиальной выстилки, покрывающих лимфоидные фолликулы в СПСО. Их базолатеральная мембрана образует глубокие карманоподобные углубления, в которых располагаются дендритные клетки, макрофаги, Т- и В-лимфоциты. Апикальная мембрана образует широкие микроскладки, покрытые тонким слоем гликокаликса. М-клетки захватывают просветные антигены и микроорганизмы и переносят их к подлежащим иммунным клеткам. (Ярилин, 2010; Ross M.H., Pawlina W., 2006). При ЯК увеличивается число лимфоидных узелков и М-клеток (Bennett K.M. et al., 2016). Помимо М-клеток, отбор просветных проб осуществляют субэпителиальные мононуклеарные фагоциты через трансэпителиальные дендриты. Также способность к транцитозу просветных антигенов показана для бокаловидных клеток тонкой кишки (Peterson L.W., Artis D., 2014).

Щеточные (хохолковые) Tuft клетки – редкий малоизученный тип ЭКК. На их апикальной поверхности расположены длинные микроворсинки, пучки актиновых филаментов которых уходят глубоко в апикальную цитоплазму. Предполагается, что данные клетки являются хеморецепторными (Noah T.K., Donahue B., Shroyer N.F., 2011).

Суп клетки – еще менее изученный редкий тип ЭКК. Они располагаются преимущественно в подвздошной кишке. Клетки со светлой цитоплазмой и короткими регулярными микроворсинками, образующими чашеобразные впадины в поверхности эпителиальной выстилки. Функция их неизвестна (Fujimura Y., Iida M., 2001).

Таким образом, все ЭКК происходят из стволовых эпителиальных клеток, расположенных в дне крипт. Основными типами дифференцированных ЭКК являются всасывающие колоноциты, бокаловидные и ЭЭК клетки, в популяции последних преобладают секретирующие серотонин ЕС-клетки. По литературным данным при ЯК нарушается целостность эпителиальной выстилки, уменьшается всасывание ионов и воды, снижается число бокаловидных клеток и изменяется число ЭЭК. Однако данные об изменении числа ЕС-клеток при ЯК противоречивы. Ультраструктурные изменения ЭКК при ЯК изучены недостаточно. Цитофизиология бокаловидных клеток при ЯК практически не описана.

Межклеточные контакты в эпителиальном пласте

ЭКК соединены между собой комплексом специальных межклеточных соединений: десмосомами, адгезивными соединениями и плотными контактами (Groschwitz K.R., Hogan S.P., 2009).

Адгезивные контакты и десмосомы входят в группу заякоривающих соединений. Они состоят из белков 2 типов: первые – трансмембранные «линкерные» белки, вторые – внутриклеточные белки, заякоряющие мембранные элементы на компоненты цитоскелета. Основная их функция в эпителии – поддержание целостности эпителиального пласта. Адгезивные контакты заякорены за актиновые филаменты, десмосомы – за промежуточные.

Адгезивные контакты могут формировать точечные соединения, бляшки или ленты. Последние характерны для однослойных эпителиев. Лента адгезии опоясывает весь периметр эпителиальной клетки ниже плотного соединения. Плазматические мембраны соседних клеток в этой зоне удалены друг от друга на расстояние 25-30 нм, между ними видна плотная зона соединения линкерных

белков, представленных в эпителии E-кадгеринами. Эпителиальный (E) –кадгерин – это гликопротеин с 1 трансмембранным доменом, его внеклеточный домен образует гомотипные Ca^{2+} -зависимые соединения с кадгеринами соседних клеток, а внутриклеточный содержит катенин-связывающий домен. α - и β -катенины прикрепляют цитоплазматический домен E-кадгерина к актиновому цитоскелету клетки. β -катенин, помимо формирования адгезивных контактов, выполняет в клетке еще и важную сигнальную функцию, являясь ключевым белком Wnt-сигнального пути. Адгезивные контакты не только механически соединяют соседние клетки, но также участвуют в поддержании клеточной полярности, регуляции миграции и пролиферации. (Groschwitz K.R., Hogan S.P., 2009). При ЯК показано снижение содержания E-кадгерина и β -катенина в эпителии толстой кишки, что указывает на повреждение межклеточных соединений. Кроме того, при ЯК повышается продукция NF- κ B (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – транскрипционного фактора Wnt-сигнального, что вносит вклад в развитие воспалительного процесса (Zhang C. et al., 2015).

Десмосомы – межклеточные соединения, имеющие форму бляшек, в межклеточном пространстве в области десмосом виден плотный слой линкерных гликопротеинов, представленных десмоглеинами и десмоколлинами, которые сцепляют клетки друг с другом. Внутриклеточные домены линкерных белков связаны с рядом адаптерных и каркасных белков (плакоглобин, плакофилин, десмоплакин и др.), которые заякоревывают десмосомы за промежуточные филаменты цитоскелета (Delva E., Tucker D.K., Kowalczyk A.P., 2009). Литературные данные об изменении десмосом ЭКК при ЯК отсутствуют.

Для барьерной функции кишечника наиболее важными являются плотные контакты – соединения, опоясывающие апикальную часть клеток. Они формируют зону максимального сближения латеральных мембран соседних эпителиальных клеток. При ультраструктурном исследовании в этой области часто видна трехслойность мембраны: два внешних липидных слоя обеих мембран как бы сливаются в один общий. Плотные контакты образованы пересекающимися цепочками трансмембранных белков, взаимодействующих с

белками соседней клетки и образующих сеть точечных соединений мембран. Трансмембранные белки плотных контактов представлены окклюдинами, клаудинами, JAM (Junctional Adhesion Molecules) и трицеллюлином. Со стороны цитоплазмы трансмембранные белки соединены с сигнальными, адаптерными и каркасными белками, такими как ZO (Zona Occludens) -1,-2,-3 и цингулин, и через них соединены с актиновыми филаментами цитоскелета. Трансмембранные и цитоплазматические белки плотных контактов содержат ряд сигнальных последовательностей, участвующих в путях регуляции пролиферации, поляризации и дифференцировки эпителиальных клеток. Плотные контакты не проницаемы для макромолекул и могут селективно пропускать определенные ионы, в зависимости от состава клаудинов. Таким образом, плотные контакты - главные регуляторы парацеллюлярного транспорта в эпителиальной выстилке кишечника (Groschwitz K.R., Hogan S.P., 2009)

Основными структурными компонентами плотных контактов являются клаудины. На данный момент описано 27 клаудинов (Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014). В толстой кишке человека и мыши показана экспрессия клаудинов 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 18 (Lu Z. et al., 2013; Günzel D, Yu AS., 2013). Клаудины одной клетки гомо- и гетерофильно взаимодействуют с клаудинами соседней клетки, формируя межклеточные соединения с разной проницаемостью для ионов. По этому признаку клаудины разделяют на «запирающие» – препятствующие транспорту ионов через плотный контакт, и «порообразующие» – образующие каналы для анионов или катионов. Однако на данный момент лишь немногие клаудины однозначно классифицированы как «порообразующие» (клаудины 2, 10b и 15 формируют поры для катионов, клаудины 10A и 17 – для анионов). Некоторые клаудины образуют поры только при гетерофильном взаимодействии, например клаудины 4 и 8. Есть данные о том, что в толстой кишке клаудин 4 является «запирающим» (Günzel D, Yu AS., 2013).

При ЯК наблюдаются значительные изменения плотных контактов. Н. Schmitz et al. (1999) методом замораживания-скалывания показали, что у больных ЯК по сравнению с нормой значительно снижена толщина плотных контактов и

снижено количество горизонтально ориентированных «лент» трансмембранных белков (Schmitz H. et al., 1999). При обострении ЯК показано повышение продукции клаудина 2 и снижение клаудинов 1, 4 и 7 (Oshima T., Miwa H., Joh T., 2008; Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014). Также уменьшается экспрессия окклюдина и трицеллюлина (Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014).

Таким образом, ЭКК соединены между собой комплексом межклеточных контактов. Наиболее важны для барьерной функции эпителия плотные контакты, основными структурными компонентами которых являются трансмембранные белки клаудины. В зависимости от типов клаудинов, входящих в состав плотных контактов, их проницаемость изменяется. При обострении ЯК показано повышение экспрессии «порообразующего» клаудина 2 и снижение экспрессии «запирающих» клаудинов 1, 4 и 7.

Роль эпителиального барьера толстой кишки в регуляции иммунных реакций

ЭКК вносят значительный вклад в поддержание толерантности к комменсальной микрофлоре и пищевым антигенам и в развитие иммунного ответа на патогены. Они продуцируют муцины, механически препятствующие адгезии и инвазии микроорганизмов, ряд антимикробных пептидов, контролирующих рост микробиоты, транспортируют из СПСО в просвет кишки секреторный иммуноглобулин IgA, переносят из просвета кишки к иммунным клеткам антигены и бактерии. Помимо этого, ЭКК экспрессируют ряд рецепторов PRR (Pattern-Recognition Receptors), распознающих PAMP, продуцируют цитокины и могут выступать в роли непрофессиональных антигенпредставляющих клеток.

PRR – эволюционно древние компоненты иммунной системы. Они представляют собой трансмембранные и внутриклеточные белки, способные специфически связываться с PAMP – группой эволюционно консервативных молекул, характерных для патогенов, но отсутствующих в организме-хозяине. PRR позволяют распознавать все возможные типы патогенов (вирусы, бактерии,

грибы, простейшие, паразиты) и представлены у всех многоклеточных, включая растения (Brubaker S.W. et al., 2015).

Выделяют 5 основных семейств PRR: Toll-подобные рецепторы (TLR), NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RLR), лектиновые рецепторы С-типа (CLR) и AIM2-подобные рецепторы (ALR). TLR и CLR рецепторы расположены на поверхности клетки или в эндоцитозных везикулах. Эти рецепторы активируются микробными антигенами, расположенными во внеклеточном пространстве и внутри эндосом. NLR, RLR и ALR рецепторы локализованы в цитоплазме и распознают внутриклеточные патогены. Связываясь с PAMP, PRR активируют сигнальные пути, приводящие к развитию защитной реакции на патоген (Brubaker S.W. et al., 2015).

TLR являются основной и наиболее изученной группой PRR. Помимо PAMP, TLR могут распознавать молекулярные структуры, характерные для комменсальных микроорганизмов - CAMP (Commensal-Associated Molecular Patterns) и некоторые эндогенные молекулы «опасности» – DAMP (Danger-Associated Molecular Patterns) (McClure R., Massari P., 2014). Активация TLR, как правило, приводит к запуску NF-κB сигнального пути, экспрессии генов цитокинов и хемокинов и развитию воспалительной реакции. В ЭКК у человека показана экспрессия генов *TLR1-TLR10* и продукция белков TLR2-TLR5 и TLR9 (McClure R., Massari P., 2014). Эпителиальная выстилка кишечника контактирует с огромным количеством комменсальных микроорганизмов, поэтому существуют специальные механизмы для предотвращения воспалительного ответа на нормальную микрофлору. Показана дифференциальная чувствительность ЭКК к апикальной и базолатеральной стимуляции многими лигандами TLR. Например, лиганды TLR9 при воздействии на базолатеральную мембрану ЭКК вызывают каноническую активацию NF-κB сигнального пути, а при воздействии на апикальную мембрану – тормозный эффект благодаря стабилизации IκB (Inhibitor of NF-κB) (Peterson L.W., Artis D., 2014). TLR4, распознающий липополисахарид и обычно локализуемой на плазматической мембране эпителиальных клеток, в норме на ЭКК либо не экспрессируется, либо располагается на мембранах

эндосом. TLR5, связывающий флагелин, выявляется на базолатеральной, но не апикальной мембране, таким образом запуская воспалительные реакции только на микроорганизмы, преодолевшие кишечный эпителиальный барьер (McClure R., Massari P., 2014). При ЯК показано значительное повышение экспрессии *TLR2* и *TLR4* в СО кишки (Roda G. et al., 2010).

Концепция субклеточной сегрегации и поляризованного распределения TLR была перенесена на регуляцию других PRR-путей. Показано, что белок FRMPD2 (FERM and PDZ domain-containing protein 2), который является положительным регулятором NOD2-опосредованной активации NF-κB в ответ на распознавание мурамилдипептида, в ЭКК также отвечает за базолатеральную локализацию NOD2. У многих пациентов с болезнью Крона выявлены мутации в домене NOD2, отвечающим за связывание с FRMPD2. Такие NOD2-мутантные белки неспособны взаимодействовать с FRMPD2 и реагировать на стимуляцию лигандами NOD (Peterson L.W., Artis D., 2014).

ЭКК секретируют многочисленные иммунорегуляторные молекулы. В ответ на сигналы от комменсальных микроорганизмов, ЭКК продуцируют TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), TGFβ, ретиноевую кислоту, которые способствуют образованию дендритных клеток и макрофагов с толерагенными свойствами, вызывающих дифференцировку *FOXP3*⁺ (forkhead box P3) регуляторных Т-клеток и поступление их в СО кишки, способствующих выживанию и локальной экспансии ранее праймированных регуляторных Т-клеток и дифференцировке IgA-продуцирующих В-клеток. Образование IgA стимулируется продуцируемыми ЭКК молекулами APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) и BAFF (B cell-Activating Factor) (Peterson L.W., Artis D., 2014).

В норме ЭКК также конститутивно секретируют TGFα, IL-1, IL-10, IL-15, IL-18, поддерживающие приток иммунных клеток в кишку, пролиферацию и дифференцировку эпителия (Oswald I.P., 2006).

При бактериальных инфекциях значительно возрастает продукция цитокинов IL-1α и β, IL-6, IL-8, TNF-α, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), CCL20 (C-C motif chemokine Ligand 20) и GM-CSF в ЭКК (Oswald I.P., 2006).

TSLP и IL-25, продуцируемые ЭКК, участвуют в развитии Th2-типа иммунного ответа при заражении гельминтами (Peterson L.W., Artis D., 2014).

Показано, что ЭКК могут выступать в роли непрофессиональных антигенпрезентирующих клеток. ЭКК экспрессируют неклассические молекулы МНС класса Ib и костимулирующие молекулы семейства B7. ЭКК преимущественно активируют CD8⁺ регуляторные Т-клетки. В этом процессе ключевую роль играет уникальный комплекс, образованный GP-180 (гликопротеином семейства SEA) и CD1d (неклассические молекулы МНС), которые связываются соответственно с CD8 и Т-клеточным рецептором (TCR) на поверхности Т-лимфоцитов. При ЯК наблюдается нарушение экспрессии GP-180, а ЭКК преимущественно стимулируют пролиферацию CD4⁺ Т-клеток и секрецию интерферона γ (IFN- γ) через МНСII (Major Histocompatibility Complex II) (Roda G. et al., 2010).

Не только ЭКК регулируют микрофлору и иммунную систему кишечника, но и они влияют на ЭКК. У мышей, лишенных микрофлоры, снижена толщина слоя слизи, но она восстанавливается после обработки лигандами TLR.. Экспрессия многих антимикробных пептидов усиливается или зависит от присутствия комменсальных бактерий. Транспорт IgA через эпителиальный барьер регулируется, в частности, экспрессией pIgR на базолатеральной мембране ЭКК, которая возрастает при активации NF- κ B сигнального пути. Активация TLR2 приводит к повышению продукции TFF3. Активные формы кислорода, продуцируемые в ответ на комменсальные или патогенные бактерии, способствуют образованию ЭКК фокальных контактов и их миграции в зону повреждения. Провоспалительные цитокины, такие как IFN γ и TNF α , приводят к реорганизации множества белков плотных контактов, включая ZO-1, окклюдин, клаудины 1 и 4 и другие, и повышению проницаемости плотных контактов. TGF β напротив, поддерживает целостность плотных контактов, а также способствует восстановлению эпителия при повреждении (Peterson L.W., Artis D., 2014; Roda G. et al., 2010).

К эпителиальному барьеру ободочной кишки можно отнести иммунные клетки, расположенные между или под ЭКК и контактирующие с ними. К таким клеткам относятся межэпителиальные лимфоциты (МЭЛ) и $CD11c^{low}F4/80^{+}CX_3CR1^{hi}$ резидентные макрофаги кишечника.

МЭЛ – активированные не рециркулирующие Т-лимфоциты, расположенные в эпителиальном пласте и непосредственно контактирующие с ЭКК. МЭЛ гетерогенны и включают лимфоциты с Т-клеточными рецепторами $\gamma\delta$ и $\alpha\beta$. В толстой кишке последние преобладают. Большинство МЭЛ содержат цитотоксические гранулы и могут продуцировать эффекторные цитокины, такие как $IFN\gamma$, IL-2, IL-4, IL-17. Для МЭЛ характерна экспрессия рецепторов натуральных киллеров (NK). Большинство МЭЛ экспрессируют гомодимеры $CD8\alpha\alpha$. Выделяют натуральные и индуцированные МЭЛ. Индуцированные МЭЛ развиваются из обычных $CD4^{+}$ или $CD8\alpha\beta^{+}TCR\alpha\beta^{+}$ Т-клеток, приобретают активированный фенотип в ответ на презентацию антигена и являются клетками памяти, участвуют в развитии иммунного ответа на патогены. Натуральные МЭЛ представляют собой $TCR\gamma\delta^{+}$ или $TCR\alpha\beta^{+}$ Т-клетки как $CD8\alpha\alpha^{+}$ или $CD8\alpha\alpha^{-}$, но не экспрессирующие ни $CD4$, ни $CD8\alpha\beta$, они реализуют противовоспалительный ответ, поддерживают толерантность к кишечным антигенам, обладают иммунорегуляторными свойствами и поддерживают гомеостаз эпителия (Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D., 2011).

$CD11c^{low}F4/80^{+}CX_3CR1^{hi}$ резидентные макрофаги кишечника располагаются субэпителиально и контактируют с ЭКК. Они выступают в роли активных фагоцитов, поглощают патогенные и комменсальные бактерии, преодолевающие эпителиальный барьер. Эти макрофаги экспрессируют белки плотных контактов, что позволяет им образовывать трансэпителиальные дендриты, которые проникают в просвет кишечника и захватывают антигены (Peterson L.W., Artis D., 2014).

Таким образом, ЭКК могут распознавать широкий спектр патоген-ассоциированных молекул и регулировать иммунные реакции в СО толстой кишки за счет секреции иммунорегуляторных молекул и контактных

взаимодействий с лимфоцитами, макрофагами и дендритными клетками. В норме ЭКК поддерживают толерантность к комменсальной микрофлоре и пищевым антигенам, а при попадании в кишечник патогенов – запускают воспалительный ответ. Нарушение баланса между толерогенными и провоспалительными сигналами в ЭКК может вносить значительный вклад в патогенез ЯК.

2.5. Экспериментальные модели язвенного колита

ЯК является актуальной проблемой современной медицины. Однако исследование этиологии и патогенеза ЯК на клиническом материале затруднено так как, трудно установить начальные стадии заболевания и точную длительность его течения, а наличие сопутствующей патологии и применение лекарственных препаратов изменяют клиническую картину заболевания. Исследования биопсийного материала позволяют получить информацию только об изменениях СО из нескольких локальных зон толстой кишки. В свою очередь, операционный материал представлен лишь наиболее тяжелыми случаями течения заболевания и его поздними сроками. Кроме того, разработка новых лекарственных средств и методов лечения ЯК требует проведения доклинических испытаний на экспериментальных моделях.

Поэтому для исследования механизмов развития ЯК и доклинической оценки лекарственных средств разработан ряд экспериментальных моделей на животных: химические (тринитробензолсульфоновая кислота, ДСН, оксазолон, уксусная кислота, нестероидные противовоспалительные препараты, каррагинан, пептидогликан-полисахарид), трансгенные (*Gai*^{-/-}, *IL-2*^{-/-}, *IL-10*^{-/-}, *Keratin 8*^{-/-}, *TCR α* ^{-/-}), адаптивного переноса (CD4⁺ T cells/SCID, CD3 ϵ (Tg ϵ 26)), спонтанные (СЗН/HeBir) (Boismenu R., Chen Y., 2000; Randhawa P.K. et al., 2014). Эти модели не отражают всей сложности механизмов заболевания у человека, но они предоставляют широкий спектр возможностей для изучения патогенеза ЯК и оценки различных терапевтических воздействий (Perše M, Cerar A., 2012).

Колит, индуцированный декстрансульфатом натрия

Наиболее широко используемой и адекватной ЯК человека является модель колита, индуцированного ДСН (Randhawa P.K. et al., 2014). Впервые модель ДСН-колита была воспроизведена на хомячках и описана в 1985 году Т. Ohkusa et al. В 1990 году I. Okayasu et al. для воспроизведения модели ЯК использовали мышей. В настоящее время только в электронной базе данных PubMed размещено более 2,5 тысяч статей с упоминанием о ДСН-индуцированном колите. Модель технически легко выполнима и характеризуется высокой воспроизводимостью. Добавление мышам в питьевую воду 1-5% ДСН в течение 4-9 дней приводит к индукции острого язвенно-воспалительного процесса, ограничивающегося толстой кишкой. Развитие патологического процесса проявляется диареей с кровью, снижением массы тела и ухудшением общего состояния животных (Randhawa P.K. et al., 2014; Kiesler P., Fuss I.J., Strober W., 2015).

Модель ДСН-индуцированного колита имеет ряд преимуществ по сравнению с другими моделями. Она легко воспроизводима, а начало, длительность и тяжесть воспалительного процесса хорошо контролируемы. Изменяя концентрацию, продолжительность и число курсов потребления мышами ДСН можно моделировать острый, хронический и рецидивирующий колит. При хроническом ДСН-колите в толстой кишке часто наблюдается дисплазия эпителия, характерная для ЯК человека, что позволяет использовать данную модель для изучения процессов канцерогенеза, ассоциированного с колитом. Кроме того, исследование действия традиционных лекарственных средств, используемых в терапии ЯК, на модели ДСН-колита у мышей показывает, что результаты, полученные на модели ДСН-колита, можно экстраполировать на человека (Perše M., Cerar A., 2012).

Несмотря на то, что модель ДСН-индуцированного колита достаточно длительно и широко используется, полностью стандартизовать ее не удастся (Табл. 2). У мышей наблюдается различная реакция на ДСН, что связано как с характеристиками самого ДСН (концентрация, молекулярный вес, производитель и партия) и продолжительностью его воздействия, так и с генетическими

особенностями животных (линия, пол) и микробиомом кишечника (Perše M., Cerar A., 2012).

Таблица 2

Литературные данные по схемам воспроизведения экспериментального ДСН-индуцированного острого и хронического колита.

Источник	Вид, линия, пол	Острый колит	Хронический колит
Ahmad R. et al., 2014	мыши B6D2F1/J самцы	4% ДСН 7 дней	3 цикла: 2,5% ДСН 5 дней, 16 дней вода
Alex P. et al., 2009	мыши C57BL/6 самцы и самки	3% ДСН 7 дней	4 цикла: 3% ДСН 7 дней, 10 дней вода
Arai Y. et al., 1998	мыши	3% ДСН 5 или 11 дней	
Bertrand P.P. et al., 2010	мыши CD-1 самцы	5% ДСН 5 дней, 2-3 дня вода	
Chen M. et al., 2016	мыши C57BL/6J (B6) самцы	1% или 2,5% ДСН 5 дней	
Dharmani P., Leung P., Chadee K., 2011	крысы Sprague–Dawley самцы	5% ДСН 9 дней	
Egger B. et al., 2000	мыши BALB/c	2,5%, 5% или 7,5% ДСН 7 дней	
Erickson N.A. et al., 2016	мыши	2.5 % ДСН 7 дней, 2 дня вода	
Hall L.J. et al., 2011	мыши C57BL/6, самки	3% ДСН 6 дней, 0-6 дней вода	3% ДСН 6 дней, 20 дней вода
Hans W. et al., 2000	мыши BALB/c, самки	5% ДСН 7 дней, 1 день вода	4 цикла: 5% ДСН 7 дней, 10 дней вода; затем 36 дней вода
Hoebler C. et al., 2006	мыши BALB/c	1% ДСН 5 дней	1 % ДСН 5 дней, 0,15% ДСН 28 дней
Issa C.M. et al., 2014	мыши C57BL/6	2,5% ДСН 8 дней	
Johansson M.E. et al., 2010	мыши C57BL/6 самцы	3% ДСН 0,5-5 дней	
Kim D.J. et al., 2012	мыши C57BL/6 самцы	2% ДСН 7-8 дней	
Kim J.J. et al., 2012	мыши C57BL/6 самцы	5% ДСН 5 дней	
Laroui H., et al., 2012	мыши C57BL/6 самки	3% ДСН 7-8 дней	
Mahler M. et al., 1998	мыши C3H/HeJ, C3H/HeJBir, C57BL/6J, DBA/2J, NOD/LtJ и др.	3,5% ДСН 5 дней, 16 дней вода	
Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. 2005	мыши C57BL/6 и BALB/c	C57BL/6: 3% ДСН 5 дней; BALB/c: 5% ДСН 5 дней	C57BL/6: 3% ДСН 5 дней, 21-28 дней вода

Источник	Вид, линия, пол	Острый колит	Хронический колит
Melgar S., et al., 2008	мыши C57BL/6	3% ДСН 5 дней, 7-9 дней вода	3% ДСН 5 дней, 20-31 день вода
Mennigen R. et al., 2009	мыши BALB/c самки	3,5% ДСН 7 дней	
Naito Y. et al., 2004	мыши самки	4,5% ДСН 8 дней	
Okayasu I. et al., 1990	Мыши BALB/c и CBA/J самки	5-10% ДСН 8-9 дней	3-5 циклов: 7 дней 5% ДСН, 10 дней вода
Oshima S, Fujimura M, Fukimiya M. 1999	крысы		1,5% ДСН 30 дней
Petersson J. et al., 2011	мыши C57BL/6 и NMRI	3% ДСН 5-8 дней	
Savendahl L, et al., 1997	мыши C57b × SJL	5% ДСН 5 дней	
Shajib M.S. et al., 2013	мыши BALB/c самцы	5% ДСН 5 дней	
Stevceva L. et al., 2001 (a)	мыши BALB/C и C57Bl6	2,5% и 5% ДСН 8 дней	
Stevceva L. et al., 2001 (b)	мыши 129SV × C57BL/6	2,5% и 5% ДСН 8 дней	
Sund M. et al., 2005	мыши C57BL/6 самки	3,5% 3-6 дней	
Tobisawa Y. et al., 2010	мыши C57BL/6	5% ДСН 7 дней	
Yuan B. et al., 2015	крысы Sprague-Dawley	4% ДСН 7 дней	

ДСН – сульфатированный полисахарид, молекулярная масса которого варьирует в пределах от 5 до 1400 кДа. Для индукции колита обычно используется ДСН с молекулярной массой около 40 кДа, он вызывает «диффузное» воспаление в медиальном и дистальном отделах толстой кишки. ДСН с молекулярной массой 5 кДа приводит к развитию более легкого очагового воспаления в слепой и проксимальном отделе ободочной кишки, а при использовании ДСН с молекулярной массой 500 кДа никаких альтеративных и воспалительных изменений в толстой кишке не наблюдается (Kitajima S., Takuma S., Morimoto M., 2000). Канцерогенной активностью обладает ДСН с молекулярной массой 54 кДа, в то время как ДСН с большей (520 кДа) или меньшей (9,5 кДа) такого эффекта не оказывает (Hirono I. et al., 1983).

Количественная оценка морфологических проявлений ДСН-колита у девяти линий мышей с использованием стандартизированного протокола (3,5% ДСН молекулярной массой 36-45 кДа (TdV Consultancy, Uppsala, Sweden) в течение 5 дней) показала, что мыши C3H/HeJ, C3H/HeJBir наиболее склонны к развитию ДСН-индуцированного воспаления как в ободочной, так и в слепой кишке, а линия NON/LtJ – устойчива к воздействию ДСН. У мышей C57BL/6J развивается тяжелое воспаление в дистальном отделе ободочной кишки, при этом в слепой оно слабо выражено (Mähler M. et al., 1998). В ряде работ для исследования ДСН-колита использовали мышей BALB/c, у которых также развивается тяжелый колит в основном в дистальном отделе толстой кишки. Мыши BALB/c менее восприимчивы к ДСН, чем IQ1/Jic и C57BL/6 (Perše M, Cerar A., 2012). Также разные линии мышей отличаются по склонности к хронизации воспалительного процесса. Обычно для индукции хронического колита используют 4-5 курсов потребления раствора ДСН продолжительностью около недели, которые чередуются с питьевой водой в течение 10-14 дней (Randhawa P.K. et al., 2014). Однако, как показали S. Melgar, A. Karlsson, и E. Michaelsson (2005), для индукции хронического воспаления у мышей линии C57BL/6 достаточно одного 5-ти дневного курса потребления раствора ДСН вместо питьевой воды. На 33 сут. эксперимента у животных этой линии в СО толстой кишки наблюдается выраженная воспалительная инфильтрация преимущественно из плазмоцитов и лимфоцитов, нарушение гистоархитектоники крипт, язвы, фиброз СО. При аналогичном режиме воздействия у мышей BALB/c к 33 дню эксперимента СО восстанавливается. Кроме того выявлены половые различия: при одинаковом режиме воздействия ДСН к 5 дню эксперимента у самцов мышей C57BL/6J развивается более тяжелый колит, чем у самок этой же линии (Mähler M. et al., 1998).

В патогенезе ДСН-колита у мышей важную роль играет микрофлора ободочной кишки и ее метаболиты. Еще I. Okayasu et al. (1990) заметили увеличение числа энтеробактерий, *Bacteroidaceae* и *Clostridium Spp.* в просвете ободочной кишки у мышей с ДСН-индуцированным колитом. Позже было

показано, что применение антибиотиков снижает выраженность язвенно-воспалительного процесса в СО толстой кишки в острую фазу ДСН-колита (Hans W. et al., 2000). Важная роль кишечной микрофлоры подтверждается исследованиями на ряде линий мышей, лишенных кишечной микрофлоры, у которых при воздействии ДСН патологических изменений в толстой кишке не наблюдается, но при заселении их кишечника нормальной микрофлорой ДСН-колит успешно воспроизводится (Perše M, Cerar A., 2012). Как показали T. Hudcovic et al. (2001), у мышей BALB/c и SCID, выращенных в стерильных условиях, после 7 дней воздействия 2,5% раствора ДСН выявляется лишь слабо выраженное воспаление СО, тогда как у мышей этих же линий при стандартных условиях содержания в ответ на аналогичное воздействие развивается тяжелый острый колит.

Первые изменения в СО толстой кишки у мышей при ДСН-колите отмечаются уже на 1 сут. эксперимента: увеличивается экспрессия провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1, IFN- γ , ИЛ-10 и ИЛ-12 и в эпителиальных клетках исчезает белок плотных контактов ZO-1. На 3-и сут. воздействия ДСН в СО толстой кишки отмечается укорочение крипт и воспалительная инфильтрация СПСО. В этот же срок эксперимента значительно увеличивается проницаемость эпителиального барьера (Perše M, Cerar A., 2012). На 5-9 сут. эксперимента развивается острый колит, при котором в СО толстой кишки выявляются нарушения целостности эпителиальной выстилки, эрозии, язвы, воспалительная инфильтрация преимущественно из макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов, уменьшение количества слизи, встречаются криптиты и крипт-абсцессы. Через несколько недель интервального потребления ДСН (а в случае проведения эксперимента на мышах линии C57BL/6 – через 2-3 недели после окончания одного пятидневного курса потребления ДСН) патологический процесс хронизируется: нарушается архитектура крипт, увеличивается расстояние между их основаниями и мышечной пластинкой, изменяется состав воспалительного инфильтрата – он состоит преимущественно

из плазмоцитов и лимфоцитов (Stevceva L. et al., 2001; Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. 2005; Perše M, Cerar A., 2012).

Исследование распределения ДСН с молекулярной массой 40 кДа в органах и тканях показало, что через сутки после начала его потребления небольшое количество этого вещества выявляется в макрофагах стенки толстой кишки, брыжеечных лимфатических узлов и печени. На 3-и сут. эксперимента ДСН определяется в небольшом количестве в макрофагах селезенки, а на 7-е сут. - в почках и единичных макрофагах стенки тонкой кишки. Через 8 недель после завершения пятидневного курса потребления ДСН, он все еще сохраняется в клетках Купфера печени. При хроническом ДСН-колите, значительное количество ДСН выявляется в макрофагах селезенки. В других органах и тканях – головном мозге, легких, сердце, вилочковой железе, желудке и двенадцатиперстной кишке – ДСН не обнаруживается. ДСН выводится из организма, в основном, с мочой и калом. ДСН устойчив к деградации ферментами микрофлоры кишечника и воздействию различных условий pH (4.0-7.5) (Perše M, Cerar A., 2012).

Механизм действия ДСН до сих пор до конца неясен. Широко распространено мнение, что ДСН оказывает токсическое воздействие на эпителиальные клетки ободочной кишки и вызывает нарушение целостности эпителиального барьера, в результате чего увеличивается проницаемость СО толстой кишки, что приводит к проникновению крупных молекул, таких как ДСН, а также просветных антигенов и микроорганизмов в СО и развитию воспалительного ответа (Perše M, Cerar A., 2012) .

В 2012 году Н. Laroui et al. были опубликованы результаты детального исследования инициальных механизмов действия ДСН. ДСН представляет собой сульфатированный полимер глюкозы. Для выявления «активного начала» этой молекулы изучили действие ее компонентов на толстую кишку мышей по отдельности и в сочетании: декстрана, декстрана с сульфатом натрия, сульфата натрия, глюкозы и глюкозы с сульфатом натрия (концентрации растворов всех веществ были такими же, как концентрации соответствующих частей молекулы

ДСН с молекулярной массой 42 кДа, содержащей 17% по весу сульфатных групп в 3%-ом растворе). После 8 дней потребления растворов ДСН-ассоциированных молекул в толстой кишке у мышей воспалительных изменений не было выявлено, тогда как при аналогичном курсе потребления раствора ДСН у животных развивался острый колит. Однако при колоноскопии у животных, потреблявших ДСН-ассоциированные молекулы, наблюдались кровоизлияния в СО толстой кишки, что, вероятно, связано с повышением осмолярности кишечного содержимого. Действительно кал мышей, получавших ДСН и ДСН-ассоциированные молекулы, имеет в 5-7 раз более высокую осмолярность, чем кал контрольных животных.

Взаимодействие декстрана с эпителием изучали на культуре клеток Caco2-VBE, являющейся моделью эпителиальной выстилки толстой кишки. Добавление 3% ДСН в культуральную среду при рН 7,4 (нейтральный рН) и рН 6,2 (соответствует рН содержимого толстой кишки) не влияет на электрическое сопротивление монослоя клеток (измерение проводили в течение 3 сут). ДСН-ассоциированные молекулы также не влияют на электрическое сопротивление клеток. Эти данные косвенно указывают на отсутствие рецепторов к ДСН на поверхности эпителиальных клеток толстой кишки и отсутствие прямого цитотоксического эффекта.

Очевидно, для индукции колита, необходимы какие-то дополнительные факторы (Laroui H. et al., 2012). Авторы предположили, что ДСН приобретает способность индуцировать колит после модификации бактериальными ферментами. Однако, ДСН, проинкубированный с *Escherichia coli* в течение двух суток, также не вызывает изменения электрического сопротивления монослоя клеток. Известно, что преобладание жирной пищи в рационе повышает риск развития ЯК у человека (Legaki E, Gazouli M., 2016). Как показали исследования, потребление мышами 3% раствора ДСН на фоне диеты с высоким содержанием жиров (60% жиров) приводит к значительно более тяжелому течению колита, чем при питании стандартным кормом (<10% жиров). На основании этих данных предположили, что жирные кислоты являются тем самым недостающим

фактором, необходимым для индукции ДСН-колита. Действительно, добавление в культуральную среду к клеткам Caco2-BBE 3% ДСН с 10 мМ додеканоата (рН 6,2) приводит к быстрому значительному снижению сопротивления монослоя клеток (от 47,790 до 5,420 Ом) через 3 часа инкубации (Laroui H. et al., 2012).

Показано, что ДСН, смешанный с додеканоатом в присутствии кальция образует везикулы диаметром 262 нм (при концентрации додеканоата 10мМ) и 168 нм (при 1мМ). Вероятно, сульфогруппы ДСН формируют электростатические связи с жирными кислотами, в результате чего образуются везикулы, которые за счет гидрофобных доменов жирных кислот могут сливаться с мембранами клеток, обеспечивая проникновение декстрансульфата в цитоплазму клеток (Laroui H. et al., 2012). Для выяснения роли сульфогрупп в индукции колита, мышам на протяжении 8 дней через желудочный зонд вводили наночастицы, загруженные несультатированным декстраном. В результате у животных развился более тяжелый колит, чем при действии 3% раствора ДСН (Laroui H. et al., 2012). Можно сделать вывод, что активной частью молекулы ДСН, вызывающей развитие воспаления, является декстран, а сульфогруппы, очевидно, обеспечивают транспорт молекулы через плазматическую мембрану. Попав в клетку, ДСН, видимо, вызывает ее гибель, что приводит к нарушению эпителиального барьера и выбросу медиаторов воспаления.

Описанный механизм действия ДСН является не единственным. Показано муколитическое действие ДСН (Johansson M.E. et al., 2010). Кроме того, ДСН активно фагоцитируется макрофагами, которые затем продуцируют провоспалительные цитокины, активирующие Т-лимфоциты (Okayasu I. et al. 1990; Shintani N. et al. 1997; Stevceva L. et al., 2001). Также имеет значение разрушение ДСН под действием ферментов энтеробактерий с высвобождением сульфогрупп, которые в свою очередь разлагаются сульфатредуцирующими бактериями до сероводорода. Сероводород подавляет бактериальную ферментацию, приводящую к образованию короткоцепочечных жирных кислот, которые являются основным источником энергии для колоноцитов (Hudcovic T. et al., 2001).

Литературные данные об изменении эпителиального барьера и реакции иммунной системы в ободочной кишке у мышей при остром и хроническом ДСН-индуцированном колите будут подробно рассмотрены в главе «ОБСУЖДЕНИЕ», здесь приведем только краткую обобщающую таблицу (Табл. 3). Как видно из таблицы, многие вопросы в этой области еще не исследованы, а имеющиеся на данный момент сведения противоречивы.

Таблица 3

Суммированные литературные данные о нарушении эпителиального барьера и иммунных реакциях ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите.

Структуры	Острый ДСН-колит по сравнению с нормой	Хронический ДСН-колит по сравнению с нормой
Слизь	Толщина плотного слоя слизи ↓ Проницаемость для бактерий ↑↑ Экспрессия <i>Muc2</i> ↑/= Соотношение кислых и нейтральных муцинов – нет данных	Проницаемость для бактерий – нет данных Экспрессия <i>Muc2</i> = Соотношение кислых и нейтральных муцинов – нет данных
Гликокаликс	Экспрессия <i>Muc1</i> ↑ <i>Muc3</i> ↑/↓/= <i>Muc13</i> - нет данных	Экспрессия <i>Muc1</i> ↓ <i>Muc3</i> = <i>Muc13</i> - нет данных
Ультраструктурные изменения эпителиальных клеток	Нет данных	Нет данных
Целостность эпителиальной выстилки	Язвы, крипт-абсцессы Распространенность язв – нет данных	Реэпителизация Распространенность язв – нет данных
Состав эпителия	Число бокаловидных клеток ↓ Число ЭЭК ↑	Число бокаловидных клеток – нет данных Число ЭЭК ↑ (одна работа на крысах)
Плотные контакты	Экспрессия клаудина 2 ↑ Клаудина 4 ↓	Экспрессия клаудина 2 – нет данных Клаудина 4- нет данных

Структуры	Острый ДСН-колит по сравнению с нормой	Хронический ДСН-колит по сравнению с нормой
Воспалительная инфильтрация	Нейтрофилы, лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги Распространенность воспалительного процесса – нет данных	Плазмоциты, макрофаги, лимфоциты Распространенность воспалительного процесса – нет данных
Изменение продукции цитокинов в ободочной кишке	IL1 β , IL6, IL10 \uparrow IL4 = IL12p40, IL17, IFN γ \uparrow / \neq IL2, TGF β – данных нет или крайне мало	IL1 β , IL12p40, IL17, IFN γ \uparrow (только одна статья) IL2, IL4, IL6, IL10, TGF β – нет данных

\uparrow - растет, \downarrow - снижается, = - не изменяется

Таким образом, по клиническим и морфологическим параметрам ДСН-индуцированный колит у мышей является адекватной моделью ЯК человека. Кроме того, показано, что терапия, эффективная при ЯК у человека, оказывает сходный эффект при ДСН-колите у мышей, что позволяет использовать данную модель для разработки и оценки эффективности новых лекарственных средств. Модель ДСН-индуцированного колита технически легко выполняема, обладает высокой воспроизводимостью, не требует больших временных и материальных затрат. Важным является то, что использование этой модели позволяет воспроизводить острый и хронический колит разной тяжести и оценивать динамику развития воспалительного процесса. На модели ДСН-индуцированного колита ведется изучение нарушений эпителиального барьера и иммунных реакций ободочной кишки, однако полученные данные во многом противоречивы и фрагментарны.

Другие модели, используемые для изучения воспалительных заболеваний кишечника

ТНБС-колит. Не менее широко, чем ДСН, для индукции воспаления толстой кишки используется 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота (ТНБС). ТНБС приводит к воспалению кишечника, которое не является прямым следствием

воздействия этого химического вещества как такового. ТНБС вызывает развитие гиперчувствительности замедленного типа. Она модифицирует аутологичные и/или микробные белки ободочной кишки, в результате чего они приобретают иммуногенные свойства. Интравектальное введение ТНБС индуцирует развитие трансмурального колита, характеризующегося преимущественно активацией Th1-типа иммунного ответа, инфильтрацией СПСО CD4+ Т-клетками, нейтрофилами и макрофагами, а также развитием тяжелой диареи, снижением массы тела и выпадением прямой кишки. Данная модель воспаления толстой кишки по своим характеристикам ближе к болезни Крона, чем к ЯК (Randhawa P.K. et al., 2014; Kiesler P., Fuss I.J., Strober W., 2015).

Оксазолоновый колит. Оксазолон (4-этоксиметилен-2-фенил-2-оксазолин-5-он), как и ТНБС, может модифицировать белки, связываясь с ними, и ранее предполагалось, что он должен оказывать эффект, аналогичный ТНБС. Однако ректальное введение оксазолон, вызывает воспаление толстой кишки, которое заметно отличается от индуцируемого ТНБС и напоминает по многим характеристикам ЯК, а не болезнь Крона. В частности, введение разовой дозы оксазолон приводит к острому поверхностному воспалению СО в дистальном отделе толстой кишки, характеризующемуся инфильтрацией лимфоцитами и нейтрофилами, отеком СПСО и язвами. Данная модель по многим характеристикам соответствует ЯК, но она уступает ДСН-индуцированному колиту в легкости воспроизведения и, в связи с необходимостью ректального введения оксазолон, оказывающего сильное стрессорное воздействие на животных. Для индукции оксазолонового колита предварительно проводят сенсбилизацию подкожным введением вещества, после чего на 5-е и 7-е сут. ректально через зонд вводят спиртовой раствор оксазолон в просвет толстой кишки и, для обеспечения равномерного распределение раствора, животных около минуты удерживают в вертикальном положении. Для индукции хронического колита процедуру приходится повторять на протяжении нескольких дней (Randhawa P.K. et al., 2014; Kiesler P, Fuss IJ, Strober W., 2015).

Адоптивный перенос. Адоптивный перенос наивных CD4⁺ Т-клеток (CD4⁺ CD45RB^{high} Т-клетки) от здоровых мышей-доноров дикого типа сингенным иммунодефицитным реципиентам с недостатком Т- и В-лимфоцитов (линии SCID или *Rag1*^{-/-}) вызывает развитие тяжелого воспаления толстого кишечника через 5-10 недель после переноса. При этом, введение зрелых CD4⁺ CD45RB^{low} Т-клеток или совместный перенос наивных и зрелых Т-клеток мышам-реципиентам не вызывает развития колита. Этот феномен объясняется тем, что часть зрелых Т-лимфоцитов представлена регуляторными Т-клетками. В дистальном отделе толстой кишки у мышей с активным колитом выявляются трансмуральное воспаление, гиперплазия эпителиальных клеток, воспалительная инфильтрация, крипт-абсцессы и эрозии. У некоторых линий мышей (например, *Rag1*^{-/-}) в воспалительный процесс вовлекается также и тонкая кишка. Данная модель по ряду характеристик ближе к болезни Крона, чем к ЯК, к тому же она дорогостоящая и технически сложная для воспроизведения (Ostanin D.V. et al., 2009; Kiesler P., Fuss I.J., Strober W., 2015).

IL10-нокаутные мыши. Одна из самых ранних моделей воспалительных заболеваний кишечника – спонтанный колит у мышей с дефицитом IL-10. У животных, нокаутных по IL-10 (*IL10*^{-/-}) развивается воспаление всех отделов толстой кишки, характеризующееся инфильтрацией из лимфоцитов, макрофагов и нейтрофилов. Специфическая делеция гена IL-10 с помощью Cre-Lox рекомбинации во всех Т-клетках или только в *Foxp3*⁺ регуляторных Т-клетках также приводит к спонтанному колиту, что указывает на необходимость продуцируемого этими клетками IL-10 для поддержания кишечного гомеостаза. В настоящее время известно, что генетический полиморфизм в локусе гена IL-10 связан с повышенным риском развития у человека как ЯК, так и болезни Крона (Kiesler P., Fuss I.J., Strober W., 2015).

Таким образом, по сравнению с другими моделями, ДСН-индуцированный колит является наиболее адекватной, высоко воспроизводимой и технически легко выполнимой моделью ЯК.

2.6. Заключение к обзору литературы

Толстая кишка - терминальный отдел пищеварительной системы, где накапливаются непереваренные остатки пищи и обитает огромное количество комменсальных микроорганизмов. Эпителиальный барьер, состоящий из слоя слизи, гликокаликса и собственно эпителиальной выстилки, препятствует проникновению бактерий и токсических веществ во внутреннюю среду организма и развитию иммунного ответа на антигены пищи. Нарушение структуры и функции эпителиального барьера, вероятно, является одним из основных механизмов развития ЯК. ЯК – хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание кишечника. Его этиология и патогенез не ясны, в связи с чем существующие методы диагностики и лечения недостаточно эффективны. У больных ЯК наблюдаются нарушения различных звеньев эпителиального барьера толстой кишки: продукции и барьерных свойств слизи, строения гликокаликса, клеточного состава эпителиальной выстилки, строения плотных контактов. Однако, исследования на клиническом материале затруднены, поэтому для изучения механизмов развития ЯК был разработан ряд экспериментальных моделей. Наиболее адекватной, легко воспроизводимой и технически выполнимой моделью ЯК является ДСН-индуцированный колит. Он позволяет воспроизводить как острый, так и хронический колит разной степени тяжести с точно известным началом патологического процесса, что дает возможность исследовать как инициальные стадии, так и динамику развития и хронизацию колита. Однако результаты проведенных исследований эпителиального барьера ободочной кишки при ДСН-индуцированном колите противоречивы и фрагментарны. В связи с изложенным проблема исследования нарушений эпителиального барьера ободочной кишки на моделях ЯК остается актуальной.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Животные и дизайн эксперимента

Исследование проводили на 100 половозрелых самцах мышей линии C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая». Возраст мышей составлял 2-3 месяца, масса тела 21-29 г.

Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г.

При поступлении экспериментальных животных в виварий ФГБНУ «НИИ морфологии человека», животные были помещены на двухнедельный карантин. Мышей содержали в открытой системе при температуре 18-25°C при естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.n081.B00113, ГОСТ Р50258-92).

Животных делили на 3 группы: контрольную, «острый колит» и «хронический колит» (Табл. 4). Мышам из групп «острый колит» и «хронический колит» для индукции воспаления питьевую воду на 5 суток заменяли 1%-ым водным раствором ДСН молекулярной массой 40 кДа (Dextran sulfate sodium salt, Mr ~40,000, AppliChem, Германия). В день каждая мышь выпивала примерно 5 мл раствора, таким образом, суммарная доза ДСН за 5 дней индукции – 0,25 г на мышь. Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом на 7-е и 28-е сутки, соответственно. Мыши контрольной группы на протяжении всего эксперимента получали проточную питьевую воду (рис.1).

Таблица 4

Число животных контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом

Методы исследования		К	ОК	ХК
Исследование клинических и морфологических проявлений колита	Всего животных, из них	12	33	20
	Исследование клинических проявлений колита и выживаемости	0	33	20
	Оценка изменения массы тела	0	17	20
	Определение изменения длины ободочной кишки	12	14	10
	Гистологическое, гистохимическое, иммуногистохимическое исследование	10	8	7
ИФА и ПЦР в режиме реального времени		10	7	9
Ультроструктурное исследование		3	3	3
Всего использовано животных		25	43	32

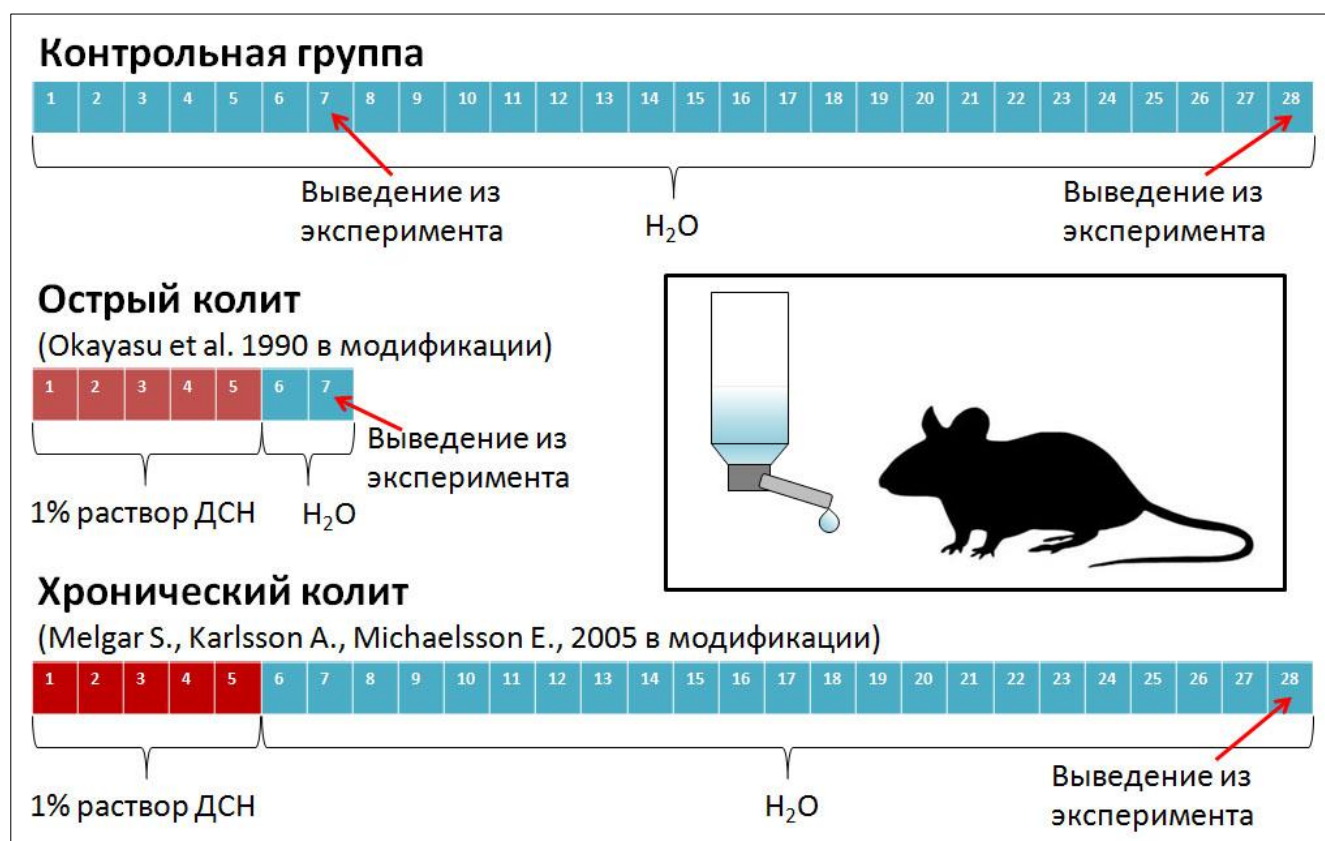


Рисунок 1. Схема эксперимента

3.2. Методы исследования

Оценка клинических проявлений колита и массометрия. Перед индукцией колита и при выведении из эксперимента животных взвешивали. В ходе эксперимента отслеживали характер стула у мышей, их двигательную активность и состояние шерстного покрова, отмечали гибель животных. При вскрытии измеряли длину ободочной кишки от илеоцекального угла до прямой кишки.

Гистологические методы. Для гистологического исследования ободочную кишку извлекали из брюшной полости, вскрывали по брыжейке, промывали фосфатно-солевым буфером (Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 0.01M, таблетки, БиолоТ, Россия), расправляли на миллипоровом фильтре, разделяли на 3 отдела (проксимальный, медиальный, дистальный) и помещали в фиксатор Буэна на сутки. После гистологической проводки в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, USA), кусочки кишки заключали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, USA), изготавливали продольные срезы толщиной 5-8 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, USA). Полученные препараты использовали для гистохимического и иммуногистохимического исследования и окрашивали гематоксилином и эозином.

Гистохимические методы. С помощью окраски трихромом по Массону выявляли фиброз стенки ободочной кишки (Sigma Diagnostics Accustain Trichrome Stain (Masson), Sigma-Aldrich, США). Для выявления в секреторных гранулах бокаловидных клеток высокосульфатированных и нейтральных муцинов проводили окраску альциановым синим pH 1.0 по Моури (Гистолайн, ООО «Элемент», Россия) и ШИК-реакцию (БиоВитрум, Россия) соответственно (Wulff S., 2004).

Иммуногистохимические методы. ЭЭК выявляли с помощью антител к хромогранину А (Rabbit polyclonal anti-ChromograninA antibody, ab15160, Abcam, Великобритания), в разведении 1:400.

Гистологические срезы депарафинизировали в трех сменах ксилола и спиртах нисходящей концентрации. Для демаскировки антигенов препараты кипятили 20 мин в цитратном буфере с 0,05% Tween20, pH=6.0. Охлаждали до комнатной температуры, отмывали в 2-х сменах PBS (pH 7.4, 0.01M, таблетки, БиолоТ, Россия). Эндогенную пероксидазу инактивировали 3% раствором перекиси водорода в течение 10 минут, отмывали в 2-х сменах PBS. Неспецифическую реакцию блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (20 мин). Первые антитела Rabbit polyclonal anti-ChromograninA antibody, ab15160, Abcam, Великобритания) разводили в буфере Antibody Diluent (S0809, Dako, Дания) 1:400 и наносили на срезы, помещенные во влажную камеру. Инкубировали в течение ночи при температуре +4°C. Отмывали в 2-х сменах PBS. В качестве вторых антител использовался коммерческий раствор синтетического полимера, сцепленного с пероксидазой хрена - Simple Stain Mouse MAX PO (R) (N-Histofine Universal Immuno-peroxidase polymer for mouse tissue Anti-Rabbit Redy-to-use, Nichirei Bioscience Inc., Япония), с которым срезы инкубировали в течение часа при комнатной температуре во влажной камере. Отмывали в 2-х сменах PBS. Связывание антител выявляли по реакции пероксидазы хрена с 3,3'-диаминобензидином с помощью набора N-Histofine DAB-2V (Nichirei Bioscience Inc., Япония) согласно приложенной инструкции. Докрашивали гематоксилином Майера, обезвоживали и заключали в канадский бальзам.

Морфометрические методы. Для оценки выраженности язвенно-воспалительного процесса, окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты трех отделов кишки мышей групп «острый колит» и «хронический колит» фотографировали на протяжении всей длины на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с объективом x10. Полученные фотографии каждого среза объединяли в панорамы в программе ImageScore (Leica Microsystems, Германия). На панорамных фотографиях с помощью этой же программы измеряли протяженность язв и воспалительного инфильтрата в базальной части СПСО и в ПО, длину мышечной пластинки. В программе

Microsoft Office Excel 2007 рассчитывали распространенность воспалительных изменений в процентах от длины мышечной пластинки.

Для оценки изменений клеточного состава инфильтрата на окрашенных гематоксилином и эозином продольно ориентированных срезах дистального отдела ободочной кишки на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с объективом x100 подсчитывали число нейтрофилов, плазмоцитов и лимфоцитов в СПСО и ПО, рассчитывали среднее число клеток на 1 мм длины среза.

Для оценки количества бокаловидных клеток, их размеров, объемной доли и содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов, на микроскопе AxioPlan 2 imaging (Carl Zeiss, Германия) с объективом x20 при одинаковых условиях освещения получали снимки гистологических препаратов трех отделов ободочной кишки, окрашенные альциановым синим и реактивом Шиффа после обработки йодной кислотой. Для съемки выбирали участки СО с продольно ориентированными криптами, при колите - без язв и эрозий, но с выраженными морфологическими признаками воспаления. Измерения проводили в программе PhotoM1.21 (freeware, разработчик А. Черниговский, 2000–2001, http://t_lambda.chat.ru/).

Количество бокаловидных клеток определяли как их число на крипту на фотографиях срезов, окрашенных альциановым синим. Размеры бокаловидных клеток оценивали по занимаемой ими площади на фотографиях срезов, окрашенных альциановым синим (50 клеток на каждой фотографии). Объемную долю бокаловидных клеток рассчитывали как процент от площади СПСО и эпителия, занимаемой окрашенными структурами на бинаризованных фотографиях срезов, окрашенных реактивом Шиффа после обработки йодной кислотой.

Содержание высокосульфатированных и нейтральных муцинов определяли по интенсивности окрашивания бокаловидных клеток альциановым синим и реактивом Шиффа после обработки йодной кислотой, соответственно. Интенсивность окрашивания рассчитывали как средний десятичный логарифм

отношения яркости фона к яркости точки объекта на фотографии. Интенсивность гистохимических реакций значительно варьировала даже в пределах контрольной группы, что связано с различиями в толщине срезов, времени фиксации и окраски. Для нивелирования этих различий, интенсивность окрашивания бокаловидных клеток нормировали по интенсивности окрашивания расположенных рядом участков соединительной ткани.

Для оценки числа ЭЭК, под микроскопом Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с объективом x20 на всем протяжении срезов ободочной кишки подсчитывали число хромогранин А-положительных клеток на крипту.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Ободочную кишку извлекали из брюшной полости, выделяли медиальный отдел, вскрывали его продольно, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), разделяли продольно на 2 части, одну часть помещали в 1 мл PBS при температуре 4°C. Далее ткань (около 70 мг) гомогенизировали (гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Нидерланды) 10 мин при 40Гц, центрифугировали (центрифуга-вортекс CM-70M, ELMi, Латвия) 15 мин при 9000 об/мин. Супернатант замораживали при -70°C и хранили не более 3 месяцев. Проводили определение концентрации интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 и интерферона γ (IFN γ) в гомогенате ободочной кишки методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирмы eBioscience (США) согласно приложенной инструкции. Концентрацию цитокинов нормировали на общее содержание белка в каждой пробе, определяемое УФ-методом с помощью спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Методом ПЦР после обратной транскрипции в режиме реального времени определяли уровень экспрессии мРНК цитокинов IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL10, IL12p40, IL17, IFN γ , TGF β , муцинов 1, 2, 3, 13, белков плотных контактов клаудинов 2 и 4 относительно уровня экспрессии мРНК β -актина.

Оставшуюся при подготовке к ИФА-исследованию вторую половину медиального отдела ободочной кишки помещали в 1 мл лизирующего раствора Trizol RNA Prep 100 (Isogene Lab.ltd, Россия). Ткань (около 70 мг)

гомогенизировали (гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Нидерланды) 5 мин при 40Гц, оставляли при комнатной температуре на 15-20 минут, центрифугировали (центрифуга-вортекс СМ-70М, ELMi, Латвия) 10 мин при 9000 об/мин, супернатант переносили в чистую микропробирку. Пробы замораживали и хранили при -70°C .

Пробы размораживали при комнатной температуре, забирали для исследования половину содержимого (500 мкл), добавляли в него по 100 мкл хлороформа, тщательно перемешивали и оставляли на 10 мин при комнатной температуре до разделения фаз. Пробирки центрифугировали при 16100 об./мин (Центрифуга 5415R, Eppendorf, Германия) 20 мин при 4°C . Верхнюю водную фазу аккуратно, не задевая интерфазу, переносили в чистую микропробирку.

К водной фазе добавляли по 250 мкл 100% изопропанола, тщательно перемешивали, помещали в холодильник -20°C на 15-20 мин. Центрифугировали при 16100 об./мин 20 мин при 4°C . Аккуратно, не нарушая осадок, убирали супернатант. К осадку добавляли 500 мкл 70% этанола на воде свободной от РНКаз (Ambion® Nuclease-Free Water not DEPC-treated, Thermo Fisher Scientific, США). Затем перемешивали и центрифугировали при 16100 об./мин 15 мин при 4°C . Промывку этанолом повторяли.

Осадок подсушивали в открытых пробирках при 37°C и растворяли в 50 мкл воды свободной от РНКаз, прогревали пробу при $+56^{\circ}\text{C}$ 10 мин. Замораживали и хранили при -70°C . Отбирали аликвоты для измерения концентрации РНК и оценки качества ее выделения.

Определение концентрации РНК и чистоты образца спектрофотометрическим методом. С помощью спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония) определяли оптическую плотность (OD) в пробах при 260, 280 и 230нм (максимумы поглощения нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов, соответственно). Концентрацию РНК рассчитывали по формуле $[\text{РНК мкг/мл}] = 40 * \text{OD}_{260}$. В среднем концентрация РНК в пробах была 0,4 мкг/мл. Загрязненность препаратов определяли по следующим критериям (Табл. 5):

Таблица 5

Определение наличия примесей в растворе РНК по соотношению оптической плотности раствора при длинах волн 260нм, 280нм и 230нм

Отношение оптических плотностей	Чистая РНК	Загрязнение
OD_{260}/OD_{280}	≥ 2.8	<1,7 фенол, белки и др.
OD_{260}/OD_{230}	$\geq 1.8 - 2.2$	<1,5 полисахариды и др.

В наших пробах отношение 260нм/280нм в среднем равнялось 1,9, отношение 260нм/230нм – 1,83, что говорит о достаточной чистоте выделения РНК.

Определение качества выделения РНК методом электрофореза в агарозном геле. Готовили камеру для электрофореза с 1% агарозным гелем на ТАЕ-буфере с добавлением бромистого этидия. Раскапывали по лункам образцы РНК, смешанные с буфером для нанесения (Loading buffer for DNA Ladders, НПО "СибЭнзим", Россия). Подключали электроды к блоку питания, установив силу тока 80 мА, и ждали 30 минут. Переносили гель в трансиллюминатор и фотографировали в лучах ультрафиолета. При хорошем выделении четко видны полосы 18S и 28S РНК (1-3 kb), и они одинаковой интенсивности (рис.2).

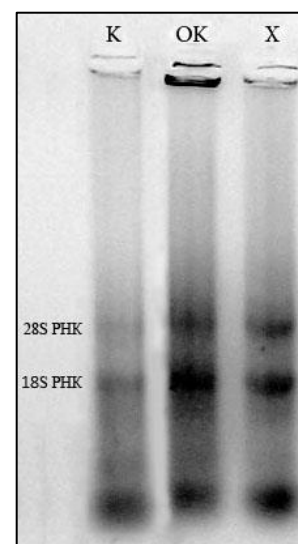


Рисунок 2.
Электрофорез

В наших пробах были видны полосы 16S и 28S рибосомальной РНК, что говорит о достаточной сохранности РНК. Однако во многих пробах остались яркие полосы в лунках – геномная ДНК, для ее устранения пробы обработали ДНКазой.

Обработка ДНКазой. Для разрушения геномной ДНК использовали набор «DNase I, Amplification Grade» (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США) согласно приложенной инструкции. В реакцию брали по 1 мкг РНК из пробы, общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Останавливали реакцию

добавлением 1 мкл 50мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и прогревали пробу 10 мин при 65°C.

Обратная транскрипция. Для получения кДНК по матрице РНК использовали набор «Реверта-L» (ИнтерЛабСервис, Россия), согласно приложенной инструкции. По 10 мкл реакционной смеси «Реверта-L» добавляли к 10 мкл раствора РНК, обработанной ДНКазой (итоговая концентрация РНК 0,05 мкг/мкл), ставили пробирки в термостат 37°C на 30 мин. Разводили в 2 раза ДНК-буфером. Полученные библиотеки кДНК замораживали и хранили при -70°C.

ПЦР проводили на Real-Time амплификаторе qTOWER 2.2 (Analytik Jena, Германия). Пробы для ПЦР готовили с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно приложенной инструкции. В пробу добавляли 1 мкл раствора кДНК (примерно 0,05 мкг кДНК) и по 1 пмоль прямого и обратного праймеров (для β-актина – по 4 пмоль). Доводили объем смеси до 25 мкл. Режим амплификации представлен в таблице 6. Использовали праймеры, синтезированные фирмой Синтол (Россия) (табл.7)

Пороговый уровень флуоресценции определяли автоматически. Относительную концентрацию мРНК искомым генов рассчитывали по формуле: $[A]_0/[B]_0 = E^{\Delta C(T)}$, где $[A]_0$ – начальная концентрация мРНК искомого гена в ПЦР-смеси, $[B]_0$ – начальная концентрация мРНК β-актина в ПЦР-смеси, E – эффективность реакции (принимали равной 1,97), $\Delta C(T)$ – разность пороговых циклов β-актина и искомого гена.

Таблица 6

Режим амплификации кДНК

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации	Детекция
Предварительная денатурация	1	95°C	5 мин	-
Денатурация	40	95°C	20 сек	-
Отжиг		Tm* (54-69°C)	15 сек	-
Элонгация		72°C	10 сек	Детекция SYBR Green

*Tm – оптимальная температура отжига праймеров

Праймеры

Ген	Праймеры	Длина праймера	Tm	GC%	Длина продукта
β -actin	AGAAGCAATGCTGCTACCTTCCC AAGTCCCTCACCCSTCCCAAAAG	23 22	63.26 61.90	52.17 54.55	99
<i>Muc1</i>	TGGATTGTTTCTGCAGATTTT CCTGACCTGAACTTGATGCT	21 20	54.25 57.51	33.33 50.00	66
<i>Muc2</i>	CCCAGAAGGGACTGTGTATG TGCAGACACACTGCTCACA	20 19	57.30 59.48	55.00 52.63	134
<i>Muc3</i>	TGTTCACTTTACTGTGTTTCAA TTGCATGTCTCCTCAGGATT	23 20	57.11 56.52	34.78 45.00	86
<i>Muc13</i>	TCGTCATGTGTGAAAGGAACG CTTTGTAGCATCACGCATTGC	21 21	58.87 58.82	47.62 47.62	228
<i>Cldn2</i>	ATGTCCTCGCTGGCTTGTATTATCTCT GCCATGAAGATTCCAAGCAACTG	27 23	63.72 60.68	44.44 47.83	159
<i>Cldn4</i>	TCGTGGGTGCTCTGGGGATGCTTC GCGGATGACGTTGTGAGCGGTC	24 22	68.60 66.38	62.50 63.64	170
IL1 β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG GATCCACACTCTCCAGCTGCA	25 21	58.44 62.11	40.00 57.14	152
IL2	CCTGAGCAGGATGGAGAATTACA TCCAGAACATGCCGCAGAG	23 19	59.86 60.08	47.83 57.89	141
IL4	ACAGGAGAAGGGACGCCAT GAAGCCCTACAGACGAGCTCA	19 21	60.61 61.56	57.89 57.14	95
IL6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	23 24	62.01 59.31	56.52 37.50	141
IL10	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	20 20	60.39 64.25	55.00 60.00	191
IL12 p40	GGAAGCACGGCAGCAGAATA AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	20 24	60.74 59.77	55.00 45.83	180
IL17	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA AGCTTTCCCTCCGCATTGA	19 19	60.99 59.31	63.16 52.63	142
TGF β	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG GGTTCATGTCATGGATGGTGC	22 21	62.21 59.59	54.55 52.38	170
INF γ	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	24 21	60.02 58.90	41.67 47.62	92

Метод электронной микроскопии. Для оценки ультраструктурных изменений эпителиального барьера ободочной кишки у трех животных из каждой группы забирали два небольшой фрагмент кишки на границе дистального и медиального отделов. Один фрагмент от каждого животного для исследования ультраструктуры клеток фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде на фосфатном буфере (0,1М, pH 7,3) в течение 2 часов, двукратно промывали в 0,1М фосфатном буфере, фиксировали 1% OsO₄ в течение 1 часа при +4°C. Для выявления гликокаликса со вторым фрагментом кишки проводили модифицированное

контрастирование рутениевым красным по Монису и Замбрано (Гайер Г., 1974). Далее проводили обезвоживание в спиртах восходящей концентрации и заливку в смесь эпона с аралдитом. Изготавливали полутонкие срезы, которые деэпонизировали в насыщенном растворе гидроксида натрия, окрашивали метиленовым синим и исследовали под световым микроскопом. Выбирали интересующую область и затачивали эпоновый блок. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме 8800 Ultratome III (LKB, Швеция) с помощью стеклянных ножей, срезы монтировали на сетки для электронной микроскопии. Срезы контрастировали в растворе Рейнольдса в течение 7 минут. Исследование образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе TEM Libra120 (Carl Zeiss, Германия).

Статистические методы. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США), руководствуясь методическим пособием по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований (Мастицкий С. Э., 2009) и статьей А.М. Гржибовского, С.В. Иванова и М.А. Горбатовой «Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии» (2016). Так как экспериментальные группы были небольшие (не более 10 животных в группе в каждом исследовании) и исследуемые параметры, как правило, были распределены ненормально (по результатам теста χ^2), использовали методы непараметрической статистики. Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи, для сравнения групп использовали дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса, «multiple comparisons of mean ranks for all groups» и U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Клинические проявления экспериментального острого и хронического колита

С 3-их по 7-ые сут. эксперимента у 17 из 52 половозрелых самцов мышей C57BL/6, потреблявших 1% раствор ДСН в течение 5-и сут., наблюдалась диарея, у 8 животных - с примесью крови. У 2 из 19 животных диарея возобновлялась в конце второй недели эксперимента (рис.3). С 9-ых по 22-ые сут. в группе мышей с хроническим колитом погибла треть животных (6 из 20) (рис.4).

На 7-ые сут. эксперимента (острый колит) отмечалось снижение двигательной активности животных и болевая поза, шерстный покров был взъерошенным и тусклым (рис.5 Б). На 28 сут. мыши внешне не отличались от контрольных: их шерстный покров был гладким, чистым, лоснящимся, животные были активны, проявляли исследовательское поведение (рис.5 А, В)

Показатель массы тела у мышей на 7-ые сут. эксперимента (острый колит) был статистически значимо снижен по сравнению с исходным, а на 28-ые сутки (хронический колит) он соответствовал контрольным значениям (табл.8).

Показатель длины ободочной кишки у мышей на 7-ые сутки эксперимента был статистически значимо ниже, чем у животных контрольной группы и с хроническим колитом. На 28 сутки показатель длины ободочной кишки соответствовал контрольным значениям (табл.9, рис. 6).

Таким образом, у самцов мышей C57BL/6, потреблявших 1% ДСН в течение 5-и сут., с 3-их по 7-ые сут. эксперимента развивалась диарея с примесью крови. На 7-ые сут. эксперимента отмечалось снижение двигательной активности животных, болевая поза, шерстный покров был взъерошенный и тусклый; снижались показатели массы тела и длины ободочной кишки. С 9-ых по 22-ые сут. эксперимента отмечалась гибель 30% животных. На 28-ые сут. показатели массы тела, длины ободочной кишки, характер стула и состояние шерстного покрова нормализовались.

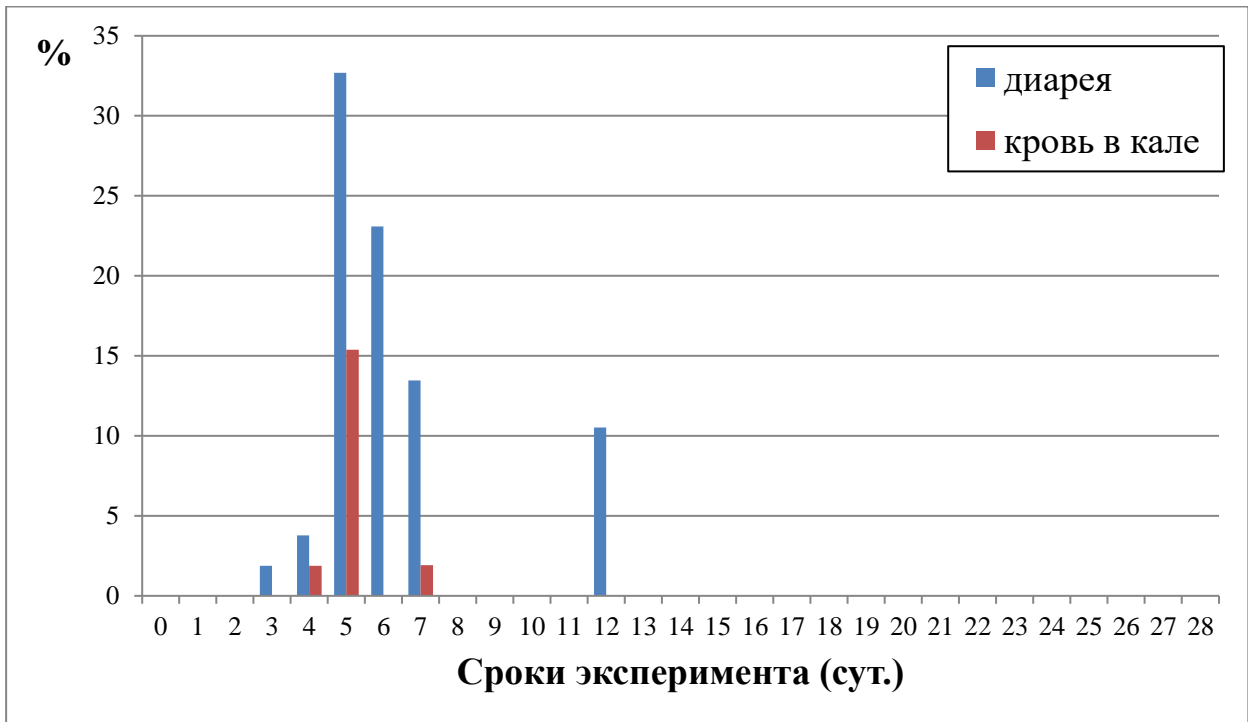


Рисунок 3. Относительное количество животных, потреблявших 1% ДСН в течение 5 дней, с диареей и наличием крови в кале (1-7-ые сут. n=53, далее n=20)

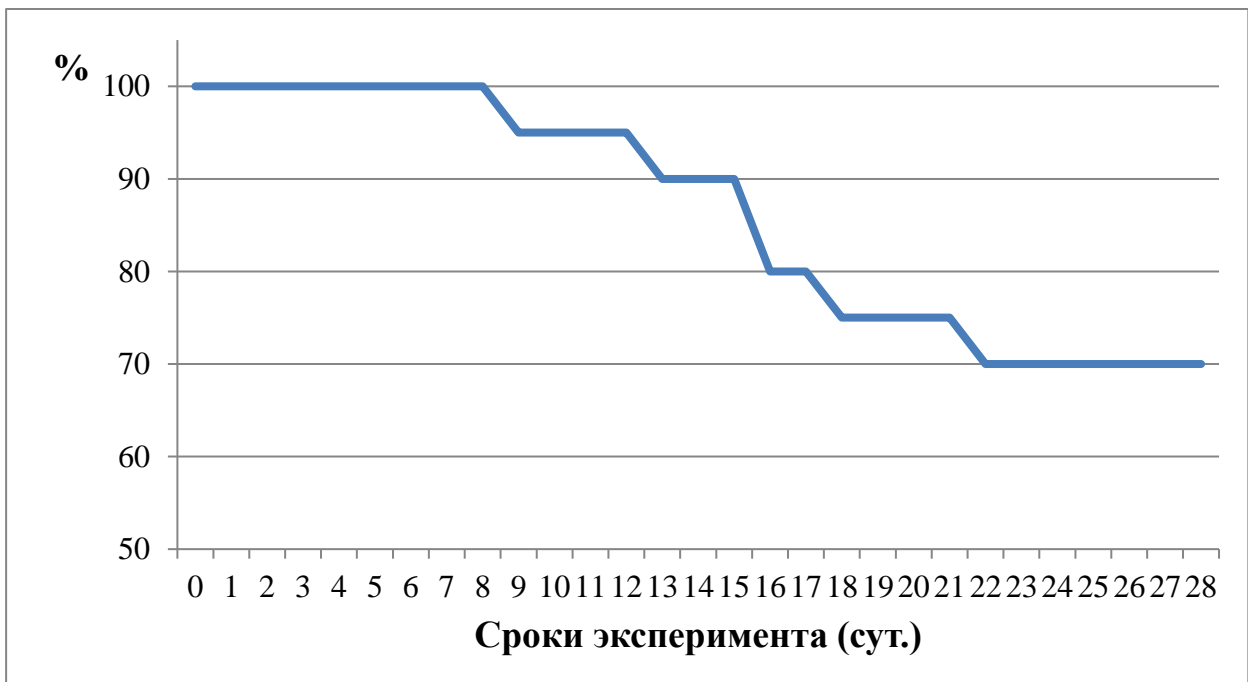


Рисунок 4. Динамика выживаемости самцов мышей C57Bl6, потреблявших 1% ДСН в течение 5 сут. (n=20)



Рисунок 5. Мыши самцы C57Bl/6 контрольной группы (А), на 7-ые (Б – острый колит) и 28-ые (В – хронический колит) сут. эксперимента. А, В – мыши с гладким, чистым, лоснящимся шерстным покровом проявляют исследовательское поведение; Б – мышь в болевой позе с тусклым взъерошенным шерстным покровом

Таблица 8

Изменения массы тела у животных при остром и хроническом колите,
Me (0,25; 0,75)

Экспериментальная группа, число животных	Масса тела (г)		Достигнутая значимость различий (U-критерий Манна-Уитни)
	До начала эксперимента	В конце эксперимента	
Острый колит, n=17	26,0 (25,1; 26,5)	22,5 (21,6; 23,5)	0,000004
Хронический колит, n=20	25,0 (24,15; 26)	26,5 (24,3; 26,8)	0,265

Таблица 9

Длина ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы, при остром и хроническом колите, Me (0,25; 0,75)

Экспериментальная группа, число животных	Длина ободочной кишки (см)	Достигнутая значимость различий (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks from all group)		
		Контрольная группа	Острый колит	Хронический колит
Контрольная группа, n=12	6,0 (5,25; 6,0)	-	0,000148	0,733519
Острый колит, n=14	4,25 (4,0; 4,5)	0,000148	-	0,023957
Хронический колит, n=10	5,5 (5,0; 6,0)	0,733519	0,023957	-

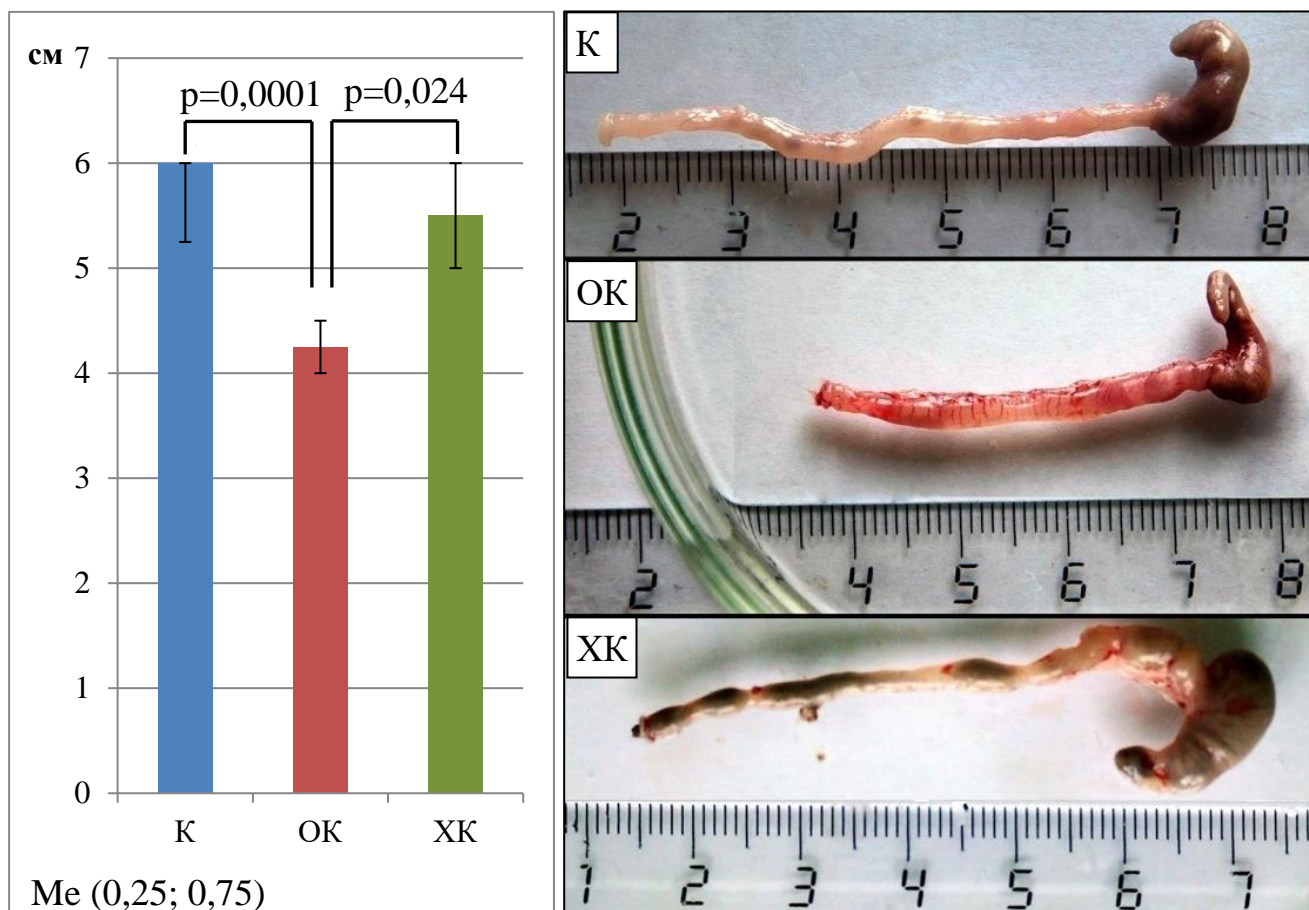


Рисунок 6. Длина ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите. p – достигнутая значимость различий между группами. К – ободочная кишка длиной 5,5 см без содержимого, серозная оболочка белесоватая гладкая блестящая, просвет узкий; ОК – ободочная кишка длиной 4 см, без содержимого, серозная оболочка розово-красная, видны полнокровные сосуды, просвет кишки расширен; ХК – ободочная кишка длиной 5 см, серозная оболочка белесоватая гладкая блестящая, просвет кишки узкий, видны расширенные темные участки, заполненные формирующимися каловыми массами.

4.2. Морфологическая характеристика стенки ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

При гистологическом исследовании продольных срезов проксимального, медиального и дистального отделов ободочной кишки у **мышей контрольной группы** эпителиальная выстилка сохранена на всем протяжении СО. Крипты были глубокие, их просветы узкие (рис. 7 А-В). СПСО и ПО содержали небольшое количество равномерно распределенных клеточных элементов – фиброцитов, фибробластов, лимфоцитов и единичных гистиоцитов (рис. 7 Г, Д). Мышечная пластинка представлена 1-2 слоями гладкомышечных клеток. Лимфатические сосуды ПО были с узким щелевидным просветом. В СО, преимущественно в СПСО, выявлялись лимфоидные узелки, часть их была со светлыми центрами (рис. 7 Е). Мышечная оболочка состояла из кольцевого и продольного слоев гладкомышечных клеток. В ПО и мышечной оболочке выявлялись четко очерченные ганглии соответственно подслизистого и межмышечного нервных сплетений. Серозная оболочка была представлена тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и выстлана плоским мезотелием.

На 7-ые сут. эксперимента морфологическая картина ободочной кишки была мозаичной (рис.8). Наиболее выраженные патологические изменения в ободочной кишке были представлены обширными, распространяющимися до мышечной пластинки язвами (рис.8 А, рис.9 А, Г). На поверхности язв выявлялись скопления нейтрофилов и лейкоцитов, дно язв было представлено грануляционной тканью с большим количеством фибробластов, фиброцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов. На поверхности краев язв выявлялись признаки реэпителизации: грануляционная ткань была выстлана однослойным кубическим эпителием. Лимфатические сосуды СПСО и ПО были расширены, в ПО наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация преимущественно из лимфоцитов и нейтрофилов, а также единичных макрофагов и плазмоцитов. Края язв были представлены криптами с пролиферирующим эпителием: эпителиальные

клетки высокие призматические, с крупным ядром с ядрышками и многочисленными митозами. Бокаловидные клетки в этих криптах не выявлялись. В СПСО, особенно ее базальном отделе, и в ПО была выраженная воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, нейтрофилов, единичных макрофагов и плазмоцитов. Лимфатические сосуды СО были расширены (рис.8 Б).

В зонах с сохраненной эпителиальной выстилкой и криптами выявлялись участки с выраженной воспалительной инфильтрацией базального отдела СПСО и слабой – ПО. В этих участках число бокаловидных клеток было резко снижено, а их размеры увеличены. Лимфатических сосудов были расширены (рис.8 В, рис.9 В, Д). В проксимальном отделе ободочной кишки выявлялись участки СО, которые при микроскопическом исследовании не отличались от таковых у мышей контрольной группы.

В области язв отмечался очаговый фиброз СПСО (рис. 12 Б, Д). В области выраженных язвенных и воспалительных изменений СО встречались единичные крипт-абсцессы (рис.9 Б). На всем протяжении ободочной кишки в СО, преимущественно в СПСО, выявлялись лимфоидные узелки, часть из них была со светлыми центрами (рис.9 Е). В мышечной и серозной оболочках и нервных ганглиях признаков воспаления не наблюдалось.

На 28-ые сут. выявлялась морфологическая картина хронического колита (рис.10). Отмечалось небольшое количество эпителизирующихся язв (рис.10 А, рис. 11 А). Язвы были не обширные, щелевидной или пирамидальной формы: в поверхностных отделах края язв практически смыкались, в базальном направлении язвенный дефект был расширен и около мышечной пластинки плавно переходил в инфильтрат базальной части СПСО, распространяющийся на значительное расстояние вокруг самой язвы. Поверхность язв была выстлана кубическим эпителием, дно было представлено грануляционной тканью, в которой определялись фибробласты, фиброциты, лимфоциты и плазмоциты. В краях язв крипты были деформированы со сниженным по сравнению с нормой числом бокаловидных клеток. ПО инфильтрирована, преимущественно,

плазмócитами и лимфоцитами, просветы лимфатических сосудов были расширены.

На большем протяжении ободочной кишки наблюдалась воспалительная инфильтрация СПСО, особенно ее базального отдела, и ПО плазмócитами, лимфоцитами, и единичными нейтрофилами и макрофагами; деформация крипт, заполнение их просветов слизью. Число бокаловидных клеток было увеличено. Лимфатические сосуды СПСО и ПО были расширены (рис.10 Б, рис. 11 А). Наряду с зонами, где воспалительные изменения были выраженными, определялись участки без воспалительных изменений (рис.10 В, рис.11 В).

В медиальном отделе ободочной кишки у 1-ого из 7-ми животных выявлена очаговая дисплазия эпителия (рис.11 Г, Д).

Отмечался очаговый фиброз базальной части СПСО и мышечной оболочки (рис.12 В, Е). На всем протяжении ободочной кишки в СО, преимущественно в СПСО, выявлялись лимфоидные узелки, часть их них была со светлыми центрами (рис. 11 Е). В мышечной и серозной оболочках и нервных ганглиях, как и при остром колите, признаков воспаления не наблюдалось.

Таким образом, у половозрелых самцов мышей С57BL/6 острый колит, индуцированный 1% раствором ДСН, характеризуется обширными острыми язвами, воспалительной инфильтрацией СПСО и ПО, представленной преимущественно нейтрофилами и лимфоцитами, единичными крипт-абсцессами, снижением числа бокаловидных клеток. При хроническом колите наблюдаются деформация крипт, расширение их просветов и заполнение слизью, гиперплазия бокаловидных клеток, небольшое число эпителизирующихся язв, выраженная воспалительная инфильтрация преимущественно базального отдела СПСО лимфоцитами, плазмócитами и единичными нейтрофилами, очаговый фиброз базального отдела СПСО и мышечной оболочки. У 1-ого из 7-ми животных выявлена очаговая дисплазия эпителия.

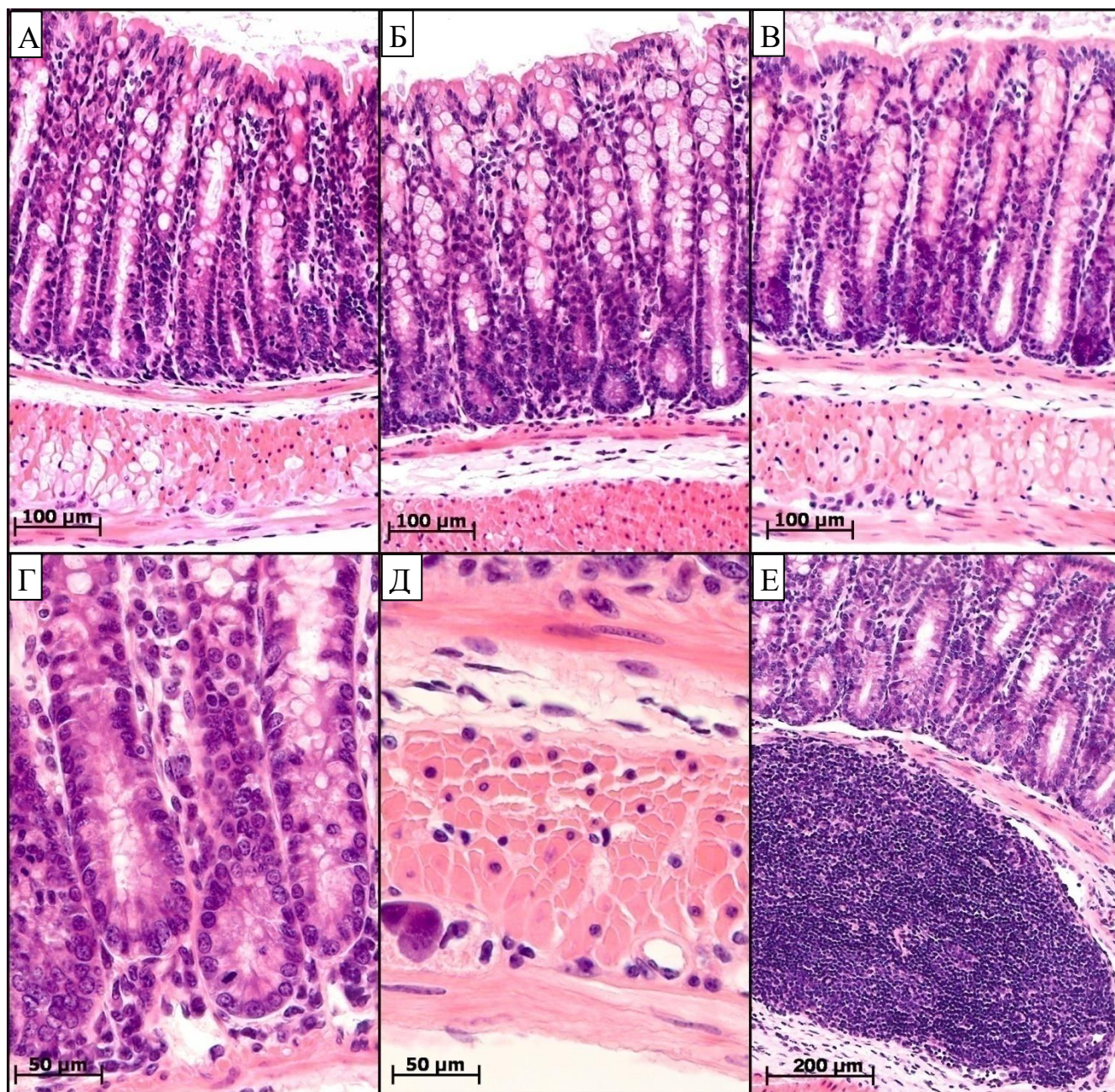


Рисунок 7. Дистальный отдел ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином. А-В – эпителиальная выстилка сохранена, крипты высокие и узкие, много бокаловидных клеток, лимфатические сосуды щелевидные, подслизистая основа узкая, в ней небольшое количество клеток, Г – базальные отделы крипт, Д – подслизистая основа и мышечная оболочка с нервным ганглием, Е – лимфоидный узелок в подслизистой основе.

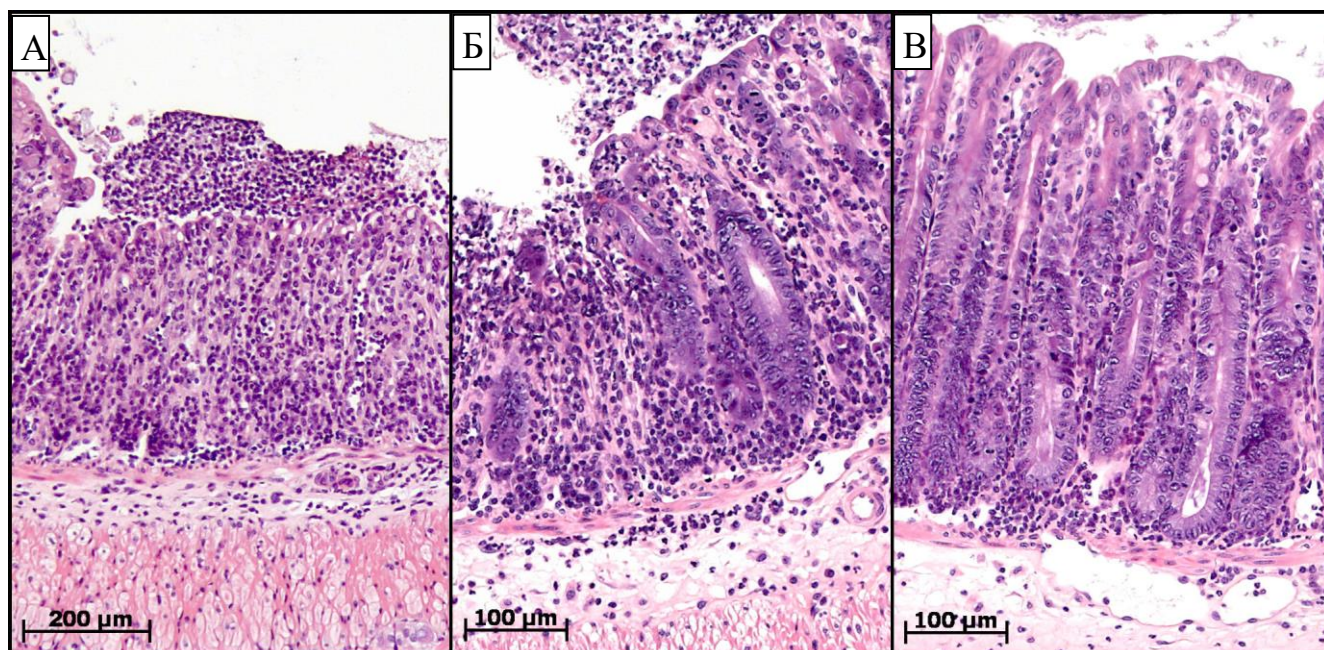


Рисунок 8. Морфологические изменения в дистальном отделе ободочной кишки при остром колите. Окраска гематоксилином и эозином. А – острая язва. На поверхности язвы скопление нейтрофилов, дно язвы представлено грануляционной тканью. Край язвы слева выстлан кубическим эпителием. Воспалительная инфильтрация подслизистой основы; Б – край язвы. Крипты с высоким призматическим эпителием без бокаловидных клеток, воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы; В – участок слизистой оболочки с сохраненной эпителиальной выстилкой, но выраженной воспалительной инфильтрацией части собственной пластинки слизистой оболочки, подслизистая основа инфильтрирована слабо. Число бокаловидных клеток снижено.

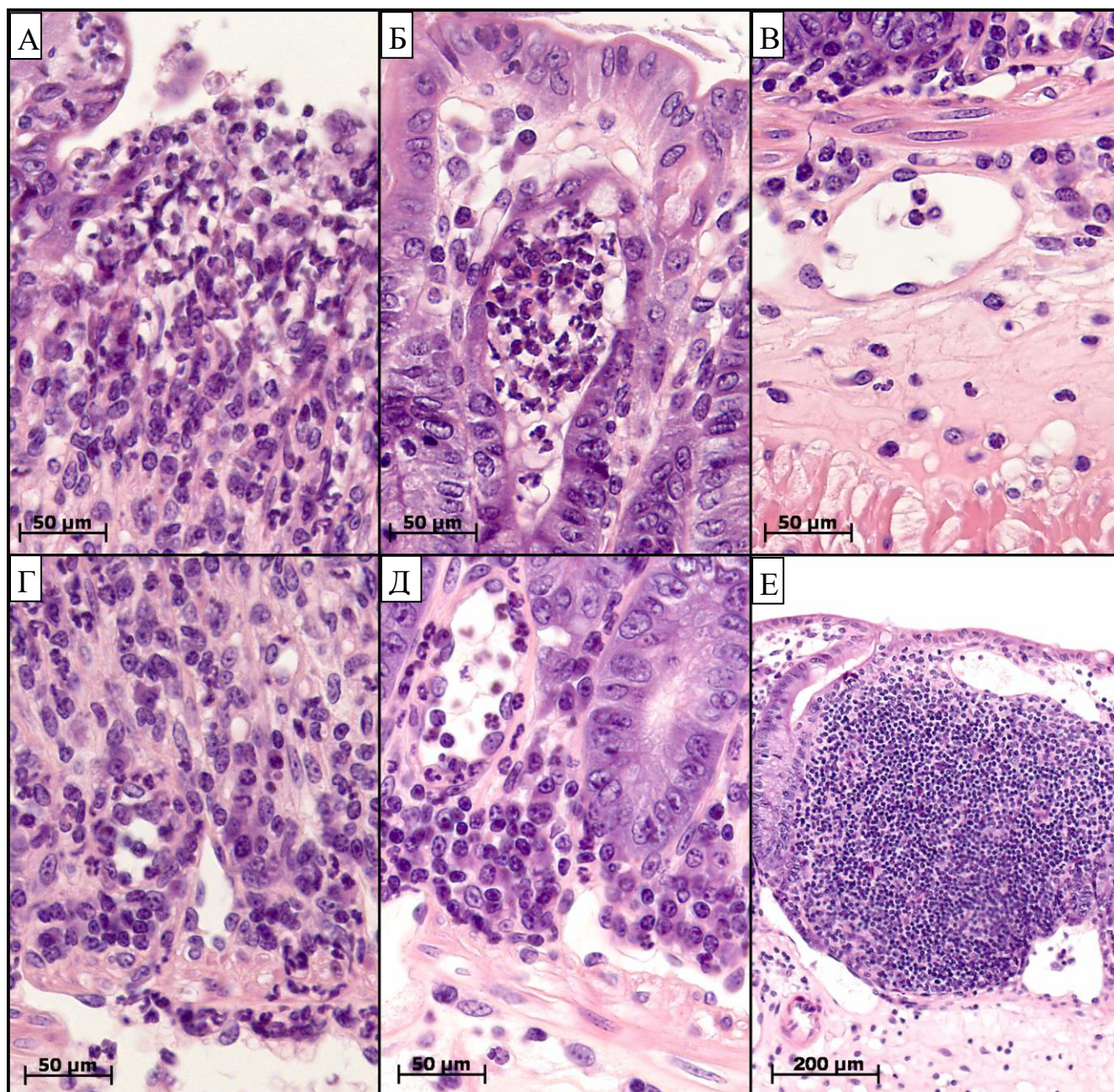


Рисунок 9. Морфологические изменения в дистальном отделе ободочной кишки при остром колите. Окраска гематоксилином и эозином. А – поверхность язвы с напояющим пластом эпителиа, на поверхности язвы скопление нейтрофилов; Б – крипт-абсцесс на участке слизистой оболочки с сохраненным эпителием, просвет крипты заполнен нейтрофилами; В – подслизистая основа с расширенным сосудом и инфильтрацией нейтрофилами и лимфоцитами; Г – дно язвы, представленное фибробластами, фиброцитами, нейтрофилами, лимфоцитами и единичными плазмацитами; Д – инфильтрат базальной части собственной пластинки слизистой оболочки; Е – лимфатический узелок в собственной пластинке слизистой оболочки.

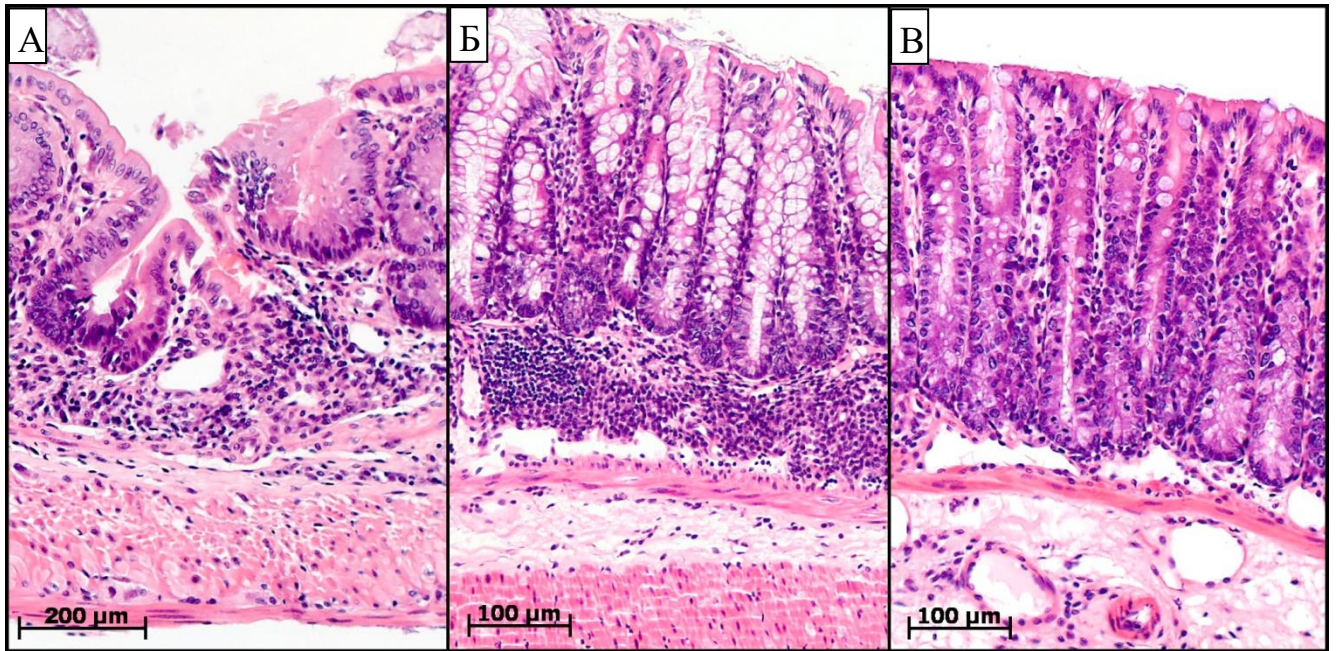


Рисунок 10. Морфологические изменения в дистальном отделе ободочной кишки при хроническом колите. Окраска гематоксилином и эозином. А – эпителизирующаяся язва, поверхность язвы выстлана пролиферирующим эпителием, по краям язвы расположены деформированные крипты; Б – участок слизистой оболочки с сохраненной эпителиальной выстилкой и выраженной воспалительной инфильтрацией базального отдела чобственной пластинки слизистой оболочки. Крипты расширены, их просветы заполнены слизью, увеличено число бокаловидных клеток, лимфатические сосуды расширены, в подслизистой основе незначительная инфильтрация; В – участок сохраненной слизистой оболочки. Лимфатические сосуды расширены, воспалительная инфильтрация слабо выражена

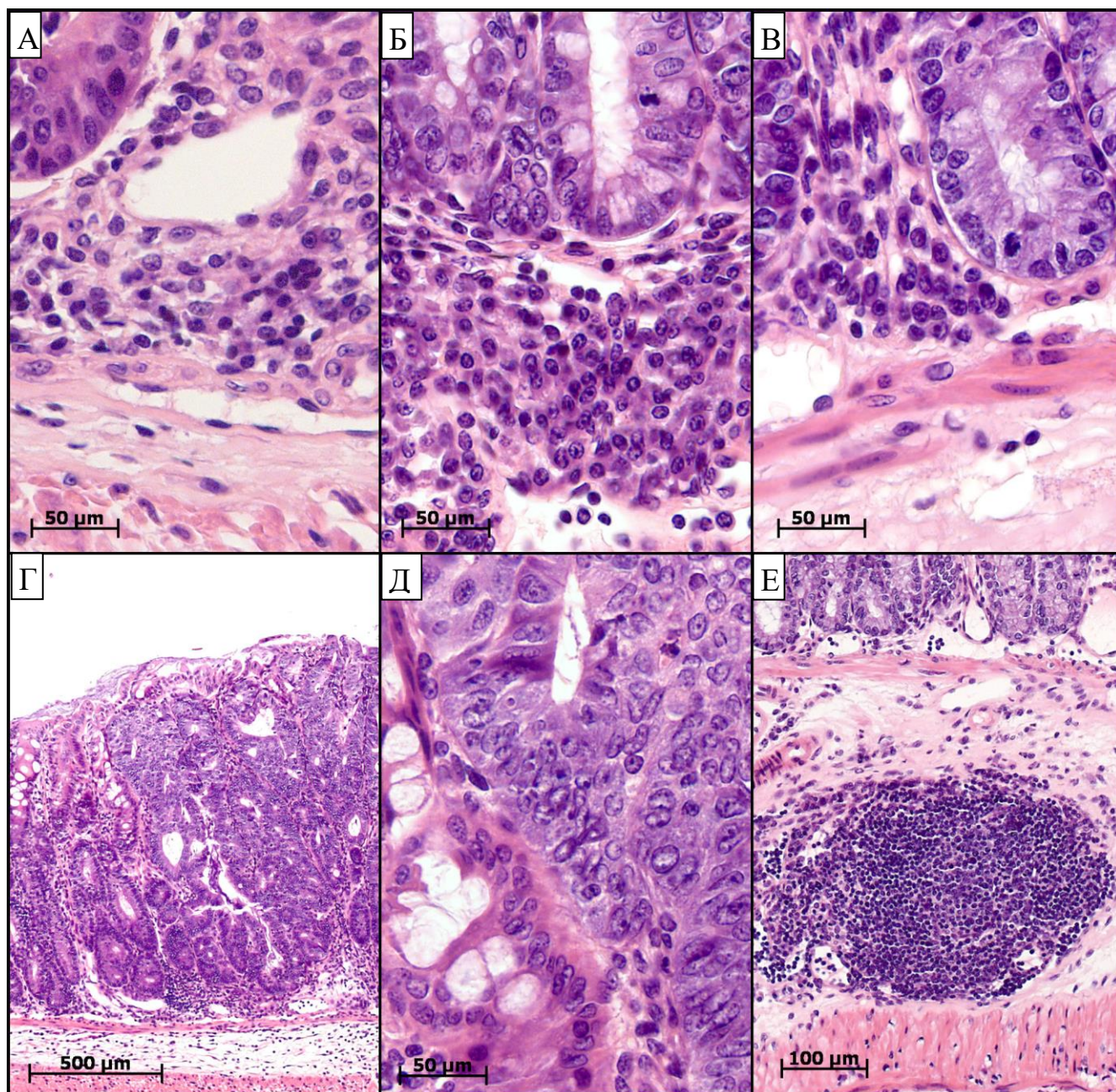


Рисунок 11. Морфологические изменения в дистальном отделе ободочной кишки при хроническом колите. Окраска гематоксилином и эозином. А – дно язвы представлено фибробластами, фиброцитами, лимфоцитами, плазмоцитами и единичными нейтрофилами; Б – базальный отдел собственной пластинки слизистой оболочки обильно инфильтрированный плазмоцитами и лимфоцитами; В – базальный отдел собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистая основа сохранного участка слизистой оболочки; Г, Д – очаговая дисплазия эпителия. В области дисплазии нарушена архитектура крипт, видны единичные бокаловидные клетки, пролиферирующий эпителий, наблюдается переход к многорядности; Е – лимфатический узелок в подслизистой основе.

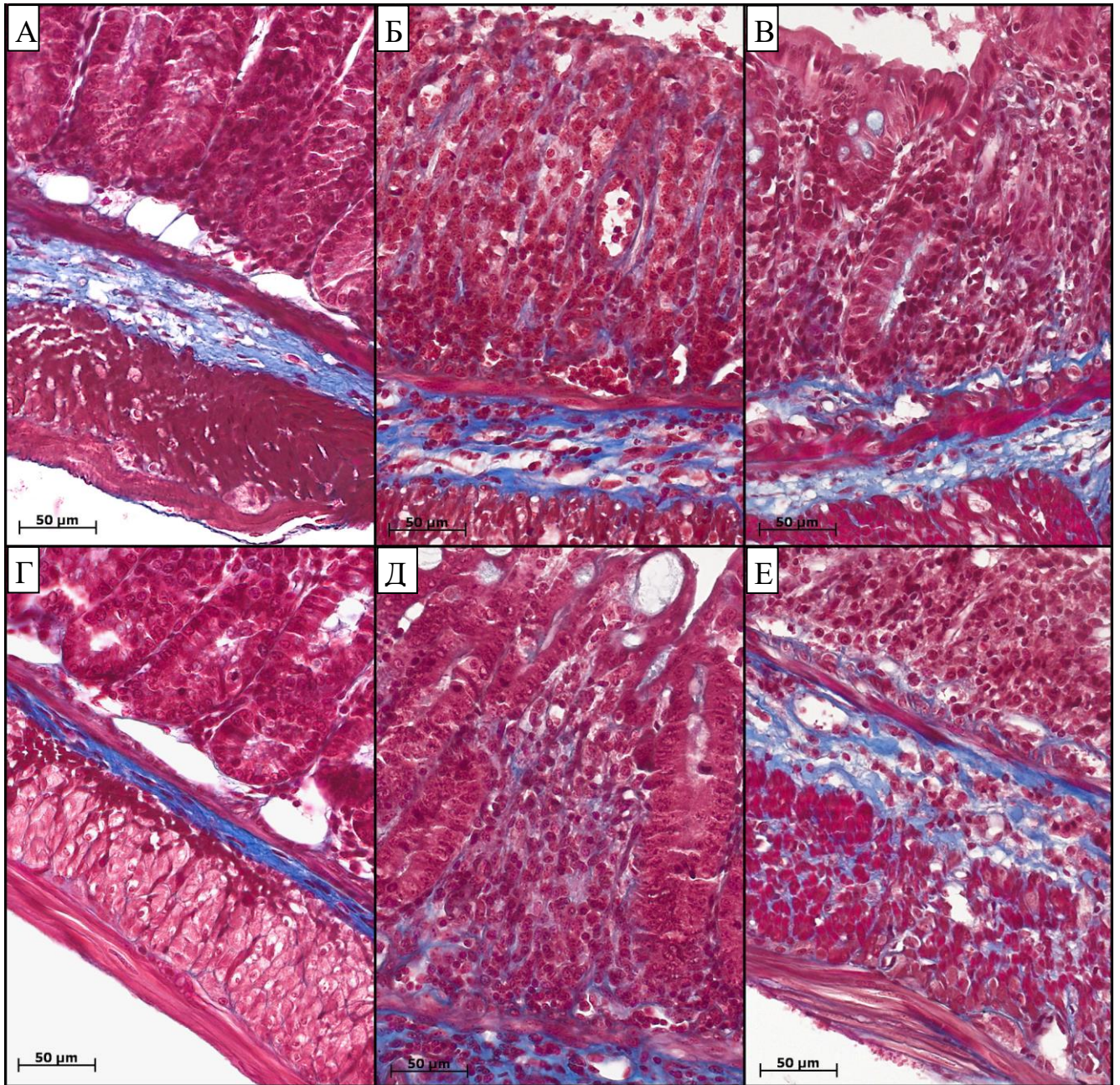


Рисунок 12. Дистальный отдел ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (А, Г), с острым (Б, Д) и хроническим (В, Е) колитом. Окраска трихромом по Массону. А, Г – коллагена (окрашен в синий цвет) много в подслизистой основе, но он практически не выявляется с собственной пластинке слизистой оболочки и мышечной оболочке, Б, Д – в области язвы наблюдается фиброз собственной пластинки слизистой оболочки, В, Е – фиброз базальной части собственной пластинки слизистой оболочки и мышечной оболочки.

4.3. Морфометрическое исследование распространенности язвенного и воспалительного процессов в разных отделах ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите

Для оценки выраженности воспалительного процесса в разных отделах ободочной кишки у животных с острым и хроническим колитом измеряли длину СО с язвами и воспалительным инфильтратом на продольных гистологических срезах ободочной кишки, окрашенных гематоксилином и эозином. На микрофотографиях медиального и дистального отделов длина СО соответствует длине среза. В проксимальном отделе ободочной кишки СО образует поперечные складки, поэтому ее длину измеряли по мышечной пластинке.

При остром колите распространенность язв и воспалительного процесса в СПСО и ПО в дистальном отделе была статистически значимо выше, чем в проксимальном (табл.10-12 рис.13 А). В дистальном отделе ободочной кишки около половины длины среза занимали язвы, а воспалительный инфильтрат в СПСО и ПО распространялся, соответственно, примерно на 80% и 40% длины СО.

По сравнению с острым, **при хроническом колите** показатели распространенности язв в дистальном отделе ободочной кишки снижались. Показатели выраженности воспалительной инфильтрации в СПСО и ПО статистически значимо не отличались от таковых при остром колите, и в дистальном отделе эти показатели были статистически значимо выше, чем в проксимальном (табл. 10-12, рис.13 Б). Язвы во всех отделах ободочной кишки выявлялись менее чем на 10% длины срезов, а воспалительный инфильтрат в дистальном отделе распространялся примерно на 80% длины среза в СПСО и 35% в ПО.

Таблица 10

Распространенность язвенного и воспалительного процессов в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром и хроническом колите, Ме (0,25; 0,75)

Экспериментальная группа, число животных	Отдел ободочной кишки	Распространенность процесса (в % по отношению к длине мышечной пластинки)		
		Язвы	Инфильтрат в СПСО	Инфильтрат в ПО
Острый колит, n=8	Дистальный	49 (31;60)	80 (63;87)	40 (33;47)
	Медиальный	5 (3;12)	37 (18; 57)	8 (7;18)
	Проксимальный	0 (0; 3)	14 (10; 22)	4 (3; 6)
Хронический колит, n=7	Дистальный	2 (0;7)	79 (69; 90)	36 (24;56)
	Медиальный	5 (0; 6)	53 (48; 64)	24 (19; 35)
	Проксимальный	0 (0; 1)	16 (10; 26)	7 (3; 9)

Таблица 11

Достигнутая значимость различий показателей распространенности язвенного и воспалительного процессов между группами животных с острым и хроническим колитом в разных отделах ободочной кишки (U-критерий Манна-Уитни)

Отдел ободочной кишки	Язвы	Инфильтрат в СПСО	Инфильтрат в ПО
Дистальный	0,000622	0,955089	0,866511
Медиальный	0,280963	0,280963	0,120591
Проксимальный	0,612587	0,778866	0,335664

Таблица 12

Достигнутая значимость различий показателей распространенности язвенного и воспалительного процессов между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у самцов мышей С57BL/6 при остром и хроническом колите (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Острый колит				Хронический колит			
Язвы	Д	М	П	Язвы	Д	М	П
Д	-	0,0814	0,0009	Д	-	1,0000	0,5454
М	0,0814	-	0,4719	М	1,0000	-	0,6349
П	0,0009	0,4719	-	П	0,5454	0,6349	-
Инфильтрат в СПСО	Д	М	П	Инфильтрат в СПСО	Д	М	П
Д	-	0,1555	0,0011	Д	-	0,2547	0,0002
М	0,1555	-	0,3116	М	0,2547	-	0,0753
П	0,0011	0,3116	-	П	0,0002	0,0753	-
Инфильтрат в ПО	Д	М	П	Инфильтрат в ПО	Д	М	П
Д	-	0,2897	0,0003	Д	-	0,9655	0,0012
М	0,2897	-	0,0851	М	0,9655	-	0,0331
П	0,0003	0,0851	-	П	0,0012	0,0331	-

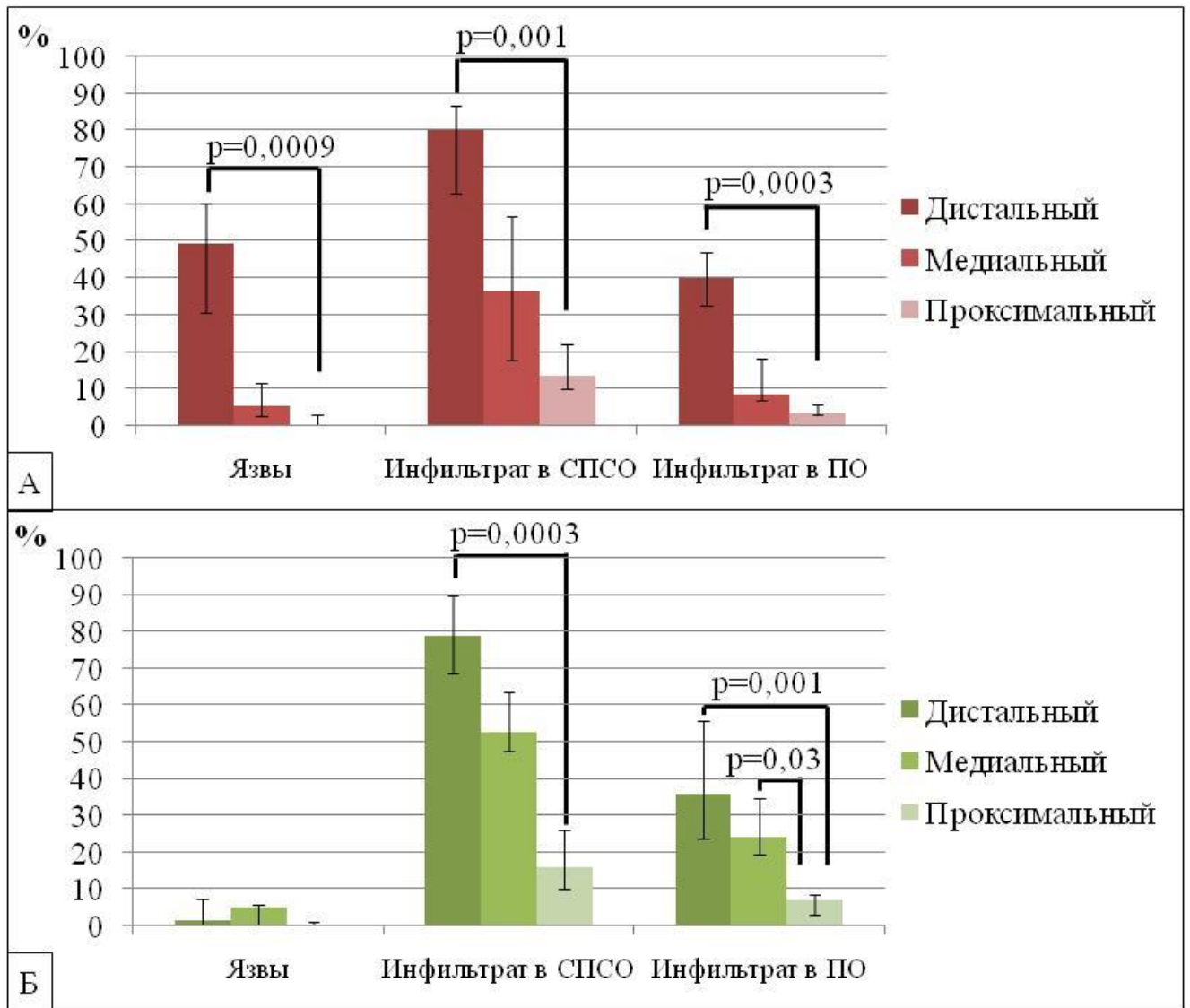


Рисунок 13. Морфометрические показатели распространенности язвенного и воспалительного процессов по отношению к длине мышечной пластинки (%) в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром (А) и хроническом (Б) колите, p – достигнутая значимость

4.4. Морфометрическое исследование состава воспалительного инфильтрата в дистальном отделе ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

Исследование распространенности язвенного и воспалительного процессов в разных отделах ободочной кишки при остром и хроническом колите показало, что патологические изменения наиболее выражены в дистальном отделе. В связи с этим исследование состава воспалительного инфильтрата проводили именно в этом отделе.

При остром колите как в СПСО, так и ПО статистически значимо возрастали показатели числа нейтрофилов и лимфоцитов. Число плазмоцитов не отличалось от контрольных значений (табл. 13-15, рис. 14).

При хроническом колите по сравнению с контролем в СПСО и ПО были статистически значимо выше показатели числа плазматических клеток, лимфоцитов и нейтрофилов. По сравнению с острым колитом, в СПСО и ПО возрастало количество плазмоцитов и снижалось количество нейтрофилов, в ПО также статистически значимо уменьшался показатель числа лимфоцитов (табл. 13-15, рис.14).

Таблица 13

Состав инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки дистального отдела ободочной кишки у мышей самцов C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите, Ме (0,25; 0,75)

Экспериментальные группы, число животных	Число клеток на мм длины СО		
	Нейтрофилы	Лимфоциты	Плазмоциты
Контроль, n=4	2,22 (2,05; 2,44)	7,99 (7,07; 8,83)	2,10 (2,04; 2,44)
Острый колит, n=5	42,89 (29,20; 44,03)	51,64 (43,94; 53,77)	1,69 (1,60; 2,18)
Хронический колит, n=5	5,54 (4,18; 5,75)	33,33 (31,71; 46,67)	33,70 (27,85; 39,09)

Таблица 14

Состав инфильтрата в подслизистой основе дистального отдела ободочной кишки у мышей самцов C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите, Ме (0,25; 0,75)

Экспериментальные группы, число животных	Число клеток на мм длины СО		
	Нейтрофилы	Лимфоциты	Плазмоциты
Контроль, n=4	0,82 (0,52; 1,10)	1,91 (1,61; 2,17)	0,41 (0,28; 0,55)
Острый колит, n=5	31,55 (29,00; 34,55)	43,21 (30,55; 48,48)	1,20 (0,86; 1,52)
Хронический колит, n=5	3,56 (1,78; 4,32)	12,44 (11,72; 16,76)	11,05 (9,09; 13,35)

Таблица15

Достигнутая значимость различий показателей числа клеток инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) и подслизистой основе (ПО) дистального отдела ободочной кишки у мышей самцов C57BL/6 контрольной группы (К) и при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите (Критерий Крускала-Уоллиса, U-критерий Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение: статистически значимыми считались различия при $p < 0,017$)

Инфильтрат в СПСО				Инфильтрат в ПО			
Нейтрофилы	К	ОК	ХК	Нейтрофилы	К	ОК	ХК
К	-	0,0159	0,0159	К	-	0,0159	0,0159
ОК	0,0159	-	0,0079	ОК	0,0159	-	0,0079
ХК	0,0159	0,0079	-	ХК	0,0159	0,0079	-
Лимфоциты	К	ОК	ХК	Лимфоциты	К	ОК	ХК
К	-	0,0159	0,0159	К		0,0159	0,015
ОК	0,0159	-	0,0952	ОК	0,0159		0,0079
ХК	0,0159	0,0952	-	ХК	0,0159	0,0079	
Плазмоциты	К	ОК	ХК	Плазмоциты	К	ОК	ХК
К	-	0,4127	0,0159	К		0,0635	0,0159
ОК	0,4127	-	0,0079	ОК	0,0635		0,0079
ХК	0,0159	0,0079	-	ХК	0,0159	0,0079	

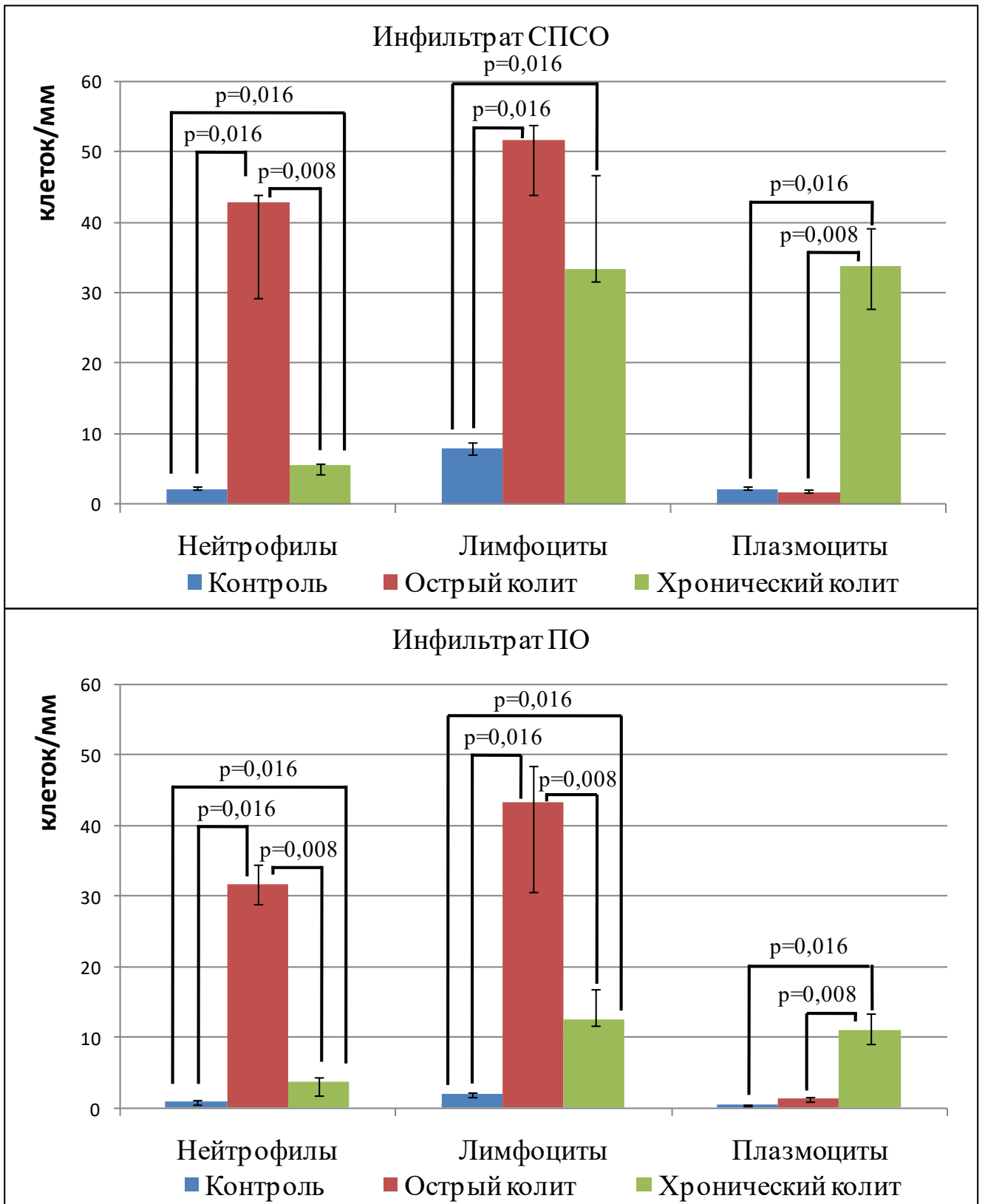


Рисунок 14. Число нейтрофилов, лимфоцитов и плазмоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе в дистальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

4.5. Изменения продукции цитокинов в стенке медиального отдела ободочной при экспериментальном остром и хроническом колите

Цитокины условно можно разделить на провоспалительные – поддерживающие развитие воспалительного процесса, и противовоспалительные – подавляющие воспалительные реакции. Мы оценивали в гомогенате медиального отдела ободочной кишки мышей с острым и хроническим колитом концентрацию провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, IL-17, IFN γ и противовоспалительного IL-4 и экспрессию мРНК провоспалительных IL1 β , IL2, IL6, IL12p40, IL17, IFN γ и противовоспалительных TGF β , IL10 и IL4.

При остром колите показатели концентрация цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 и IFN γ в гомогенате медиального отдела ободочной кишки были статистически значимо ниже, чем у животных контрольной группы (табл. 16, 17, рис.15). Уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и противовоспалительного TGF β возрастал, а уровень мРНК IL-2, IFN γ , IL-12p40, IL-17, IL-4 и IL-10 статистически значимо не изменялся по сравнению с контрольной группой (табл. 18, 19, рис.16).

При хроническом колите концентрация всех исследуемых цитокинов соответствовала контрольным значениям. По сравнению с острым колитом, при хроническом возрастали показатели концентрации IL-6 и IFN γ (табл. 16, 17, рис.15). По сравнению с контрольной группой возрастал уровень мРНК IL-10 и IL-12p40. По сравнению с острым колитом снижался уровень мРНК IL-1 β и IL-2 и повышался уровень IFN γ и IL-17 (табл. 18, 19, рис.16).

Таблица 16

Концентрация цитокинов, нормированная на общую концентрацию белка в пробе, в гомогенате медиального отдела ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы, при остром и хроническом колите, Ме (0,25;0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Концентрация цитокина (пг/мг белка)				
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-17	IFN γ
Контроль, n=10	275 (228;346)	89 (76;102)	2075 (1879;2780)	282 (206;321)	362 (261;399)
Острый колит, n=7	154 (151;176)	45 (31;49)	1113 (890;1219)	122 (100;139)	140 (118;163)
Хронический колит, n=9	225 (177;302)	73 (58;90)	1788 (1589;2185)	229 (141;282)	326 (214;412)

Таблица 17

Достигнутая значимость различий показателей концентрации цитокинов в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите, (Критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

IL-2	К	ОК	ХК	IL-4	К	ОК	ХК
К	-	0,006	1,000	К	-	0,003	0,940
ОК	0,006	-	0,094	ОК	0,003	-	0,059
ХК	1,000	0,094	-	ХК	0,940	0,059	-
IL-6	К	ОК	ХК	IL-17	К	ОК	ХК
К	-	0,001	1,000	К	-	0,001	0,604
ОК	0,001	-	0,016	ОК	0,001	-	0,073
ХК	1,000	0,016	-	ХК	0,604	0,073	-
IFN γ	К	ОК	ХК				
К	-	0,001	1,000				
ОК	0,001	-	0,011				
ХК	1,000	0,011	-				

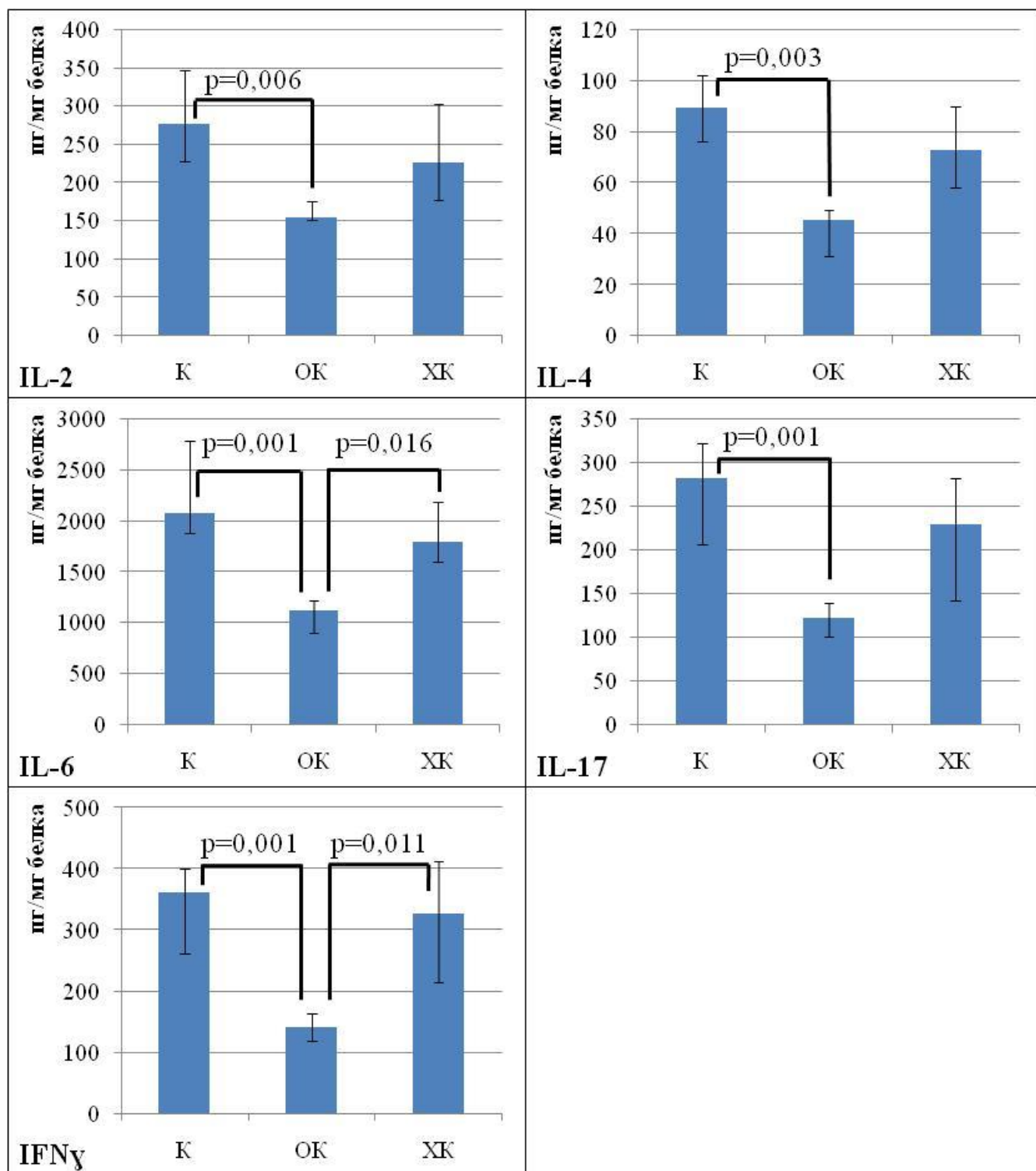


Рисунок 15. Изменение концентрации цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-17и IFN γ в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите, Me(0,25;0,75). p – достигнутая значимость различий

Таблица 18

Уровень мРНК цитокинов в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы, при остром и хроническом колите, Me(0,25;0,75).

Цитокины	Отношение концентрации мРНК цитокинов к концентрации мРНК β -актина		
	Контроль n=4	Острый колит n=4	Хронический колит n=4
IL-1 β	0,010 (0,005; 0,016)	0,042 (0,035; 0,061)	0,006 (0,006; 0,007)
IL-2	0,000044 (0,000036; 0,000044)	0,000084 (0,000066; 0,000120)	0,000021 (0,000010; 0,000026)
IL-6	0,00011 (0,0009; 0,00013)	0,00097 (0,00060; 0,00127)	0,00041 (0,00041; 00045)
IFN γ	0,000087 (0,000068; 0,000102)	0,000018 (0, 000015; 0,000025)	0,000472 (0,000246; 0,000665)
IL-12p40	0,0008 (0,0007; 0,0010)	0,0011 (0,0010; 0,0012)	0,0032 (0,0,0019; 0,0065)
IL-17	0,00020 (0,00019; 0,0027)	0,00012 (0,00010; 0,00016)	0,00044 (0,00029; 0,00097)
IL-4	0,000098 (0,000085; 0,000116)	0,000074 (0,000055; 0,000116)	0,000089 (0,000058; 0,000159)
IL-10	0,00006 (0,00005; 0,00007)	0,00015 (0,00011; 0,0,00022)	0,00034 (0,00018; 0,00042)
TGF β	0,0035 (0,0023; 0,0039)	0,0085 (0,0052; 0,0090)	0,0045 (0,0035; 0,0077)

Таблица 19

Достигнутая значимость различий уровня мРНК в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите (Критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

IL-1 β	К	ОК	ХК	IL-2	К	ОК	ХК
К	-	0,037	1,000	К	-	0,156	1,000
ОК	0,037	-	0,009	ОК	0,156	-	0,015
ХК	1,000	0,009	-	ХК	1,000	0,015	-
IL-6	К	ОК	ХК	IFN γ	К	ОК	ХК
К	-	0,002	0,326	К	-	0,106	0,341
ОК	0,002	-	0,176	ОК	0,106	-	0,001
ХК	0,326	0,176	-	ХК	0,341	0,001	-
IL-12p40	К	ОК	ХК	IL-17	К	ОК	ХК
К	-	0,805	0,034	К	-	0,818	0,189
ОК	0,805	-	0,594	ОК	0,818	-	0,019
ХК	0,034	0,594	-	ХК	0,189	0,019	-
IL-4	К	ОК	ХК	IL-10	К	ОК	ХК
К	-	1,000	1,000	К	-	0,189	0,009
ОК	1,000	-	1,000	ОК	0,189	-	1,000
ХК	1,000	1,000	-	ХК	0,009	1,000	-
TGF β	К	ОК	ХК				
К	-	0,031	0,412				
ОК	0,031	-	0,757				
ХК	0,412	0,757	-				

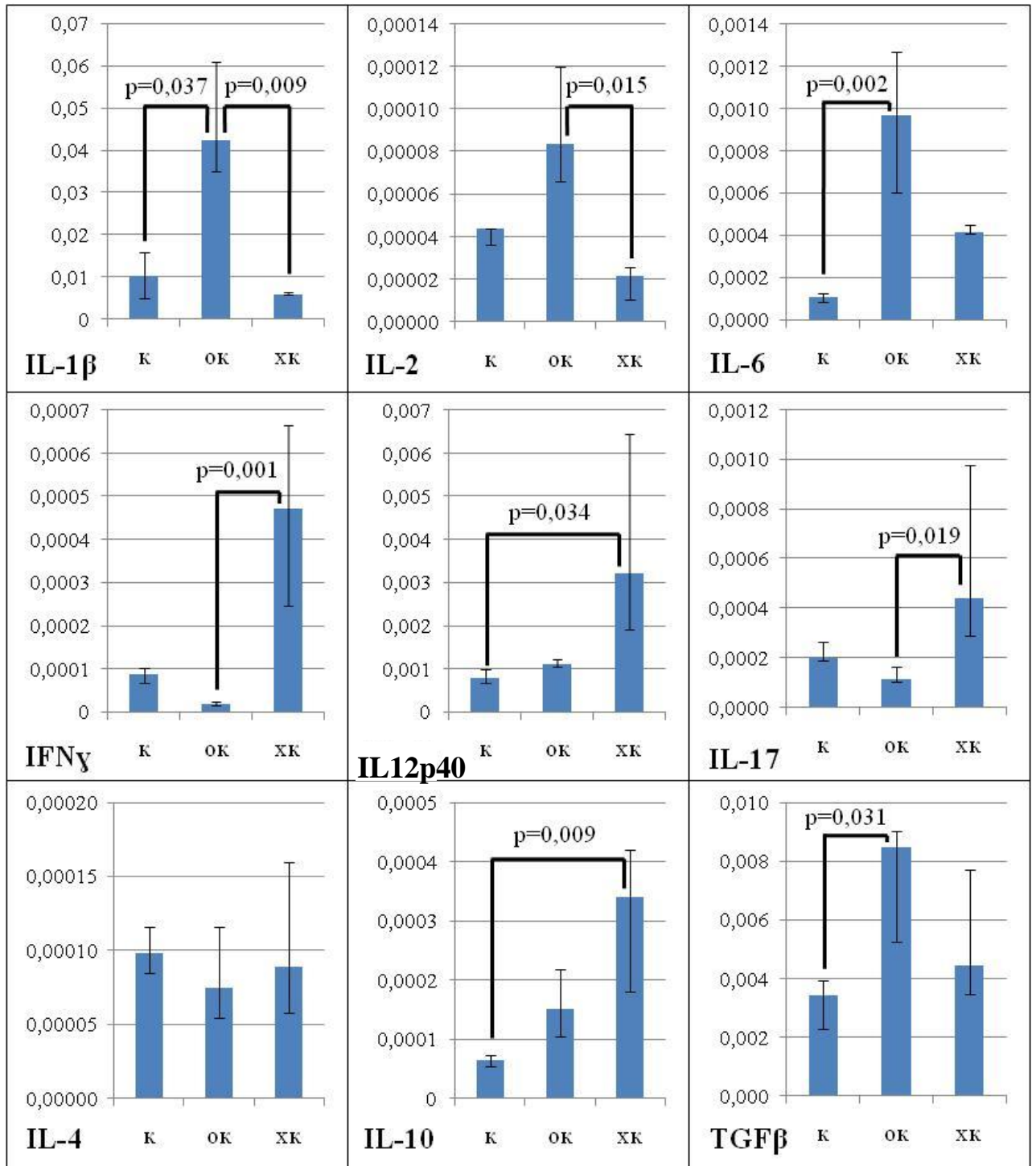


Рисунок 16. Изменение уровня мРНК цитокинов IL1 β , IL2, IL6, IL12p40, IL17, IFN γ , TGF β , IL10 и IL4 в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите, Me (0,25;0,75), p – достигнутая значимость различий. По оси ординат отложено отношение количества мРНК исследуемого гена к мРНК β -актина в пробе.

4.6. Изменения эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите

4.6.1. Ультраструктурное исследование поверхности эпителиальной выстилки ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

Для ультраструктурного исследования отбирали участки сохраненной СО на границе дистального и медиального отделов ободочной кишки, так как дистальнее при остром колите из-за обширных язв эпителиальные клетки часто отсутствуют, а проксимальнее – патологические изменения, как показано нами, менее выражены. При ультраструктурном исследовании ободочной кишки выявлялись 4 типа эпителиальных клеток:

1) каемчатые колоноциты – клетки, на уплощенной апикальной поверхности которых выявляется большое количество регулярно расположенных одинаковых покрытых гликокаликсом микроворсинок;

2) бокаловидные клетки – клетки с выпуклой апикальной поверхностью на которой микроворсинки отсутствуют либо их мало, их цитоплазма заполнена крупными секреторными вакуолями со светлым неоднородным секретом;

3) бескаемчатые колоноциты – клетки с относительно небольшим числом нерегулярно расположенных микроворсинок на уплощенной апикальной поверхности.

4) ЭЭК – клетки с большим количеством мелких темных везикул, на ультратонких срезах встречались редко.

У животных контрольной группы каемчатые колоноциты на плоской апикальной поверхности содержали множество одинаковых пальцевидных регулярно расположенных микроворсинок, высотой 0,6-0,8 мкм и толщиной 0,1-0,2 мкм. Над микроворсинками была видна рыхлая неоднородная структура толщиной около 0,3 мкм – гликокаликс. В апикальной части клеток выявлялось небольшое количество мелких, диаметром 0,2 мкм, вакуолей со светлым содержимым. В апикальной части клеток также были видны округлые

митохондрии диаметром 0,2-0,8 мкм (рис.17 А-В). На поверхности **бокаловидных клеток** микроворсинки отсутствовали либо их было мало. Апикальная поверхность клеток имела выпуклую форму. В верхней части клетки выявлялось множество крупных тесно расположенных светлых вакуолей диаметром от 0,5 до 3 мкм с неоднородным содержимым. Рядом с вакуолями определялся гранулярный эндоплазматический ретикулум и крупные вытянутые митохондрии, длиной около 2 мкм, а под секреторными везикулами располагались элементы комплекса Гольджи (рис.17 В-Д). Апикальная поверхность **бескаемчатых колоноцитов** была плоская с относительно небольшим количеством нерегулярно расположенных микроворсинок разной высоты и толщины (высота 0,4-0,7 мкм, толщина 0,1-0,2 мкм). В цитоплазме были видны вакуоли диаметром от 0,3 до 0,8 мкм - более мелкие и светлые, чем в бокаловидных клетках. Рядом с вакуолями встречались округлые митохондрии диаметром около 0,6 мкм (рис.17 Г-Е). ЭЭЖ у животных контрольной группы в ультратонких срезах не выявлены. У апикальной поверхности латеральные мембраны клеток были соединены между собой плотными контактами. Встречались десмосомы, а также простые межклеточные соединения типа «замок» (рис.17 А, В). На большей части ультратонких срезов бактерии в непосредственной близости от эпителиальной выстилки отсутствовали (рис.17 А-Г), однако выявлялись единичные участки с относительно небольшим числом полиморфных кокков и палочек, располагавшихся одиночно и группами (рис.17 Д, Е).

У животных с острым колитом на апикальной поверхности **каемчатых колоноцитов** выявлялось множество микроворсинок, но их расположение было менее регулярным, чем у животных контрольной группы, высота и форма варьировали (высота 0,4-0,7 мкм, ширина около 0,1 мкм). Микроворсинки были покрыты гликокаликсом толщиной 0,1-0,2 мкм, то есть он был тоньше, чем у животных контрольной группы. В цитоплазме наблюдалось большое количество мелких светлых везикул диаметром около 0,2 мкм и митохондрий, диаметром 0,4-0,8 мкм (рис.18 А, Б). На поверхности **бокаловидных клеток** микроворсинки

отсутствовали либо их было мало, апикальная поверхность этих клеток имела выпуклую форму. В цитоплазме выявлялось множество крупных тесно расположенных светлых везикул диаметром от 0,5 до 2 мкм с неоднородным содержимым. Помимо секреторных везикул в бокаловидных клетках также наблюдалось множество мелких светлых вакуолей диаметром около 0,2 мкм и округлые и овальные митохондрии длиной 0,4-0,8 мкм (рис.18 В, Г). Встречались клетки с уплощенной апикальной мембраной и небольшим числом микроворсинок высотой около 0,5-0,7 мкм без гликокаликса – бескаемчатые колоноциты. В отличие от контрольной группы, в этих клетках светлые вакуоли средних размеров встречались редко, но присутствовало множество мелких светлых вакуолей диаметром около 0,2 мкм. В цитоплазме выявлялось много округлых и вытянутых митохондрий длиной около 0,4-0,7 мкм (рис.18 Г, Д). В базальной части эпителиальной выстилки были выявлены ЭЭК, содержавшие множество мелких электронно-плотных везикул диаметром 0,1-0,3 мкм в базальной части цитоплазмы (рис.18 Е). Межклеточные пространства не были расширены и бактерии в толще эпителиальной выстилки не выявлялись. Почти на всем протяжении эпителиальной выстилки в непосредственной близости от эпителиальных клеток определялись в большом количестве бактерии – преимущественно полиморфные палочки и кокки. Их количество было значительно увеличено по сравнению с контрольной группой (рис.18 В-Д).

У животных с хроническим колитом на плоской апикальной поверхности **каемчатых колоноцитов** наблюдалось множество одинаковых пальцевидных регулярно расположенных микроворсинок, высотой 0,6-0,9 мкм и толщиной 0,1-0,2 мкм. Микроворсинки были покрыты гликокаликсом толщиной 0,2-0,3 мкм. В апикальной части клеток выявлялось небольшое количество мелких вакуолей со светлым содержимым диаметром около 0,2 мкм и округлые митохондрии диаметром 0,5-0,7 мкм (рис.19 А, Б). На выпуклой апикальной поверхности **бокаловидных клеток** микроворсинки отсутствовали либо их было мало. В цитоплазме бокаловидных клеток выявлялось множество крупных тесно расположенных светлых секреторных везикул диаметром от 0,5 до 2,5 мкм с

неоднородным содержимым и округлые митохондрии диаметром 0,5-0,8 мкм (рис.19 В–Д). Наблюдалось большое количество **бескаемчатых колоноцитов** с плоской апикальной мембраной, небольшим количеством нерегулярно расположенных микроворсинок разной высоты и толщины, на которых гликокаликс отсутствовал. В цитоплазме этих клеток были видны вакуоли средних размеров, диаметром от 0,3 до 1,2 мкм, с более светлым содержимым, чем в секреторных везикулах бокаловидных клеток. Рядом с вакуолями локализовались округлые митохондрии диаметром 0,5-0,8 мкм (рис.19 В-Д). В базальной части эпителиальной выстилки определялись **ЭЭК**, содержавшие множество электронно-плотных секреторных гранул диаметром 0,1-0,3 мкм (рис.19 Е). Выявлялись плотные контакты, десмосомы и простые межклеточные соединения типа «замок» (рис.19 А, В, Д). Бактерии, преимущественно извитые палочки, выявлялись на некотором отдалении от поверхности эпителиальных клеток и в значительно меньшем количестве, чем в случае острого колита, но на большем протяжении эпителиальной выстилки по сравнению с животными контрольной группы. (рис.19 Б–Д).

Таким образом, при остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, значительно возрастает число бактерий, контактирующих с эпителиальными клетками. Гликокаликс истончается, микроворсинки укорачиваются и деформируются. В цитоплазме каемчатых и бескаемчатых колоноцитов и бокаловидных клеток возрастает число мелких светлых вакуолей и митохондрий, в бескаемчатых колоноцитах снижается количество везикул диаметром 0,3-0,8 мкм. При хроническом колите число бактерий уменьшается по сравнению с острым колитом. Длина и структура микроворсинок и толщина гликокаликса нормализуются. По сравнению с контрольной группой и мышами с острым колитом, увеличивается число вакуолей средних размеров в бескаемчатых колоноцитах.

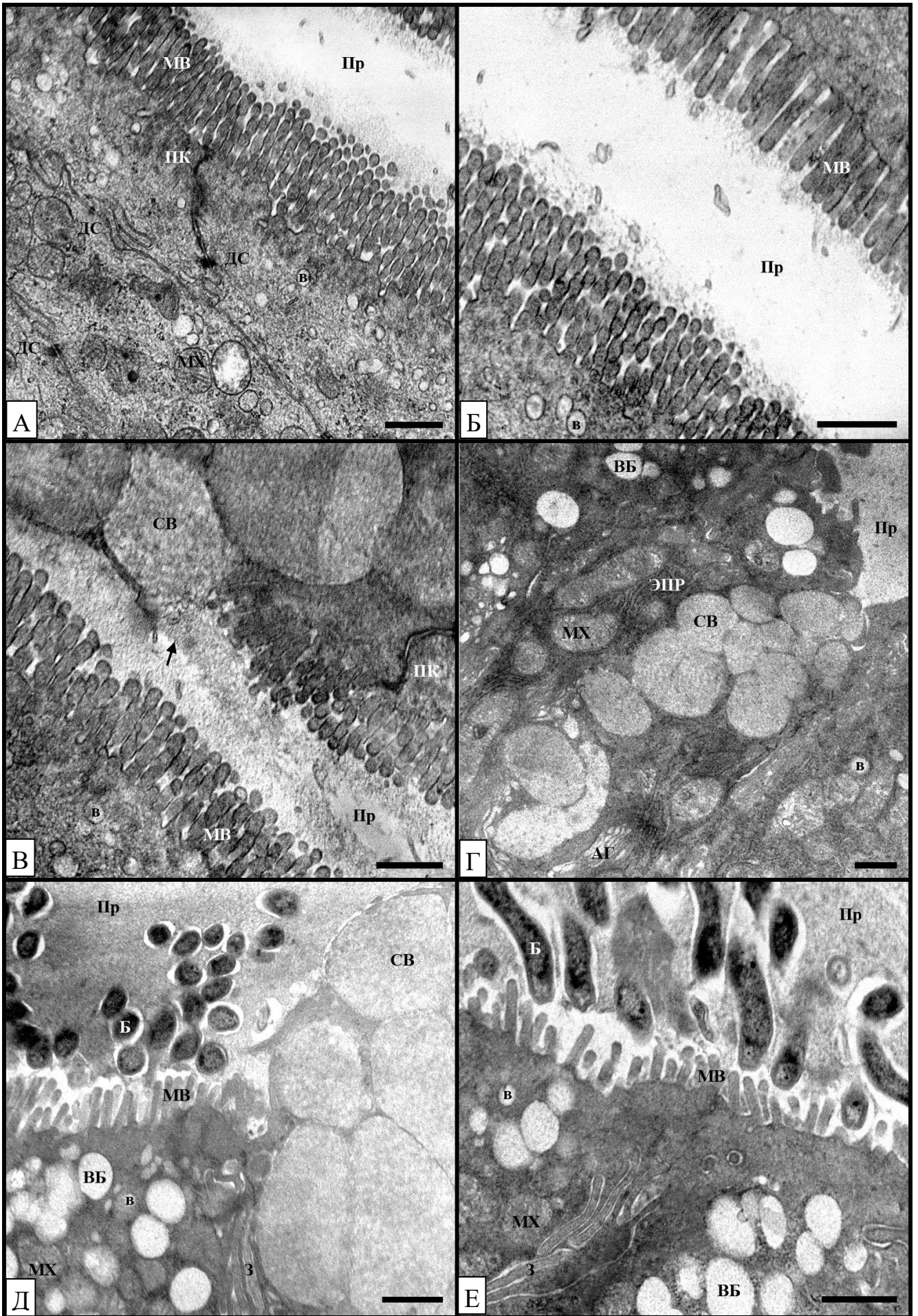


Рисунок 17. Ультраструктура поверхности эпителиальной выстилки на границе дистального и медиального отделов ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы. А, Б – поверхность каемчатых колоноцитов с множеством одинаковых микроворсинок, покрытых гликокаликсом. Клетки соединены плотными контактами и десмосомами, в цитоплазме видны мелкие светлые вакуоли и митохондрии. В – каемчатые колоноциты и бокаловидная клетка с крупными секреторными везикулами. В цитоплазме каемчатых колоноцитов видны мелкие светлые вакуоли. Наблюдается экзоцитоз слизи из секреторной везикулы бокаловидной клетки. Г - бокаловидная клетка с крупными секреторными везикулами и бескаемчатые колоноциты с более светлыми вакуолями меньших размеров. В цитоплазме клеток, помимо секреторных вакуолей, видны ЭПР, митохондрии, аппарат Гольджи и мелкие вакуоли. Д – бескаемчатый колоноцит и бокаловидная клетка. Над поверхностью клеток расположены бактерии округлой формы. Е - бескаемчатые колоноциты, над поверхностью клеток видны бактерии палочковидной формы. Клетки соединены между собой простым межклеточным соединением типа «замок». Длина масштабного отрезка 1 мкм

Условные обозначения: Пр – просвет, Б – бактерии, ГК – гликокаликс, МВ – микроворсинки, ПК – плотный контакт, ДС – десмосома, З – простое соединение типа «замок», МХ – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи, СВ – секреторные везикулы бокаловидных клеток, ВБ – везикулы бескаемчатых колоноцитов, в – мелкие везикулы диаметром около 0,2 мкм. Стрелкой указана секреция слизи.

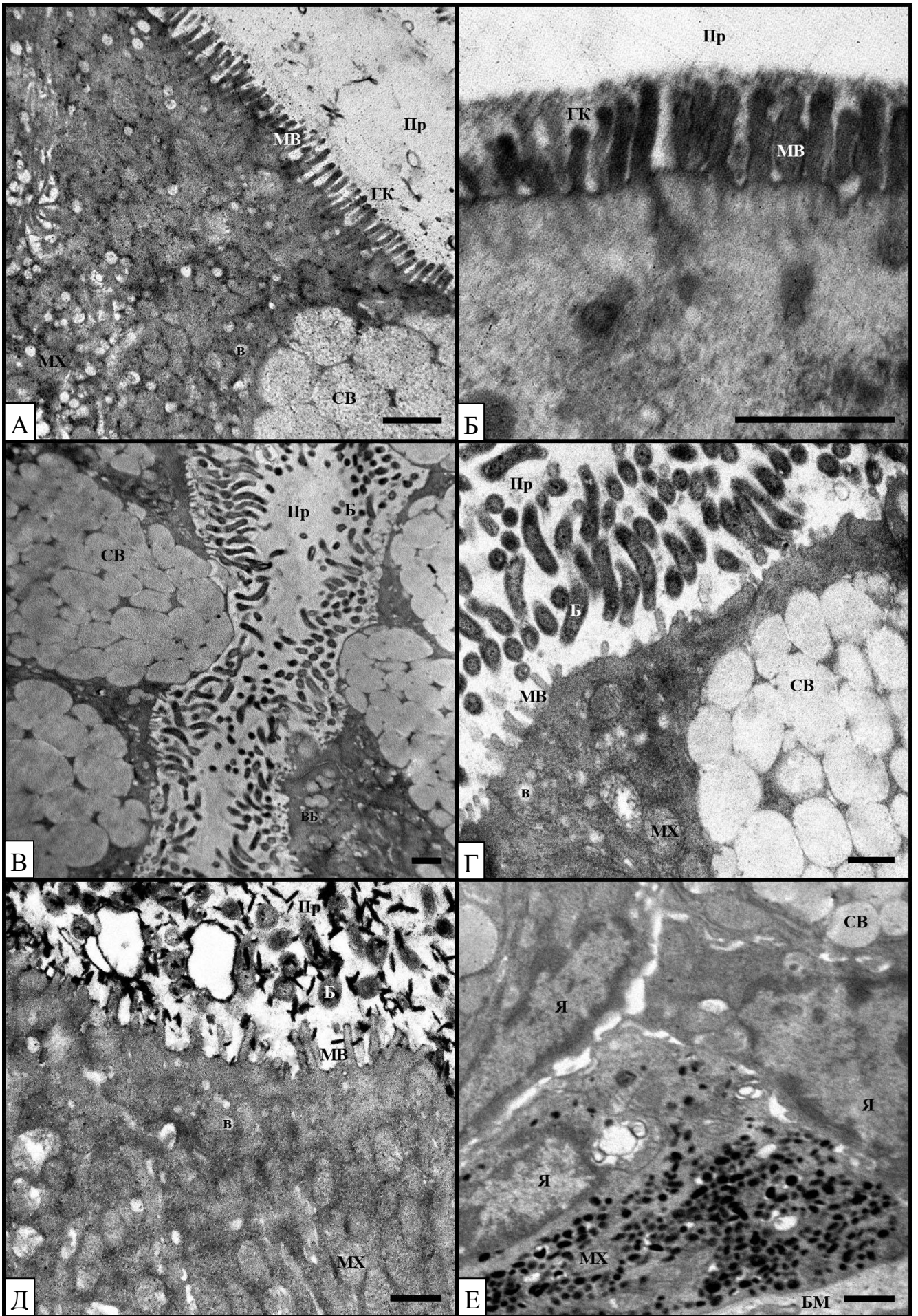


Рисунок 18. Ультраструктура эпителиальной выстилки на границе дистального и медиального отделов ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 с острым колитом. А – каемчатые колоноциты с множеством микроворсинок, покрытых гликокаликсом. В цитоплазме выявляется множество мелких светлых везикул и митохондрий. Справа видна часть бокаловидной клетки с секреторными везикулами. Б – поверхность каемчатого колоноцита. Микроворсинки деформированы, расположены не регулярно, гликокаликс тонкий. В – просвет крипты, заполненный бактериями, контактирующими с эпителиальными клетками. Стенки крипты образованы бокаловидными клетками и бескаемчатыми колоноцитами, в цитоплазме которых, наряду с секреторными везикулами много мелких светлых вакуолей. Г – бокаловидная клетка, заполненная секреторными везикулами, и бескаемчатый колоноцит, над их поверхностью – большое количество бактерий. В цитоплазме клеток множество мелких светлых вакуолей и митохондрий. Д – бескаемчатый колоноцит без секреторных вакуолей, но с множеством мелких светлых вакуолей и митохондрий. Над поверхностью клетки многочисленные бактерии. Е – ЭЭК с электронно-плотными секреторными гранулами. Длина масштабного отрезка 1 мкм

Условные обозначения: Пр – просвет, Б – бактерии, ГК – гликокаликс, МВ – микроворсинки, МХ – митохондрии, СВ – секреторные везикулы бокаловидных клеток, ВБ – везикулы бескаемчатых колоноцитов, в – мелкие везикулы диаметром около 0,2 мкм, Я – ядро, БМ – базальная мембрана.

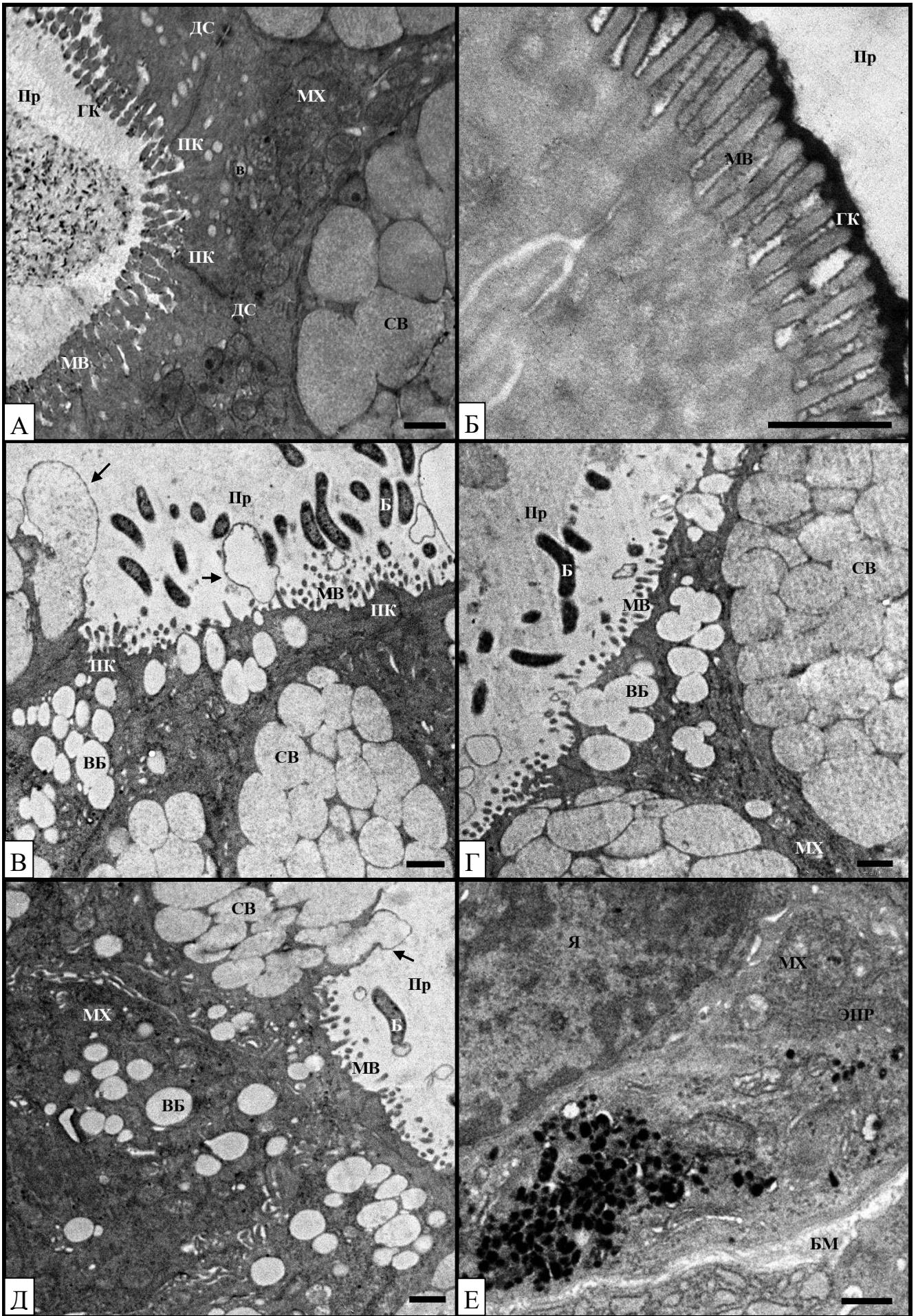


Рисунок 19. Ультраструктура эпителиальной выстилки на границе дистального и медиального отделов ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 с хроническим колитом. А – каемчатые колоноциты с множеством одинаковых микроворсинок и гликокаликсом. В цитоплазме видны мелкие светлые везикулы и множество митохондрий. Справа – часть бокаловидной клетки (тангенциальный срез). Б – поверхность каемчатого колоноцита, микроворсинки длинные, пальцевидной формы, покрыты гликокаликсом. Над поверхностью клетки бактерии. В цитоплазме мелкие светлые везикулы. В, Г, Д – бокаловидные клетки и бескаемчатые колоноциты. В бескаемчатых колоноцитах много светлых вакуолей средних размеров. Встречаются мелкие светлые вакуоли. Над поверхностью клеток небольшое количество бактерий. Е – ЭЭК с электронно-плотными секреторными гранулами. Длина масштабного отрезка 1 мкм

Условные обозначения: Пр – просвет, Б – бактерии, ГК – гликокаликс, МВ – микроворсинки, ПК – плотный контакт, ДС – десмосома МХ – митохондрии, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, СВ – секреторные везикулы бокаловидных клеток, ВБ – везикулы бескаемчатых колоноцитов, в – мелкие везикулы диаметром около 0,2 мкм, Я – ядро, БМ – базальная мембрана. Стрелками указана секреция слизи по апокриновому типу.

4.6.2. Изменение числа энтероэндокринных клеток в разных отделах ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

Мы выявляли ЭЭК по содержанию хромогранина А – небольшого белка, накапливающегося в секреторных гранулах вместе с гормонами, маркера большинства клеток диффузной эндокринной системы. В толстой кишке он содержится в Ес- и L-клетках.

У мышей **контрольной группы** показатель числа хромогранин А-позитивных ЭЭК на крипту возрастал от проксимального к дистальному отделу (рис. 20 К, рис. 21, табл. 20, 21).

При **остром колите** показатель числа хромогранин А-позитивных ЭЭК на крипту в медиальном отделе ободочной кишки был снижен. В дистальном отделе также наблюдалась тенденция к снижению числа ЭЭК, однако статистической значимости различия не достигали, вероятно, в связи с уменьшением числа крипт из-за распространенности язвенного процесса (рис. 20 ОК, рис. 21, табл. 20,21).

По сравнению с острым, при **хроническом колите** показатель числа хромогранин А-позитивных ЭЭК возрастал на всем протяжении ободочной кишки, возвращаясь к контрольным значениям (рис. 20 ХК, рис. 21, табл. 20, 21).

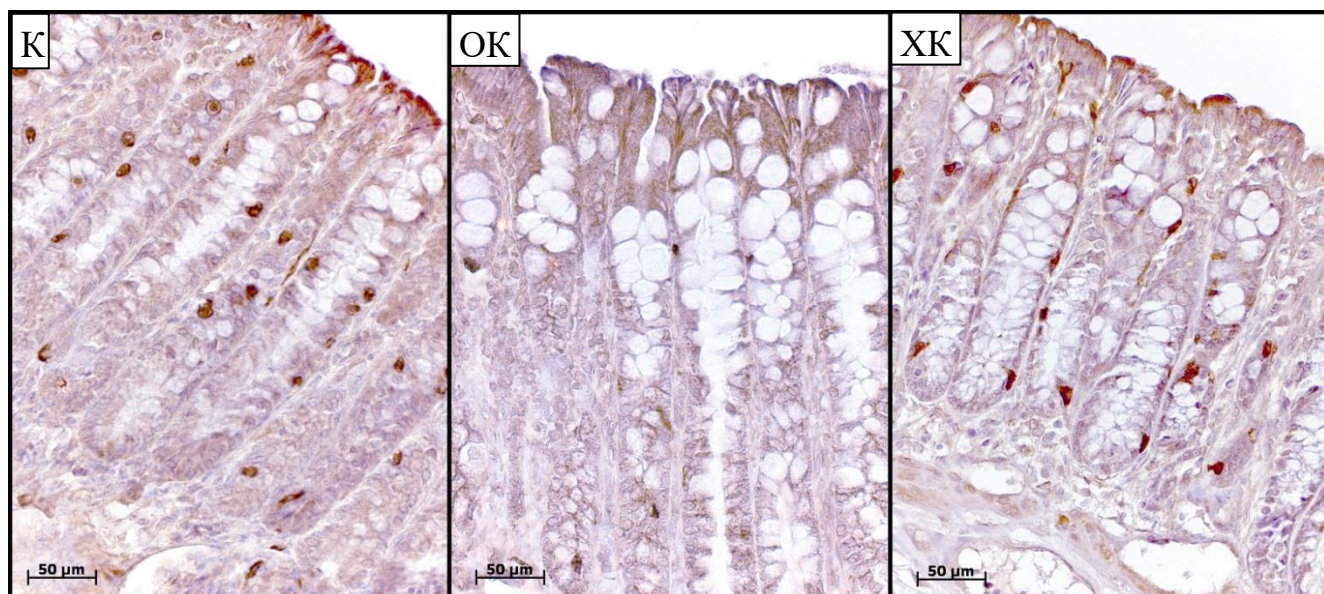


Рисунок 20. Энтероэндокринные клетки в криптах дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите. Иммуногистохимическая реакция с антителами к хромогранину А, докрашено гематоксилином. К – нормальная слизистая оболочка, энтероэндокринных клеток много; ОК – увеличены размеры бокаловидных клеток, энтероэндокринные клетки единичные; ХК – крипты деформированы, много энтероэндокринных клеток

Таблица 20

Количество энтероэндокринных клеток на крипту в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите, Ме (0,25; 0,75)

Экспериментальная группа, число животных	Среднее число ЭЭК на продольном срезе крипты		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	1,92 (1,38; 2,28)	1,53 (0,94; 2,57)	0,89 (0,79; 1,19)
Острый колит, n=8	1,27 (0,99; 1,66)	0,84 (0,74; 0,95)	0,65 (0,61; 0,66)
Хронический колит, n=7	2,52 (2,17; 2,95)	1,57 (1,22; 1,84)	0,80 (0,72; 1,04)

Таблица 21

Достигнутая значимость различий показателей числа энтероэндокринных клеток между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе ободочной кишки (Критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	1,000	0,002	К	-	0,171	0,675
М	1,000	-	0,031	ОК	0,171	-	0,012
П	0,002	0,031	-	ХК	0,675	0,012	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	0,017	1,000	К	-	0,094	1,000
ОК	0,017	-	0,006	ОК	0,094	-	0,041
ХК	1,000	0,006	-	ХК	1,000	0,041	-

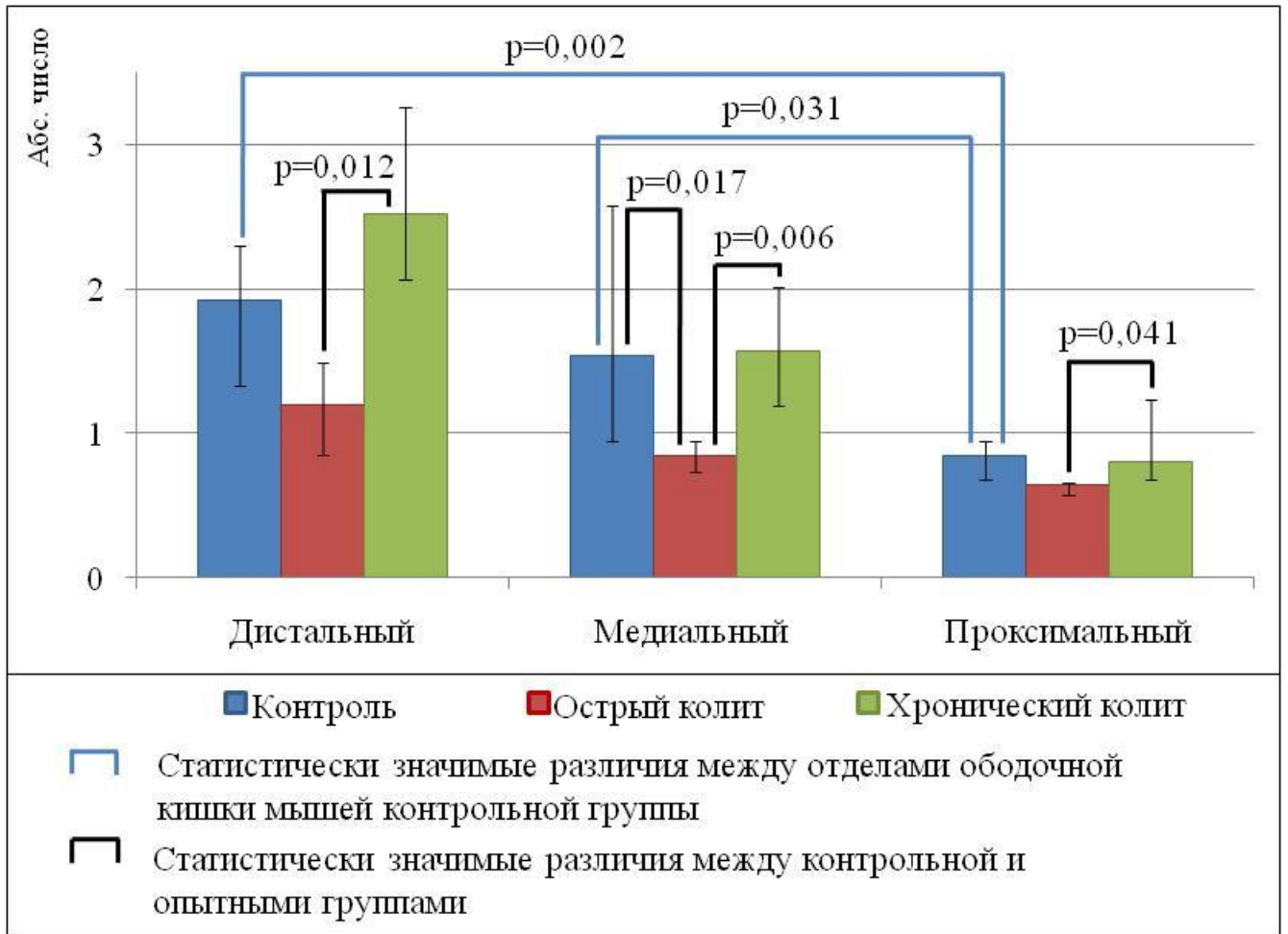


Рисунок 21. Количество энтероэндокринных клеток на крипту в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

4.6.3. Морфологическое и морфометрическое исследование бокаловидных клеток в разных отделах ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

У мышей **контрольной группы** показатель числа бокаловидных клеток на крипту возрастал от проксимального к дистальному отделу, а показатель их объемной доли между отделами не различался. Средняя площадь бокаловидных клеток в медиальном отделе была выше, чем в проксимальном и дистальном. Интенсивность окрашивания высокосульфатированных и нейтральных муцинов в дистальном отделе была выше, чем в медиальном, но их соотношение в сравниваемых трех отделах ободочной кишки не различалось (рис.22 А,Г, рис.23-28, табл. 22-33).

При **остром колите** по сравнению с контрольной группой показатель числа бокаловидных клеток был снижен на всем протяжении ободочной кишки, но их объемная доля - только в дистальном отделе. Во всех отделах возрастала площадь бокаловидных клеток и снижалась интенсивность окрашивания высокосульфатированных муцинов. В дистальном отделе повышалась интенсивность окрашивания нейтральных муцинов и снижалась доля высокосульфатированных муцинов (рис.22 Б, Д, рис.23-28, табл. 22-33).

При **хроническом колите** в дистальном отделе по сравнению с острым колитом повышались показатели числа и объемной доли бокаловидных клеток, а по сравнению с контролем были снижены показатели интенсивности окрашивания и доли высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках. В медиальном отделе все исследуемые параметры возвращались к контрольным значениям. В проксимальном отделе по сравнению с контролем были снижены показатели числа бокаловидных клеток на крипту, интенсивности окрашивания и доли высокосульфатированных муцинов, и повышены показатели площади отдельных бокаловидных клеток и интенсивности окрашивания нейтральных муцинов (рис.22 В, Е, рис.23-28, табл. 22-33).

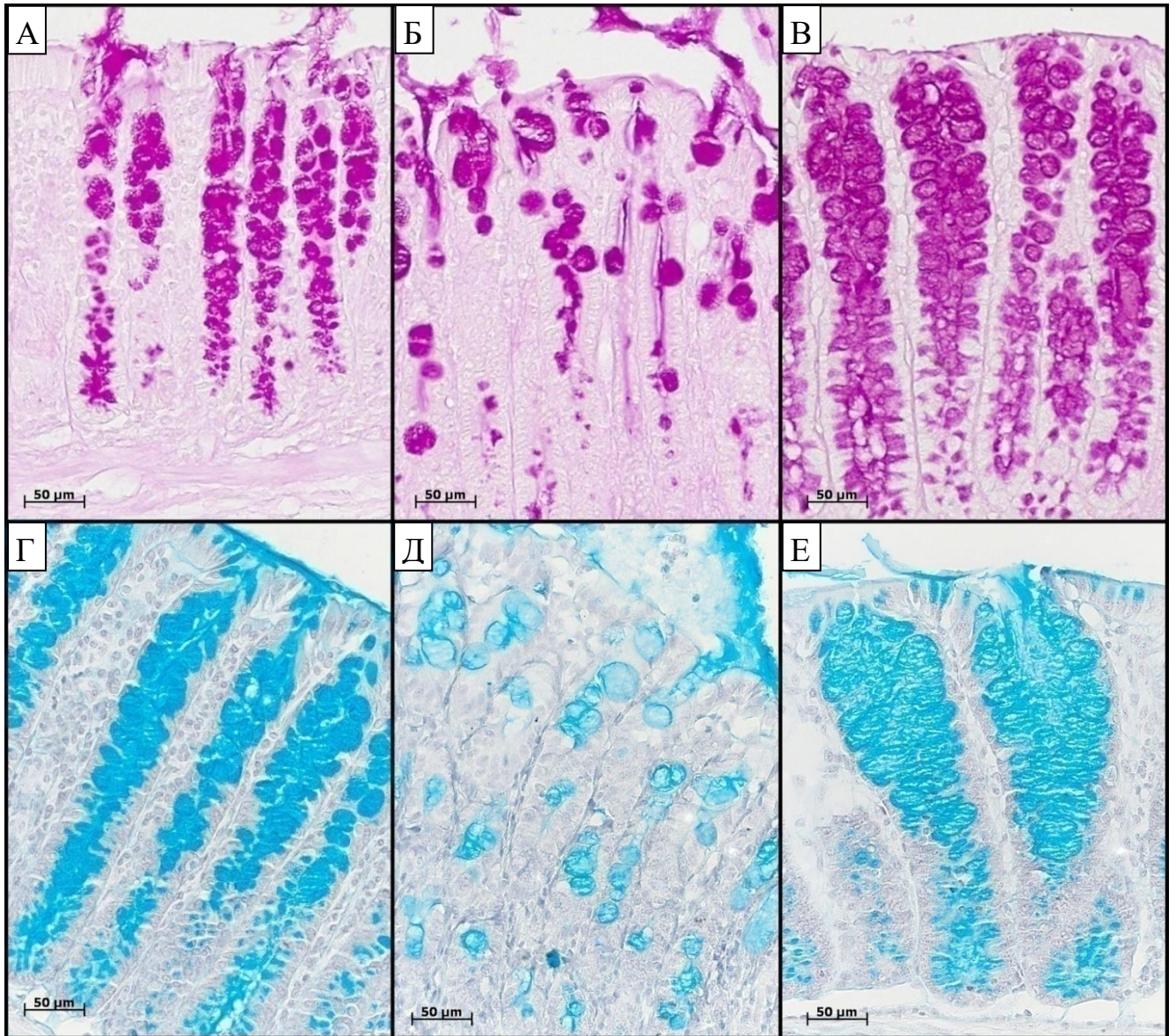


Рисунок 22. Бокаловидные клетки дистального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (А, Г), при остром (Б, Д) и хроническом (В, Е) колите. ШИК-реакция (А-В) и окраска альциановым синим (Г-Е). А, Г – бокаловидных клеток много, они преобладают в верхней половине крипт, размеры секреторных отделов увеличиваются по направлению к просвету кишки, содержимое секреторных гранул интенсивно окрашивается альциановым синим и при ШИК-реакции; Б, Д – число бокаловидных клеток снижено, располагаются по одиночке преимущественно в верхней части крипт, размеры их секреторных отделов резко увеличены, интенсивность окрашивания альциановым синим снижена; В, Е – число бокаловидных клеток и размеры их секреторных отделов нормализуются, крипты расширены

Таблица 22

Показатель числа бокаловидных клеток на крипту в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Me (0,25; 0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Число бокаловидных клеток на продольном срезе крипты		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	18,0 (16,0; 20,0)	15,5 (14,0; 18,0)	13,5 (13,0; 15,75)
Острый колит, n=8	5,5 (5,0; 6,63)	12,25 (10,5; 13,0)	9,75 (8,38; 11,63)
Хронический колит, n=7	15 (13,25; 16,75)	15,5 (11,00; 17,50)	11 (10,50; 12,00)

Таблица 23

Достигнутая значимость различий показателей числа бокаловидных клеток на крипту между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у мышей контрольной группы и между мышами контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	0,670	0,047	К	-	0,0002	0,855
М	0,670	-	0,731	ОК	0,0002	-	0,021
П	0,047	0,731	-	ХК	0,855	0,021	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	0,019	1,000	К	-	0,002	0,043
ОК	0,019	-	0,309	ОК	0,002	-	1,000
ХК	1,000	0,309	-	ХК	0,043	1,000	-

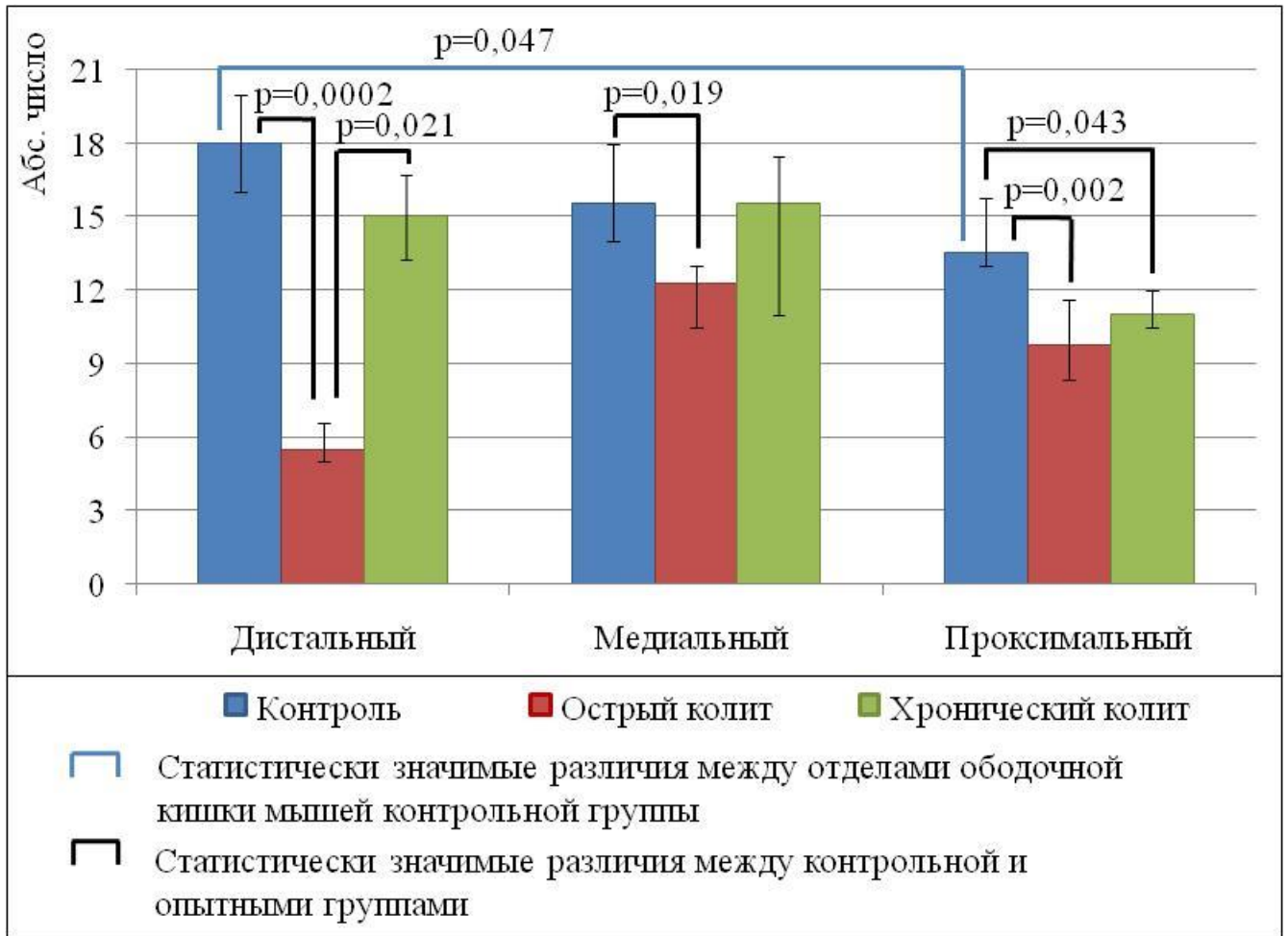


Рисунок 23. Показатель числа бокаловидных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

Таблица 24

Объемная доля бокаловидных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Объемная доля бокаловидных клеток, %		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	28,83 (26,71; 30,76)	36,02 (32,65; 37,18)	31,25 (28,58; 36,23)
Острый колит, n=8	16,23 (7,91; 18,31)	24,18 (18,46; 42,71)	26,86 (25,21; 39,21)
Хронический колит, n=7	35,60 (28,84; 39,69)	29,89 (27,27; 35,69)	28,38 (27,12; 35,32)

Таблица 25

Достигнутая значимость различий показателей объемной доли бокаловидных клеток между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у мышей контрольной группы и между мышами контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	0,124	0,160	К	-	0,004	1,000
М	0,124	-	1,000	ОК	0,004	-	0,0005
П	0,160	1,000	-	ХК	1,000	0,0005	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	К	ОК	К	-	0,995	1,000
ОК	К	-	0,867	ОК	0,995	-	1,000
ХК	ОК	0,867	-	ХК	1,000	1,000	-

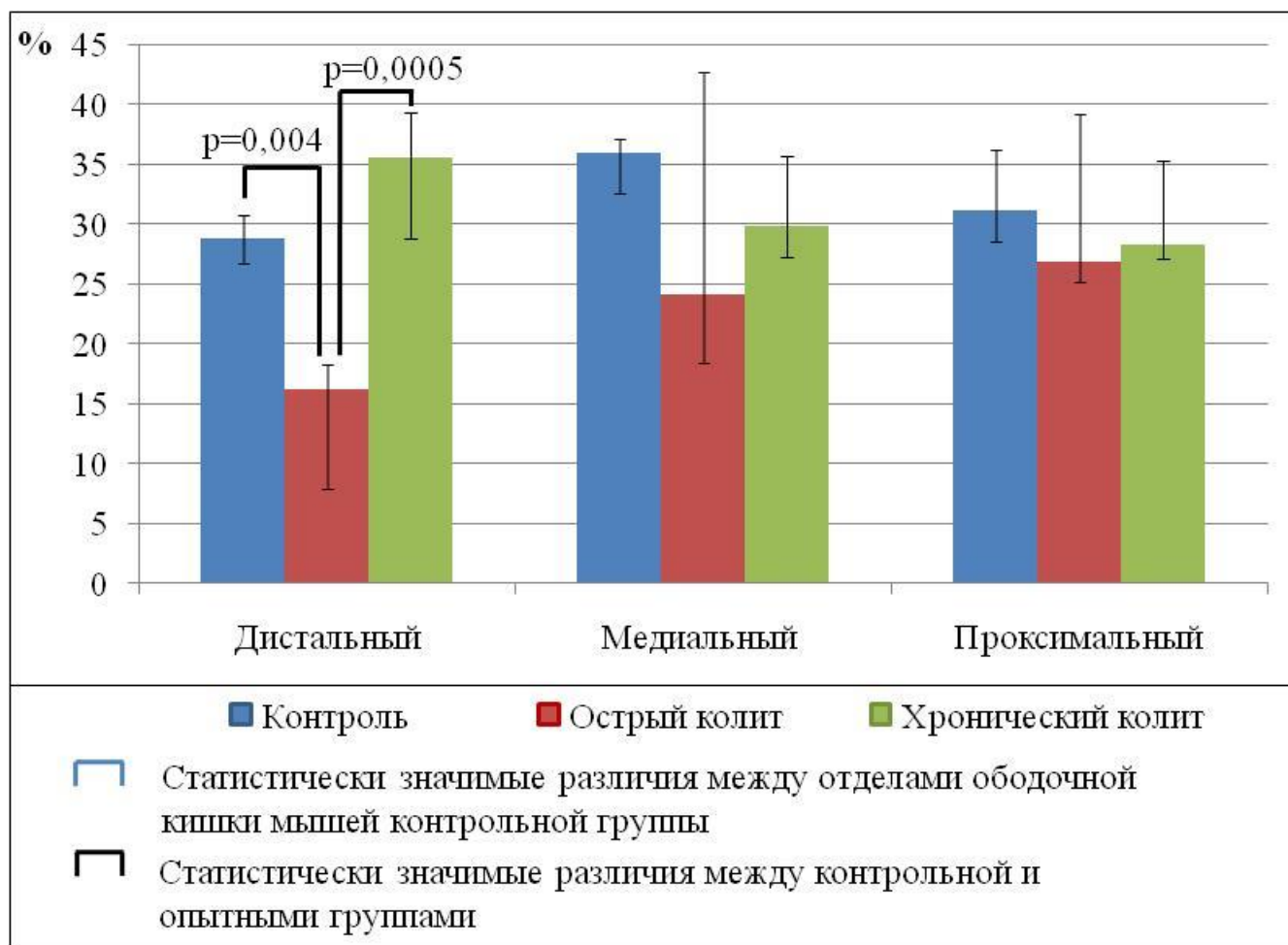


Рисунок 24. Показатели объемной доли бокаловидных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

Таблица 26

Площадь бокаловидных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Площадь отдельных бокаловидных клеток на гистологических срезах, мкм ²		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	16,76 (14,35; 20,49)	25,23 (22,06; 25,57)	15,36 (13,35; 16,80)
Острый колит, n=8	28,53 (25,58; 31,77)	41,73 (39,48; 45,00)	22,62 (20,18; 25,47)
Хронический колит, n=7	18,24 (17,05; 19,95)	28,66 (23,49; 32,15)	20,24 (18,68; 21,18)

Таблица 27

Достигнутая значимость различий показателей площади бокаловидных клеток между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у мышей контрольной группы и между мышами контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	0,045	0,615	К	-	0,001	1,000
М	0,045	-	0,001	ОК	0,001	-	0,007
П	0,615	0,001	-	ХК	1,000	0,007	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	0,001	0,911	К	-	0,0002	0,026
ОК	0,001	-	0,022	ОК	0,0002	-	0,770
ХК	0,911	0,022	-	ХК	0,026	0,770	-

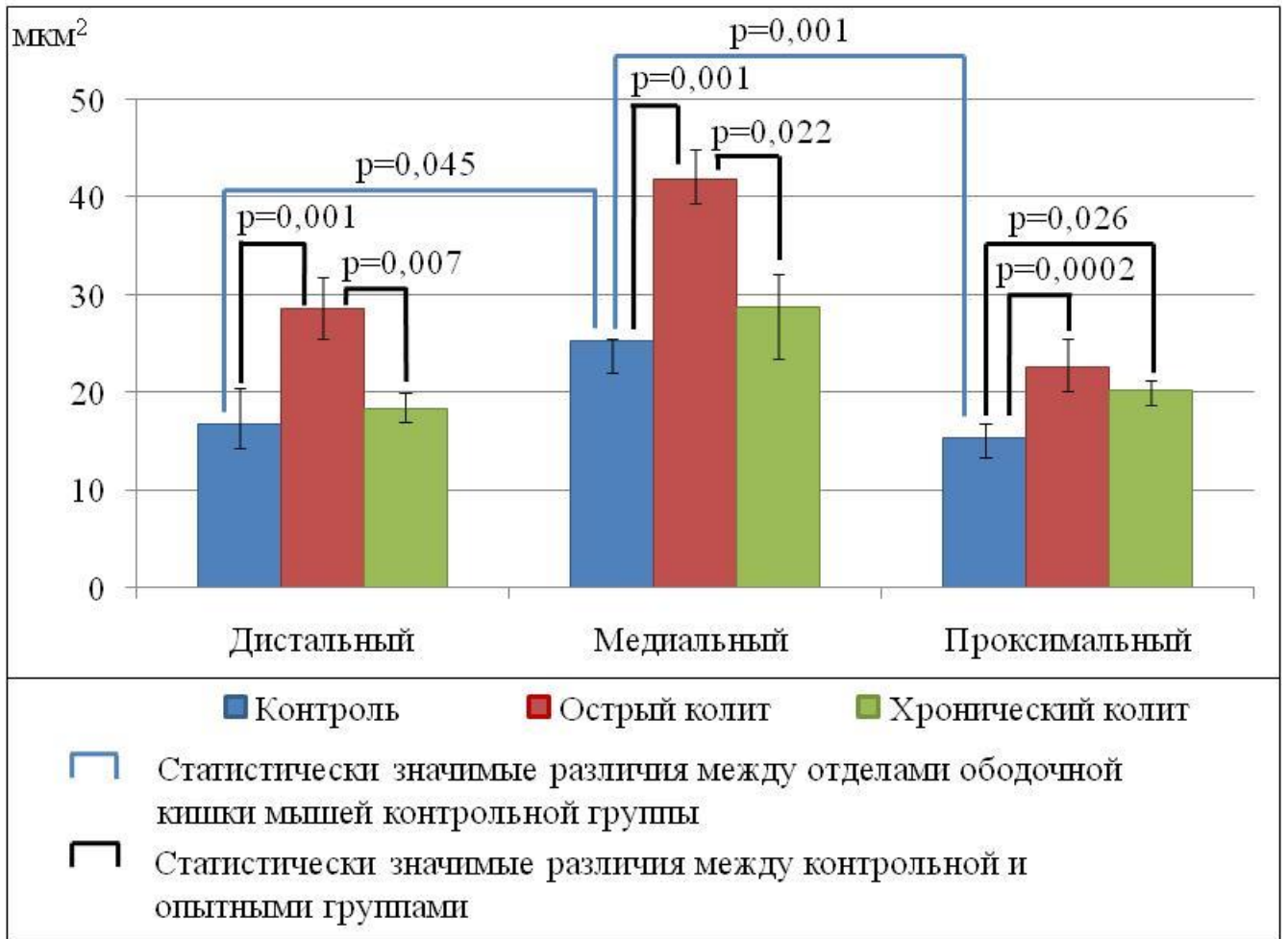


Рисунок 25. Показатели площади бокаловидных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

Таблица 28

Интенсивность окрашивания альциановым синим (АС) бокаловидных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите.

Me (0,25; 0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Интенсивность окрашивания АС (усл. ед.)		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	3,03 (2,84; 3,26)	2,33 (2,02; 2,56)	2,84 (2,55; 2,96)
Острый колит, n=8	2,18 (2,13; 2,45)	1,51 (1,44; 1,53)	2,16 (2,07; 2,25)
Хронический колит, n=7	2,28 (2,18; 2,40)	1,70 (1,69; 2,58)	1,97 (1,87; 2,19)

Таблица 29

Достигнутая значимость различий показателей интенсивности окрашивания альциановым синим бокаловидных клеток между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у мышей контрольной группы и между мышами контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	0,002	0,299	К	-	0,003	0,004
М	0,002	-	0,100	ОК	0,003	-	1,000
П	0,299	0,100	-	ХК	0,004	1,000	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	0,008	1,000	К	-	0,012	0,001
ОК	0,008	-	0,050	ОК	0,012	-	1,000
ХК	1,000	0,050	-	ХК	0,001	1,000	-

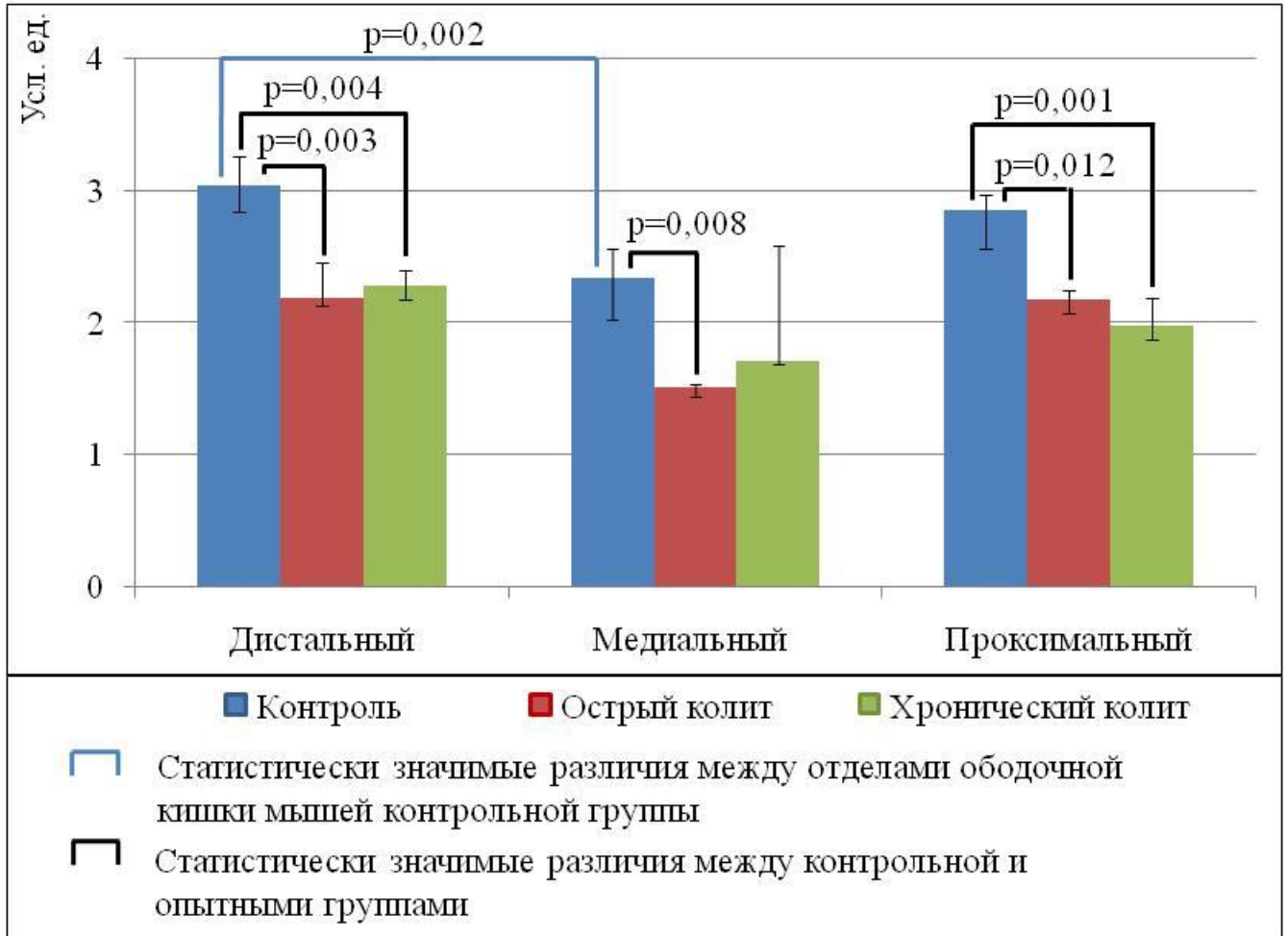


Рисунок 26. Показатели интенсивности окрашивания бокаловидных клеток альциановым синим в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Me (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

Таблица 30

Интенсивность ШИК-реакции в бокаловидных клетках в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Интенсивность ШИК-реакции (усл. ед.)		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	8,36 (8,29; 8,85)	6,59 (6,44; 7,05)	7,78 (7,28; 8,19)
Острый колит, n=8	10,41 (9,67; 11,04)	4,75 (4,42; 4,97)	8,44 (7,67; 8,83)
Хронический колит, n=7	9,29 (9,19; 10,78)	7,64 (6,85; 7,83)	9,68 (9,66; 9,92)

Таблица 31

Достигнутая значимость различий показателей интенсивности ШИК-реакции в бокаловидных клетках между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у мышей контрольной группы и между мышами контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	0,001	0,275	К	-	0,003	0,156
М	0,001	-	0,117	ОК	0,003	-	0,861
П	0,275	0,117	-	ХК	0,156	0,861	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	0,127	0,977	К	-	1,000	0,003
ОК	0,127	-	0,009	ОК	1,000	-	0,040
ХК	0,977	0,009	-	ХК	0,003	0,040	-

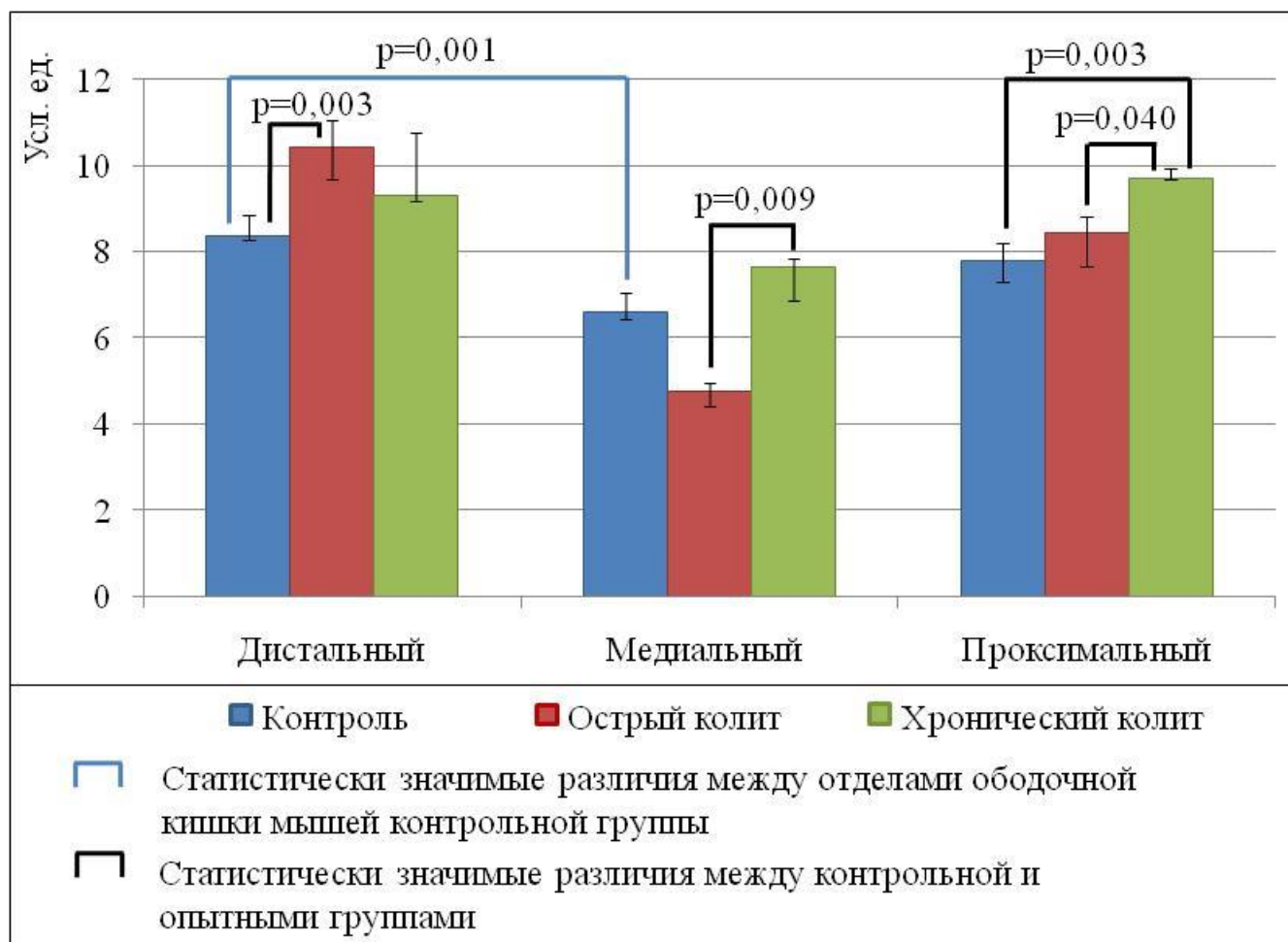


Рисунок 27. Показатели интенсивности ШИК-реакции в бокаловидных клетках в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

Таблица 32

Показатель соотношения высокосульфатированных и нейтральных муцинов (отношение интенсивностей окрашивания альциановым синим и ШИК-реакции) в бокаловидных клетках в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Me (0,25; 0,75).

Экспериментальная группа, число животных	Показатель соотношения высокосульфатированных и нейтральных муцинов		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Контроль, n=10	0,36 (0,34; 0,41)	0,36 (0,30; 0,41)	0,35 (0,31; 0,38)
Острый колит, n=8	0,22 (0,21; 0,23)	0,31 (0,30; 0,33)	0,27 (0,27; 0,28)
Хронический колит, n=7	0,23 (0,23; 0,24)	0,26 (0,25; 0,32)	0,20 (0,18; 0,23)

Таблица 33

Достигнутая значимость различий показателей соотношения высокосульфатированных и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках между дистальным (Д), медиальным (М) и проксимальным (П) отделами ободочной кишки у мышей контрольной группы и между мышами контрольной группы (К) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом в каждом отделе (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

Контрольная группа				Дистальный отдел			
	Д	М	П		К	ОК	ХК
Д	-	1,000	1,000	К	-	0,003	0,028
М	1,000	-	1,000	ОК	0,003	-	1,000
П	1,000	1,000	-	ХК	0,028	1,000	-
Медиальный отдел				Проксимальный отдел			
	К	ОК	ХК		К	ОК	ХК
К	-	1,000	0,453	К	-	0,119	0,003
ОК	1,000	-	1,000	ОК	0,119	-	0,645
ХК	0,453	1,000	-	ХК	0,003	0,645	-

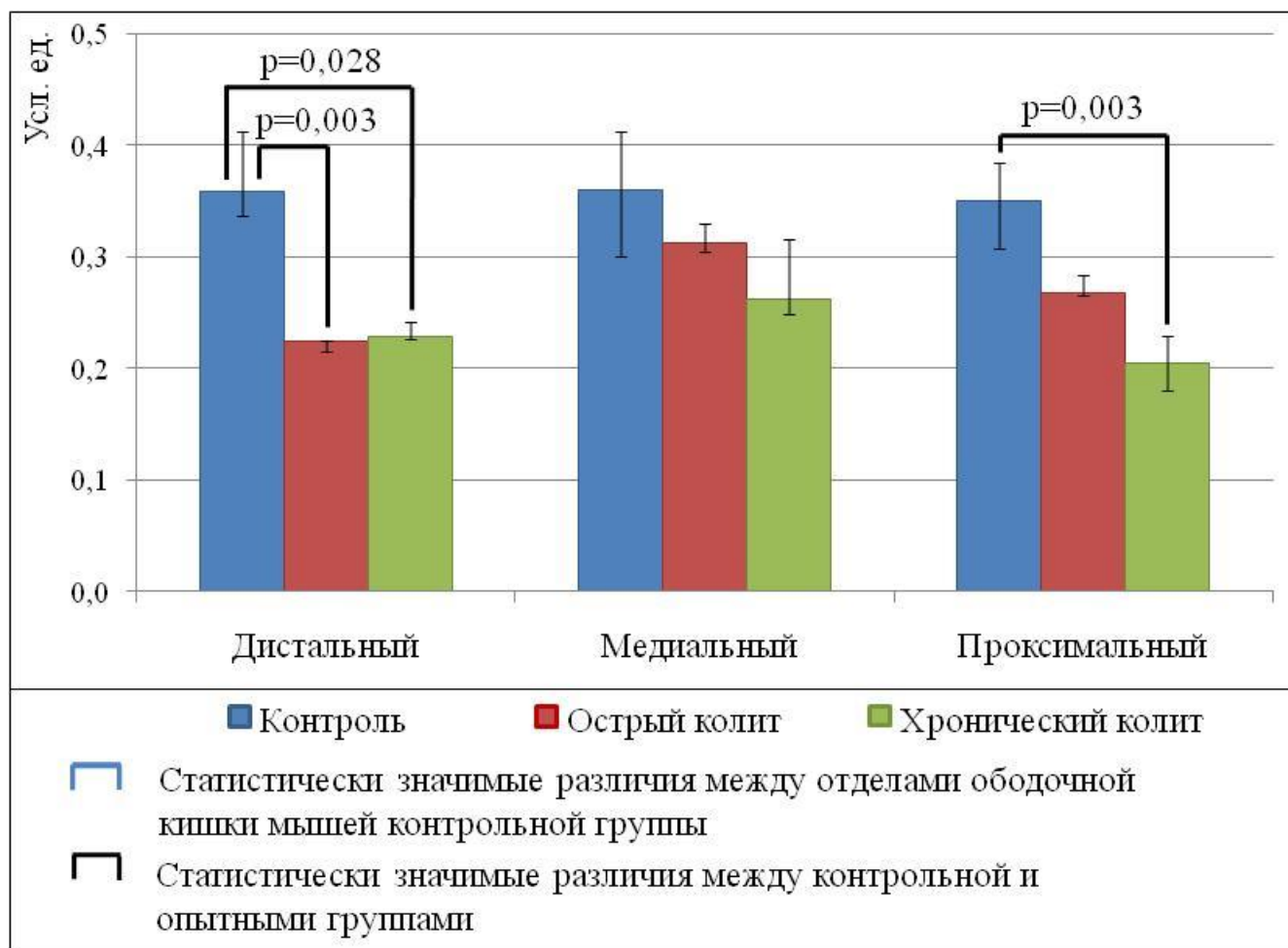


Рисунок 28. Показатель соотношения высокосульфатированных и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы и при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

4.6.4. Исследование экспрессии мРНК секреторного муцина *Muc2* и трансмембранных муцинов *Muc1*, *Muc3* и *Muc13* в медиальном отделе ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

Мы исследовали изменение экспрессии основного структурного компонента слизи – муцина MUC2 и трех трансмембранных муцинов, входящих в состав кликокаликса эпителиальных клеток ободочной кишки: MUC1, MUC3 и MUC13.

При **остром колите** статистически значимо снижался уровень мРНК муцина *Muc3* (рис.29, табл. 34, 35).

При **хроническом колите** по сравнению с контрольной группой статистически значимо возрастал уровень мРНК муцинов *Muc1* и *Muc2*, а уровень *Muc13* снижался. По сравнению с острым колитом статистически значимых изменений не выявлено (рис.29, табл. 34, 35).

Таблица 34

Уровень мРНК муцинов *Muc1*, *Muc2*, *Muc3* и *Muc13* в медиальном отделе ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К) и при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите, Ме (0,25; 0,75)

Эксп. группа, число животных	Уровень мРНК исследуемого гена относительно уровня мРНК β -актина			
	<i>Muc1</i>	<i>Muc2</i>	<i>Muc3</i>	<i>Muc13</i>
К, n=4	3,2 x10 ⁻⁵ (2,4 x10 ⁻⁵ ; 3,9 x10 ⁻⁵)	0,0019 (0,0013; 0,0021)	0,020 (0,019; 0,023)	0,0071 (0,07; 0,11)
ОК, n=3	6,7 x10 ⁻⁵ (5,7 x10 ⁻⁵ ; 7,7 x10 ⁻⁵)	0,0037 (0,0033; 0,0040)	0,009 (0,005; 0,012)	0,0045 (0,13; 0,21)
ХК, n=5	9,9 x10 ⁻⁵ (5,5 x10 ⁻⁵ ; 21 x10 ⁻⁵)	0,0045 (0,0037; 0,0058)	0,017 (0,011; 0,025)	0,0034 (0,14; 0,18)

Таблица 35

Различия показателей уровня мРНК муцинов *Muc1*, *Muc2*, *Muc3* и *Muc13* в медиальном отделе ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

<i>Muc1</i>	К	ОК	ХК	<i>Muc2</i>	К	ОК	ХК
К	-	0,233	0,047	К	-	0,151	0,004
ОК	0,233	-	1,000	ОК	0,151	-	1,000
ХК	0,047	1,000	-	ХК	0,004	1,000	-
<i>Muc3</i>	К	ОК	ХК	<i>Muc13</i>	К	ОК	ХК
К	-	0,023	1,000	К	-	1,000	0,043
ОК	0,023	-	0,221	ОК	1,000	-	0,565
ХК	1,000	0,221	-	ХК	0,043	0,565	-

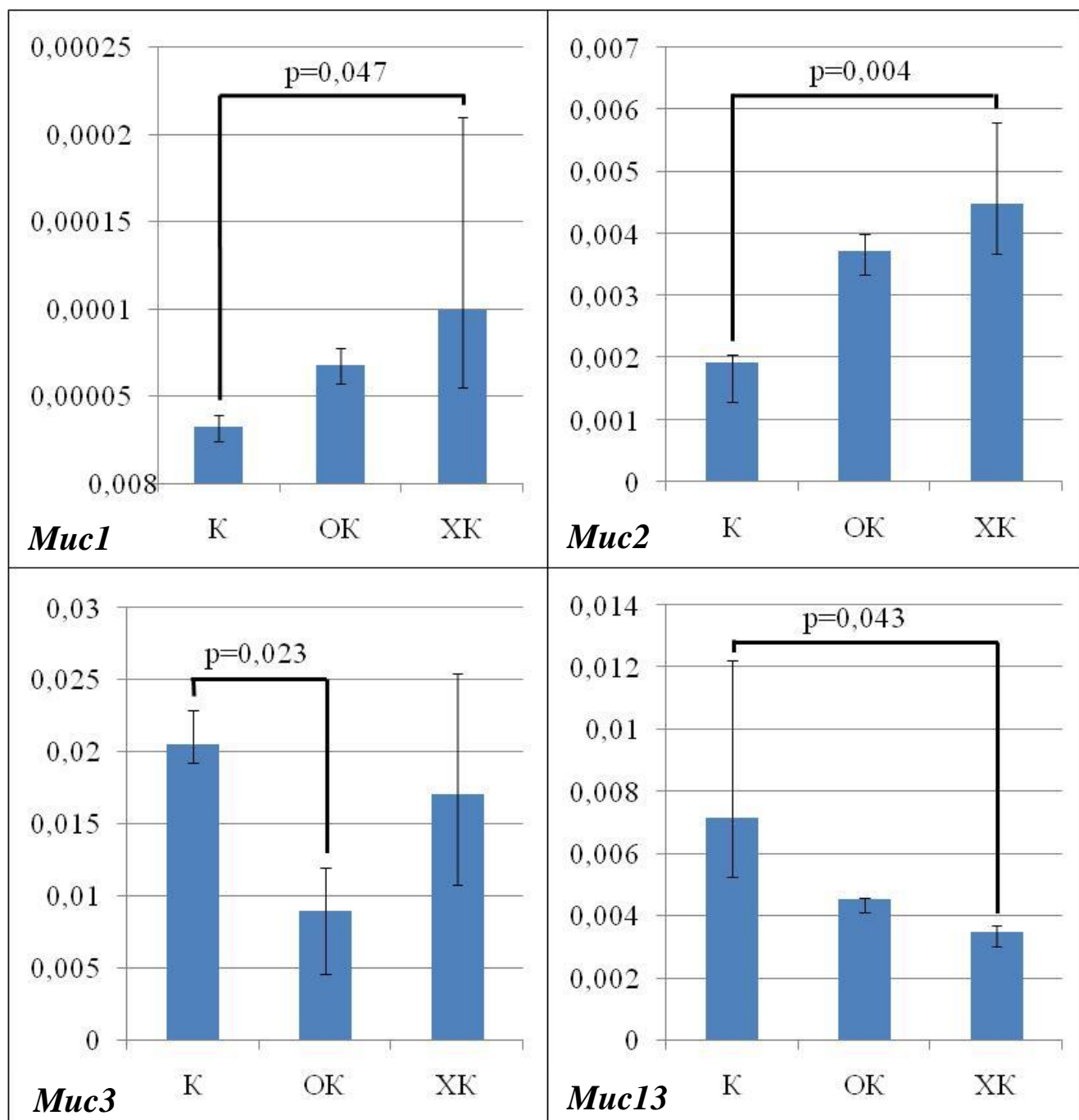


Рисунок 29. Изменения экспрессии мРНК секреторного муцина *Muc2* и трансмембранных муцинов *Muc1*, *Muc3* и *Muc13* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К) и при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите, Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий. По оси ординат отмечено отношение количества мРНК исследуемого гена к мРНК β -актина в пробе.

4.6.5. Изменение экспрессии мРНК белков плотных контактов клаудинов CLDN2 и CLDN4 в медиальном отделе ободочной кишки в норме и при экспериментальном остром и хроническом колите

Мы исследовали изменение экспрессии «порообразующего» клаудина, повышающего проницаемость плотных контактов – CLDN2, и «запирающего» снижающего проницаемость плотных контактов – CLDN4.

При остром колите уровень мРНК «порообразующего» *Cldn2* в медиальном отделе ободочной кишки статистически значимо возрастает. Показатель уровня «запирающего» *Cldn4* не отличается от контрольных значений (рис.30, табл. 37, 37).

При хроническом колите уровень мРНК *Cldn2* остается выше чем у животных контрольной группы и не отличается от соответствующих значений при остром колите. Продукция *Cldn4* не изменяется (рис.30, табл. 36,37).

Таблица 36

Изменения уровня мРНК белков плотных контактов клаудинов *Cldn2* и *Cldn4* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром и хроническом колите. Ме (0,25; 0,75)

Экспериментальная группа, число животных	Уровень мРНК исследуемого гена относительно уровня мРНК β -актина	
	<i>Cldn2</i>	<i>Cldn4</i>
Контроль, n=4	0,0009 (0,0005; 0,0011)	0,10 (0,09; 0,13)
Острый колит, n=3	0,0041 (0,0030; 0,0056)	0,16 (0,10; 0,22)
Хронический колит, n=5	0,0030 (0,0022; 0,0048)	0,16 (0,13; 0,20)

Таблица 37

Достигнутая значимость различий показателей уровня мРНК белков плотных контактов клаудинов *Cldn2* и *Cldn4* в медиальном отделе ободочной кишки самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К), при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите (критерий Крускала-Уоллиса, multiple comparisons of mean ranks for all groups)

<i>Cldn2</i>	К	ОК	ХК	<i>Cldn4</i>	К	ОК	ХК
Контроль	–	0,005	0,010	Контроль	–	0,836	0,145
Острый колит	0,005	–	1,000	Острый колит	0,836	–	1,000
Хронический колит	0,010	1,000	–	Хронический колит	0,145	1,000	–

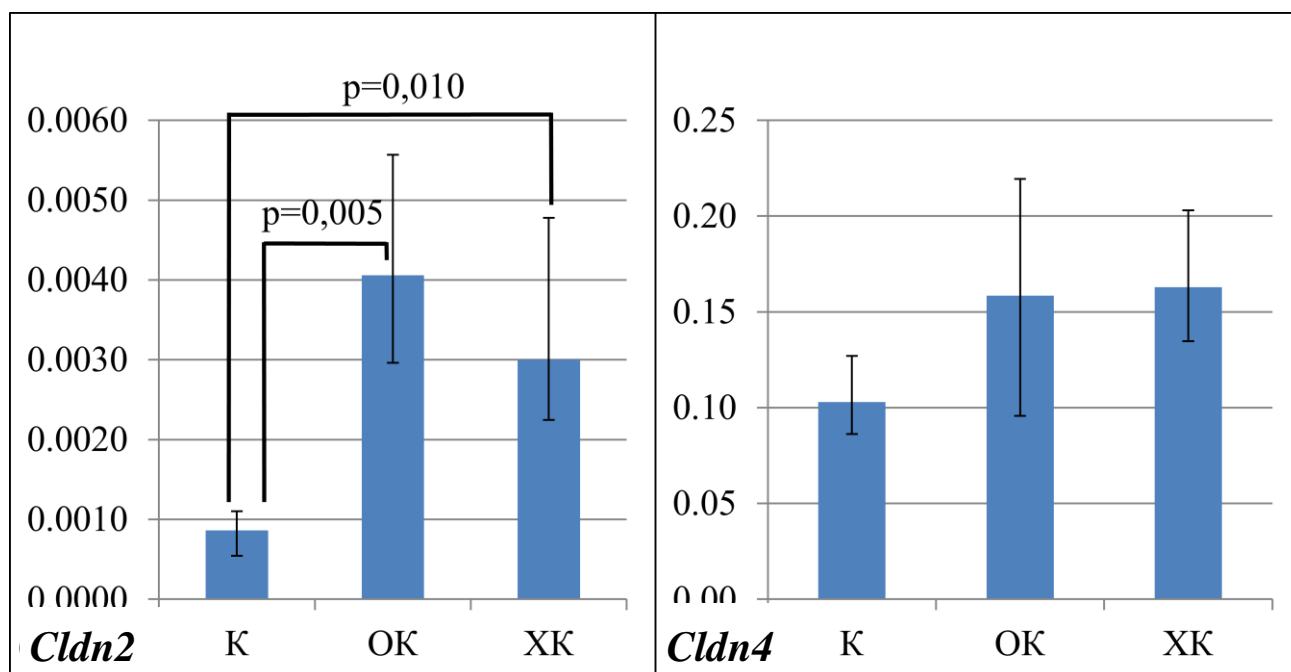


Рисунок 30. Изменения экспрессии мРНК белков плотных контактов клаудинов *Cldn2* и *Cldn4* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы (К) и при остром (ОК) и хроническом (ХК) колите, Me (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий. По оси ординат отмечено отношение количества мРНК исследуемого гена к мРНК β -актина в пробе.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эпителиальный барьер толстой кишки создает механический барьер для бактерий и крупных молекул, участвует в регуляции иммунных реакций и состава комменсальной микрофлоры, таким образом препятствуя проникновению бактерий и токсических веществ во внутреннюю среду организма и предотвращая развитие воспалительного процесса. Нарушение структуры и функции эпителиального барьера, как предполагается, лежит в основе патогенеза ЯК – распространенного хронического рецидивирующего воспалительного заболевания толстой кишки (Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M., 2014; Peterson L.W., Artis D., 2014; Ивашкин В.Т. и соавт. 2017).

ЯК у человека поражает толстую кишку не равномерно. На ранних стадиях язвенно-воспалительный процесс развивается в дистальном отделе, а на поздних он может распространяться на все отделы толстой кишки (van der Post S., Hansson G.C., 2014; Koutroubakis I.E., 2010). Однако работ, изучающих региональные особенности толстой кишки как в норме, так и при колите крайне мало. В связи с этим, первый раздел обсуждения посвящен морфофункциональным различиям медиального, проксимального и дистального отделов ободочной кишки у мышей C57BL/6 контрольной группы, а второй – различиям между отделами ободочной кишки при остром и хроническом ДСН-колите.

ЯК – хроническое заболевание и его редко удается диагностировать на ранних стадиях (Ткачев А.В. и др. 2012). В связи с этим хронический ДСН-колит является более адекватной моделью ЯК, чем острый. Литературных данных по хроническому ДСН-колиту мал они фрагментарны, кроме того в работах значительно различаются схемы его индукции. Важной проблемой для понимания патогенеза ЯК являются механизмы хронизации воспалительного процесса, однако работы, в которых проведено сравнение острого и хронического ДСН-колита, единичны. В связи с этим, в качестве экспериментальных животных были выбраны мыши линии C57BL/6: по литературным данным у этих животных воспалительный процесс в кишке хронизируется уже после одного цикла

потребления раствора ДСН (Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. 2005), что позволяет воспроизводить острый и хронический колит по единой схеме и рассматривать острый колит как стадию развития хронического. Третий раздел обсуждения посвящен изменениям эпителиального барьера ободочной кишки при остром колите по сравнению с контрольной группой, четвертый – изменениям эпителиального барьера ободочной кишки при хроническом колите по сравнению с контрольной группой, а пятый – хронизации воспалительного процесса: сравнению острого и хронического колита.

Морфофункциональные различия дистального, медиального и проксимального отделов ободочной кишки у мышей контрольной группы

При исследовании разных отделов ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы были выявлены цитофизиологические различия секреторных клеток. Показатель числа бокаловидных клеток в дистальном отделе был выше, чем в проксимальном, однако объемная доля бокаловидных клеток не различалась между отделами. Размеры бокаловидных клеток в медиальном отделе были выше, чем в проксимальном и дистальном. Содержание муцинов, как нейтральных, так и высокосульфатированных, в бокаловидных клетках в дистальном отделе было выше, чем в медиальном, но соотношение высокосульфатированных и нейтральных муцинов в трех сравниваемых отделах ободочной кишки не различалось. Показатель числа ЭЭК в дистальном и медиальном отделах был выше, чем в проксимальном.

По литературным данным дистальный и проксимальный отделы толстой кишки различаются по источнику развития, экспрессии ряда генов, кровоснабжению, метаболизму, абсорбционной активности, количественному и качественному составу микрофлоры (Glebov O.K et al., 2003, van der Post S., Hansson G.C., 2014). Однако сведения о цитофизиологических особенностях секреторных клеток в разных отделах толстой кишки не многочисленны. Известно, что число бокаловидных клеток в толстой кишке у человека повышается от проксимального к дистальному отделу (Montgomery E.A., Voltaggio L., 2012), и в этом же направлении возрастает толщина слоя слизи, продуцируемого

бокаловидными клетками (Matsuo K. et al., 1997). Эти данные согласуются с полученными нами. Т. Sakata и W. von Engelhardt (1981) показали, что у мышей (*Mus Musculus*), крыс (*Rattus Rattus*) и морских свинок (*Cavia porcellus*) от слепой кишки к дистальному отделу толстой кишки содержание в эпителии нейтральных муцинов уменьшается, а высокосульфатированных – увеличивается. В ряде статей показано, что в дистальном отделе толстой кишки у человека экспрессируются преимущественно кислые муцины, а в проксимальном – нейтральные (Iacopetta B., 2002; Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump B.F., 1982). Соотношение кислых и нейтральных муцинов косвенно характеризует стабильность слизи. Кислые муцины более устойчивы к разрушению бактериальными ферментами (Deplancke B., Gaskins H.R., 2001). Вероятно, отсутствие различий у мышей C57BL/6 соотношения высокосульфатированных и нейтральных муцинов в дистальном и проксимальном отделах ободочной кишки отражает недостаточную эффективность у них слизистого барьера в дистальном отделе, что, возможно, является одной из причин более высокой чувствительности этой линии мышей к ДСН, развитию колита и хронизации воспалительного процесса по сравнению с многими другими линиями мышей (Mähler M. et al., 1998 Melgar S., Karlsson A., Michaëlsson E., 2005)

Число ЭЭК на крипту в эпителиальной выстилке ободочной кишки у мышей C57BL/6 возрастало от проксимального к дистальному отделу. Литературные данные о распределении ЭЭК по длине толстой кишки противоречивы. Так, по данным С.В. Костюкевича (2004) и G.Peranzi & T. Lehy (1984), в эпителиальной выстилке толстой кишки у человека, кролика, крысы, свиньи, коровы, кошки и обезьяны количество ЭЭК увеличивается в каудальном направлении. Напротив, Е.А.Тихонов и соавт. (2016) показал, что у крыс число ЭЭК в проксимальном отделе ободочной кишки выше, чем в дистальном. В ряде исследований не было выявлено различий между отделами ободочной кишки у человека по числу ЭЭК, но было показано значительное увеличение их количества в прямой кишке (Cristina M.L. et al., 1978; El-Salhy M et al., 1997; Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump B.F., 1982; Sjölund K et al., 1983). Противоречивость данных, вероятно,

связана с разными методиками выявления ЭЭК, оценки их количества, а также меж- и внутривидовыми различиями.

Таким образом, у самцов мышей C57BL/6 контрольной группы выявлен ряд цитофизиологических различий бокаловидных и ЭЭК между дистальным, медиальным и проксимальным отделами ободочной кишки. Данные различия, очевидно, обусловлены различиями в источнике развития, строении, функции и составе микрофлоры между отделами.

Морфологические различия нарушений эпителиального барьера и воспалительных реакций в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом колите

При экспериментальном остром и хроническом колите выявлен ряд различий воспалительного процесса и реакции эпителиального барьера между отделами ободочной кишки. Распространенность язвенного и воспалительного процессов при остром колите была статистически значимо выше в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным. При хроническом колите по распространенности язвенного процесса между отделами различий не выявлено, а распространенность воспалительного процесса в СПСО и ПО, как и при остром колите, возрастала от проксимального к дистальному отделу. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными по ЯК у человека: на начальной стадии ЯК поражается, как правило, дистальный отдел толстой кишки, а затем патологический процесс постепенно распространяется в проксимальном направлении (van der Post S., Hansson G.C., 2014; Koutroubakis IE., 2010).

Кроме того, между отделами ободочной кишки выявлены различия по выраженности изменений секреторных клеток при остром и хроническом колите. При остром колите изменения бокаловидных клеток в разных отделах ободочной кишки однонаправленные, однако наибольшее число статистически значимых изменений наблюдается в дистальном отделе (табл. 38), что коррелирует с наибольшей выраженностью язвенно-воспалительного процесса. При

хроническом колите изменения в разных отделах также однонаправленные, но наибольшее число статистически значимых изменений параметров бокаловидных клеток наблюдается в проксимальном отделе (табл. 38), хотя воспалительный процесс здесь наименее выражен. Статистически значимое изменение числа ЭЭК наблюдаются только в медиальном отделе при остром колите, хотя по числу ЭЭК в норме и выраженности язвенно-воспалительного процесса при остром колите медиальный отдел занимает промежуточное положение между дистальным и проксимальным отделами. Однако на качественном уровне и по данным морфометрии в дистальном отделе также наблюдается тенденция к снижению числа ЭЭК, но статистической значимости различие не достигает, вероятно, в связи с небольшим числом ЭЭК в норме и малым числом сохраненных крипт в дистальном отделе ободочной кишки из-за высокой распространенности язвенного процесса. Литературные данные о различии изменений секреторных клеток между отделами ободочной кишки как при экспериментальном колите, так и при ЯК у человека отсутствуют.

Таблица 38

Изменения секреторных клеток в разных отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром (**красным**) и хроническом (**зеленым**) колите по сравнению с контрольной группой (собственные данные)

Параметры	Отдел ободочной кишки		
	Дистальный	Медиальный	Проксимальный
Число ЭЭК	= =	↓ =	= =
Число БК	↓ =	↓ =	↓ ↓
Объемная доля БК	↓ =	= =	= =
Размеры БК	↑ =	↑ =	↑ ↑
Нейтральные муцины	↑ =	= =	= ↑
Сульфомуцины	↓ ↓	↓ =	↓ ↓
Сульфатированные/нейтральные	↓ ↓	= =	= ↓

↑ – возрастает, ↓ – снижается, = – не изменяется

Таким образом, при остром и хроническом колите у самцов мышей C57BL/6 наблюдаются разные по выраженности морфологические и гистохимические изменения СО ободочной кишки. Морфологические и гистохимические изменения бокаловидных клеток при остром колите наиболее выражены в дистальном отделе, что соответствует наибольшей выраженности здесь язвенно-воспалительного процесса. При хроническом колите наибольшее число статистически значимых отличий параметров бокаловидных клеток от контрольных значений наблюдается в проксимальном отделе, хотя воспалительный процесс здесь наименее выражен. Возможно, эти изменения вносят вклад в прогрессирование колита и его распространение в проксимальном направлении при длительном течении заболевания. Статистически значимое изменение числа ЭЭК отмечается только в медиальном отделе при остром колите, что не соответствует выраженности язвенного и воспалительного процессов. В целом, на основе полученных данных можно сделать вывод о том, что в патологический процесс при остром и хроническом колите в той или иной степени вовлечены все отделы ободочной кишки, причем изменения отдельных параметров секреторных клеток не коррелируют с выраженностью язвенно-воспалительного процесса.

Изменения эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном остром колите по сравнению с контрольной группой

Клинические и морфологические проявления острого колита. У самцов мышей C57BL/6, потреблявших 1% ДСН в течение 5-и сут., на 3-7-ые сут. эксперимента развивается диарея с примесью крови, на 7-ые сут. эксперимента отмечаются нарушение общего состояния, болевая поза, снижение массы тела и длины ободочной кишки. При гистологическом исследовании ободочной кишки животных с острым колитом выявлялись обширные острые язвы, распространяющиеся до мышечной пластинки, воспалительная инфильтрация СПСО и ПО, преимущественно, из нейтрофилов и лимфоцитов, единичные крипт-

абсцессы, снижение числа и увеличение размеров бокаловидных клеток. В области язв наблюдался очаговый фиброз СПСО.

По литературным данным при остром ДСН-индуцированном колите наблюдается значительное снижение массы тела по сравнению с начальным весом, жидкий стул иногда с примесью крови, укорочение ободочной кишки, появление в ней язв, потеря крипт, выраженная воспалительная инфильтрация СО, снижение числа и гиперсекреция бокаловидных клеток и крипт-абсцессы (Kim JJ et al., 2012, Hans W. et al., 2000, Hall L.J. et al., 2011). Обострение ЯК у человека характеризуется диареей, кишечными кровотечениями, болями в животе, снижением массы тела, слабостью, на микроскопическом уровне – выраженной воспалительной инфильтрацией СО толстой кишки лимфоцитами, плазмócитами и нейтрофилами; наличием эрозий, язв, криптитов и крипт-абсцессов; снижением числа бокаловидных клеток (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012; Ткачев А.В. и др., 2012).

По нашим данным, при остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН распространенность язв и воспалительного процесса в СПСО и ПО в дистальном отделе была статистически значимо выше, чем в проксимальном. В дистальном отделе ободочной кишки около половины длины среза занимали язвы, а воспалительный инфильтрат в СПСО и ПО распространялся, соответственно, примерно на 80% и 40% длины СО. Как уже было сказано выше, по литературным данным, для острого ДСН-колита у мышей C57BL/6 (Mähler M. et al., 1998) и начальной стадии ЯК у человека (van der Post S., Hansson G.C., 2014, Koutroubakis I.E., 2010) характерна локализация язвенно-воспалительного процесса преимущественно в дистальном отделе толстой кишки.

Таким образом, воспроизведенная в нашей работе модель острого колита по клиническим проявлениям и морфологическим признакам соответствует представленным в литературе сведениям, характеризующим острый ДСН-индуцированный колит у мышей и обострение ЯК у человека.

Иммунологические изменения при остром колите по сравнению с контрольной группой. По данным морфометрического исследования гистологических препаратов толстой кишки при остром колите у самцов мышей C57BL/6 как в СПСО, так и в ПО статистически значимо возрастают показатели числа нейтрофилов и лимфоцитов, а число плазмоцитов не отличается от контрольных значений.

Н. Laroui et al. (2012) на качественном уровне отмечают, что инфильтрат в ободочной кишке у самок мышей C57BL/6 при остром колите, индуцированном потреблением 3% ДСН в течение 7-8 дней, состоит преимущественно из нейтрофилов и лимфоцитов. L.J. Hall et al., (2011) с использованием иммуногистохимического окрашивания на криостатных срезах, показали статистически значимое увеличение числа нейтрофилов, дендритных клеток, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов в дистальном отделе ободочной кишки у самок мышей C57BL/6, потреблявших 6 дней 3% раствор ДСН и далее до 8 дня эксперимента питьевую воду по сравнению с контрольной группой. Stevceva L. et al., 2001(a) индуцировали острый колит у мышей BALB/c и C57BL/6 с помощью замены питьевой воды на 2,5% и 5% раствором ДСН в течение 8 дней, проводили иммуногистохимическое окрашивание и подсчет числа макрофагов, CD4+ и CD8+ лимфоцитов, а также методом проточной цитофлюорометрии определяли число IgA-, IgG- и IgM-продуцирующих клеток. Согласно их данным, по сравнению с контрольной группой при остром ДСН-колите в составе инфильтрата СО ободочной кишки число макрофагов возрастало, число Т-лимфоцитов не изменялось, число иммуноглобулин-содержащих клеток возрастало при потреблении 2,5% ДСН и снижалось при потреблении 5% ДСН, преимущественно это происходило за счет IgA-продуцирующих клеток. У человека при ЯК преобладание в инфильтрате полиморфноядерных лейкоцитов является одним из признаков обострения заболевания (Василенко И.В., 2010).

Изменение уровня продукции цитокинов при ДСН-индуцированном колите оценивали в гомогенате медиального отдела ободочной кишки по концентрации белкового продукта методом ИФА и по уровню мРНК генов цитокинов методом

ПЦР в реальном времени. По данным ИФА исследования показатели концентрации провоспалительных цитокинов IL-2, IL-6, IL-17, IFN γ и противовоспалительного IL-4 были статистически значимо ниже, чем у животных контрольной группы. Уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и противовоспалительного TGF β возрастал, а уровень мРНК провоспалительных цитокинов IL-2, IFN γ , IL-12 и IL-17 и противовоспалительных IL-4 и IL-10 статистически значимо не изменялся по сравнению с контрольной группой.

Концентрация всех цитокинов в гомогенате медиального отдела ободочной кишки, как про-, так и противовоспалительных, снижалась, в то время как экспрессия их мРНК либо возрастала, либо не изменялась. Логично предположить, что ИФА исследование не отражает истинного уровня продукции цитокинов, а снижение их концентрации, очевидно, связано с повышением активности протеаз, быстрым связыванием цитокинов клетками-мишенями и «вымыванием» их в просвет кишки в результате нарушения целостности эпителиальной выстилки в зоне язв.

IL-1 β синтезируется в виде молекулы-предшественницы, для функционально активного продукта необходимо расщепление каспазой 1, которая активируется при контакте клетки с РАМР. IL-1 β продуцируется преимущественно моноцитами и макрофагами, но также может синтезироваться эпителиальными клетками СО. IL-1 α и IL-1 β традиционно называют IL-1, поскольку они взаимодействуют с одним и тем же рецептором и их эффекты неразличимы. Мишенями IL-1 потенциально могут быть любые клетки организма. IL-1 – провоспалительный цитокин, характерный для острой фазы воспаления. Взаимодействие IL-1 с рецептором вызывает активацию тех же внутриклеточных каскадов, что и при TLR, таким образом IL-1 дублирует эффекты бактериальных продуктов. IL-1 вызывает эмиграцию лейкоцитов и активацию их фагоцитарной и бактерицидной активности, влияет на свертывающую систему крови и сосудистый тонус, стимулирует выработку гепатоцитами белков острой фазы, при действии на центр терморегуляции

гипоталамуса вызывает развитие лихорадки, способствует усилению гемопоэза (Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A., 2013, Ярилин А.А., 2010).

В ряде работ показано повышение как экспрессии гена, так и продукции белка IL-1 β при остром ДСН-ндуцированном колите у мышей (Sävendahl L. et al., 1997; Arai Y. et al., 1998; Melgar S., Karlsson A, Michaëlsson E., 2005; Laroui H. et al., 2012; Shajib M.S. et al., 2013; Erickson N.A. et al., 2016) и при ЯК у человека (Конович Е.А. и др., 2016; Mora-Buch R et al., 2016). Внутривнутрибрюшинное введение антител к IL-1 β значительно снижает потерю массы тела и укорочение ободочной кишки у мышей с острым ДСН-колитом (Arai Y. et al., 1998). Нами также выявлено повышение экспрессии IL-1 β в ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6 при остром колите, что отражает активацию макрофагов и развитие острого воспалительного ответа.

IL-2. Около 90% IL-2 синтезируется популяцией CD4⁺ Т-лимфоцитов. Кроме того, IL-2 продуцируется также цитотоксическими CD8⁺ Т-лимфоцитами, НК-клетками, эозинофилами и др. Наиболее активно CD4⁺ Т-клетки продуцируют IL-2 на начальном этапе после активации (стадия Th0) до дифференцировки на субпопуляции. Из субпопуляций CD4⁺ Т-клеток его вырабатывают только Th1-клетки, но интенсивность секреции IL-2 этими клетками в процессе иммунного ответа постепенно ослабевает. Рецепторы к IL-2 есть на Т-клетках, В-клетках, НК-клетках, моноцитах, макрофагах. IL-2 вызывает два основных физиологических эффекта – индуцируют антигензависимую пролиферацию всех разновидностей Т-клеток (клональную экспансию) и способствуют дифференцировке цитотоксических и Treg лимфоцитов. IL-2 усиливает цитотоксическую эффективность НК-клеток, выступает в качестве кофактора пролиферации активированных В-лимфоцитов, ингибирует продукцию IL-17 способствует повышению функциональной активности моноцитов, усиливает образование тромбоцитов и эозинофилов и ослабляет миело- и эритропоэз (Bachmann M.F., Oxenius A., 2007, Ярилин А.А., 2010).

У мышей, нокаутных по IL-2 (IL-2^{-/-}) развивается спонтанный колит, напоминающий ЯК у человека (Sadlack B. et al., 1993; Madsen K.L., Jijon H., 2003).

Однако у мышей, гетерозиготных по инактивации гена интерлейкина 2 ($IL-2^{+/-}$) снижена тяжесть острого ДСН-колита, по сравнению с $IL-2^{+/+}$ животными (Sund M. et al., 2005). Данных об изменении экспрессии $IL-2$ при колите крайне мало. W. Yue et al. (2012) показали повышение экспрессии интерлейкина 2 в ободочной кишке при ЯК у человека, причем его экспрессия при легком течении болезни была выше, чем при тяжелом. M. Sund et al. (2005) отмечают повышение уровня мРНК $IL-2$ в Т-клетках ободочной кишки у мышей после воздействия ДСН, а P. Alex et al. (2009) не выявили изменений уровня $IL-2$ в сыворотке крови у животных при ДСН-колите. По нашим данным, уровень мРНК $IL-2$ в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите статистически значимо не изменяется. Наши данные сложно сопоставлять с литературными, так как последние получены с использованием отличных от наших концентрации ДСН, сроков индукции, биологических сред, в которых измерялась продукция цитокинов, и методов их определения. Наблюдаемое нами отсутствие повышения продукции $IL-2$ свидетельствует о низкой активации Т-клеток и преобладании реакций врожденного иммунитета.

$IL-4$ продуцируется преимущественно Th2-клетками, но также его вырабатывают тучные клетки, базофилы, эозинофилы, НК- и НКТ-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты и дендритные клетки. $IL-1$, $IL-2$, а также глюкокортикоиды усиливают выработку $IL-4$. Основные мишени $IL-4$ – В-лимфоциты. Кроме того рецепторы к $IL-4$ расположены на моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, эозинофилах, дендритных клетках, Т-клетках, НК-клетках, гемопоэтических клетках, эндотелиальных клетках. $IL-4$ служит основным ростовым фактором для В-лимфоцитов. $IL-4$ вызывает выработку антител классов IgG1 (только у мышей) и IgE, поддерживает пролиферацию тучных клеток, индуцирует дифференцировку Th2-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, секретирующих $IL-4$ и другие Th2-цитокины. Подавляя синтез макрофагами $IL-1$, $TNF\alpha$, $IL-6$ и других провоспалительных цитокинов, $IL-4$ выступает в роли противовоспалительного цитокина. $IL-4$ вместе с $IL-13$ стимулирует активацию макрофагов по альтернативному пути, что приводит к

ускорению регенерации, подавлению пролиферации Т-клеток, уменьшению бактерицидности. В то же время IL-4 усиливает цитотоксическую активность макрофагов и миграцию нейтрофилов в очаг воспаления. Способствует развитию аллергического воспаления. Кроме того, IL-4 стимулирует гемопоэз, в частности выработку колониестимулирующих факторов. (Múzes G. et al., 2012, Paul W.E., 2015, Ярилин А.А., 2010).

При ЯК у человека, согласно большинству источников, уровень IL-4 в ободочной кишке не изменяется (Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D., 2011; Strober W. Fuss I. J., 2011; Múzes G. et al., 2012), G. Roda et al. (2011) указывают на его снижение, а W. Yue et al. (2012) – на повышение. У мышей при остром ДСН-колите не изменяется ни экспрессия гена IL-4 в ободочной кишке, ни уровень белка в ободочной кишке и крови (Egger V. et al., 2000; Alex P. et al., 2009; Shajib M.S. et al., 2013). У мышей, дефицитных по IL-4, развивается менее тяжелый ДСН-индуцированный колит, чем у мышей дикого типа (Stevceva L. et al., 2001 (b)). В нашей работе не выявлено статистически значимых изменений уровня мРНК IL-4 в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите, что согласуется с литературными данными и указывает на низкую активность Th2-клеток и В-клеток при остром колите.

IL-6 продуцируется моноцитами, макрофагами, эндотелиальными, эпителиальными, глиальными, гладкомышечными клетками, фибробластами, Th2-лимфоцитами, эозинофилами, тучными клетками, дендритными клетками. Выработка IL-6 миелоидными клетками индуцируется при взаимодействии их TLR с микроорганизмами и их продуктами, а также под влиянием IL-1 и TNF α . Рецепторы к IL-6 расположены на Т- и В-лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, нейтрофилах, эндотелиальных, эпителиальных, гемопоэтических клетках. IL-6 — основной фактор, индуцирующий в печени продукцию белков острой фазы. Но IL-6 обладает и противовоспалительным эффектом: подавляет выработку провоспалительных цитокинов и стимулирует продукцию антагониста рецептора IL-1. IL-6 способствует хронизации воспалительного процесса: усиливает выработку хемокинов, привлекающих моноциты и лимфоциты, а привлекающих

нейтрофилы – ослабляет, служит ростовым фактором незрелых плазматических клеток, существенно усиливая гуморальный иммунный ответ, усиливает синтез IgM и IgG1. IL-6 повышает активность цитотоксических Т-клеток. Вместе с TGFβ и IL-23 индуцирует дифференцировку Th17-лимфоцитов. IL-6 ингибирует развитие адаптивных регуляторных Т-клеток, играет значительную роль в патогенезе аутоиммунного воспаления (Gabay С., 2006, Ярилин А.А., 2010).

При ЯК у человека уровень IL-6 в толстой кишке повышен и коррелирует с тяжестью заболевания (Matsuda R. et al., 2009; Roda G. et al., 2011; Bernardo D. et al., 2012; Múzes G. et al., 2012; Конович Е.А. и др., 2016). При остром ДСН-индуцированном колите у мышей уровень IL-6 как в ободочной кишке, так и в сыворотке крови также возрастает (Naito Y. et al., 2004; Melgar S., Karlsson A, Michaëlsson E., 2005; Alex P. et al., 2009; Laroui H. et al., 2012; Shajib M.S. et al., 2013, Ahmad R. et al., 2014). У мышей нокаутных по интерлейкину 6 (IL-6^{-/-}) развивается менее тяжелый ДСН-индуцированный колит, чем у мышей дикого типа (Naito Y. et al., 2004). Наши данные по экспрессии мРНК IL-6 в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите согласуются с литературными. Наблюдаемое повышение продукции IL-6 указывает на активацию врожденного звена иммунитета и развитие острого воспалительного ответа.

IL-10 вырабатывают Th1- и Th2-клетки (у мышей только Th2), регуляторные Т-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки, В-лимфоциты, эозинофилы. Рецепторы к IL-10 расположены на макрофагах, моноцитах, дендритных клетках, Т-, В-, НК-лимфоцитах, тучных клетках. Основной эффект IL-10 – противовоспалительный. IL-10 подавляет синтез провоспалительных цитокинов макрофагами, дендритными клетками и Т-лимфоцитами (особенно Th1 и Th17). Препятствует презентации антигена, подавляя экспрессию молекул МНС-II и костимулирующих молекул CD80 и CD86, ингибирует дифференцировку и созревание дендритных клеток. Подавляет пролиферацию активированных Т-лимфоцитов. Однако действие этого цитокина не ограничивается подавлением

иммунного ответа. IL-10 стимулирует активацию В-клеток, увеличивает их выживаемость и дифференцировку в плазмочиты, синтез ими IgM и IgA. Он также стимулирует пролиферацию определенных подтипов CD8⁺ Т-лимфоцитов, НК-клеток и продукцию ими цитокинов (Mosser D.M., Zhang X., 2008; Ярилин А.А., 2010).

При ЯК у человека по данным большинства авторов продукция IL-10 в толстой кишке повышается и его уровень выше при легкой тяжести заболевания (Matsuda R. et al., 2009; Roda G. et al., 2011; Yue W. et al., 2012). Однако по данным R. Verma, N. Verma и J. Paul (2013) уровень экспрессия IL-10 в биоптатах ободочной кишки у больных ЯК по сравнению со здоровыми лицами статистически значимо не изменяется и даже имеет тенденцию к снижению. В ободочной кишке у мышей при остром ДСН колите показано повышение уровня мРНК IL-10 (Egger B. et al., 2000; Naito Y. et al., 2004), однако в сыворотке крови его содержание не изменяется (Alex P. et al., 2009). У мышей, нокаутных по интерлейкину 10 (IL-10^{-/-}) развивается спонтанное воспаление толстой кишки, напоминающее болезнь Крона у человека (Madsen K.L., Jijon H., 2003). Нами не выявлено статистически значимых изменений экспрессии мРНК IL-10 в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите. Вероятно, это связано с использованием нами меньшей концентрации ДСН и длительности воздействия, по сравнению с указанными работами. Так как IL-10 продуцируется преимущественно Т-лимфоцитами, отсутствие повышения его продукции говорит о низкой активации адаптивного иммунитета при остром колите.

IL-12p40. Цитокины, как правило, представляют собой мономерные или гомодимерные белки, но цитокины семейства IL-12 является исключением из этого правила. IL-12 состоит из двух субъединиц: p35 и p40, которые являются продуктами двух неродственных генов, расположенных на разных хромосомах. Субъединица p40 также входит в состав другого гетеродимерного цитокина – IL-23 (p40 + p19), субъединица p35 – в состав IL-35 (p35 + EBV3 (Epstein-Barr virus Induced 3)), а субъединицы EBV3 и p28 формируют IL-27 (Abdi K., Singh N.J.,

2015). Таким образом, IL-12p40 входит в состав двух цитокинов IL-12 и IL-23. Кроме того, IL-12p40 может существовать в мономерной или гомодимерной форме (Cooper A.M., Khader S.A., 2007). Главные продуценты IL-12 – дендритные клетки. Также IL- секретируют моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эпителиальные клетки барьерных тканей. Индукторы выработки IL-12 – прежде всего патогены, распознаваемые TLR и другими PAMP-распознающими рецепторами. Выработку IL-12 усиливают IL-1 и IFN γ . Количество гетеродимера IL-12, секретируемого клеткой, ограничено субъединицей p35, p40 синтезируется в избытке. Рецептор IL-12 сильнее всего экспрессирован на NK-клетках, активированных Th1-клетках и цитотоксических T-лимфоцитах и в меньшей степени – на дендритных клетках. Кроме того рецепторы к IL-12 есть на В-клетках, гемопоэтических клетках, нейтрофилах, эпителиальных клетках, эндотелиальных клетках, моноцитах и макрофагах. Главная функция IL-12 – запуск клеточных механизмов защиты от внутриклеточных патогенов. IL-12 усиливает пролиферацию и цитотоксическую активность NK-клеток и цитотоксических T-лимфоцитов и синтез ими IFN γ и TNF- α . Индуцирует дифференцировку Th1-клеток, тоже продуцирующих IFN γ . IL-12 подавляет дифференцировку Th2-клеток и ослабляет выработку В-клетками антител классов IgE и IgA. Индуцирует экспрессию костимулирующих молекул (CD80/86, и др.) и МНСII на антигенпрезентирующих клетках (Sun L. et al., 2015; Ярилин А.А., 2010). IL-23 продуцируется преимущественно дендритными клетками, кроме того он синтезируется макрофагами, моноцитами, тучными клетками. Продукция IL-12 стимулируется PAMP и цитокинами, в особенности GM-CSF. Рецепторы к IL-23 расположены на дендритных клетках, Th17- и Th1-клетках, T-клетках памяти, NK- и NKT-клетках, гемопоэтических клетках, нейтрофилах. IL-23 поддерживает продукцию IL-17, IL-22 и GM-CSF, способствует выживанию и поддержанию Th 17-лимфоцитов, а также способствует дифференцировке Th1-клеток (Sun L. et al., 2015; Ярилин А.А., 2010). Гомодимер IL-12p40 ингибирует действие IL-12 и IL-23 за счет конкурентного связывания с их рецепторами. ИЛ-12p40 в мономерной или гомодимерной форме является хемоаттрактантом для макрофагов и способствует

миграции бактериально-стимулированных дендритных клеток. (Cooper A.M., Khader S.A., 2007).

X. Wang et al. (2015) показали, что у человека в ободочной кишке при ЯК повышается экспрессия мРНК и белкового продукта IL12p40. По данным O.H. Nielsen et al. (2003), экспрессия мРНК IL12p40 повышена только при обострении ЯК, а в период ремиссии соответствует контрольным значениям. У мышей при остром ДСН-индуцированном колите продукция IL-12p40 возрастает (Melgar S., Karlsson A, Michaëlsson E., 2005, Ahmad R. et al., 2014). Искусственное увеличение уровня IL-12p40 снижает тяжесть ДСН-колита у мышей (Kim D.J. et al., 2012). Снижение содержания IL-12p40 с помощью анти-IL-12p40 антител также приводит к снижению тяжести ДСН-колита (Melgar S. et al., 2008). Нами не выявлено статистически значимых изменений продукции мРНК IL-12p40 в гомогенате медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите, что вероятно связано с более «мягкой» моделью ДСН-колита, чем в указанной работе. Так как субъединица IL-12p40 всегда синтезируется в избытке, вероятно фонового уровня ее экспрессии достаточно для образования необходимого количества IL-12 и IL-23 при индуцируемом нами остром колите.

Семейство **IL-17** включает 6 членов от IL-17A до IL-17F. Большинство из них образуют гомодимеры, но IL-17A (он же IL-17) и IL-17F (он же IL-25) имеют 50% гомологии, связываются с одними рецепторами и способны образовывать гетеродимеры. IL-17A, IL-17A/F и IL-17F оказывают одинаковое действие, но их активность в этом ряду снижается. IL-17 является основным цитокином Th17-лимфоцитов, регулирующих иммунный ответ на внеклеточные бактериальные и грибковые инфекции. Также IL-17 может синтезироваться CD8⁺ Т-клетками, эозинофилами, нейтрофилами. Рецепторы для IL-17 экспрессируются многими клетками – эпителиальными, фибробластами, нейтрофилами и др. IL-17 усиливает миелопоэз в костном мозге, стимулируя выработку G-CSF, и привлекает нейтрофилы в зону поражения за счет стимуляции продукции их хемоаттрактантов. Кроме того, IL-17 стимулирует продукцию хемоаттрактантов лимфоцитов, дендритных клеток и моноцитов и повышает продукцию

провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α (Beringer A., Noack M., Miossec P., 2016; Ярилин А.А., 2010).

При обострении ЯК уровень как мРНК IL-17, так и белкового продукта в ободочной кишке повышен (Nielsen O.H. et al., 2003; Strober W. Fuss I. J., 2011; Múzes G. et al., 2012; Yue W. et al., 2012; Verma R., Verma N, Paul J., 2013; Конович Е.А. и др., 2016), в период ремиссии продукция IL-17 нормализуется (Nielsen O.H. et al., 2003; Verma R., Verma N, Paul J., 2013). У мышей при остром ДСН-индуцированном колите также отмечается повышение продукции IL-17 (Alex P. et al., 2009; Shajib M.S. et al., 2013; Ahmad R. et al., 2014 Erickson N.A. et al., 2016), однако S.Melgar, A. Karlsson, E.Michaëlsson (2005) не выявили изменений концентрации IL-17 в ободочной кишке у мышей при остром колите по сравнению с контролем. У мышей, нокаутных по IL-17, развивается значительно более легкий по течению ДСН-индуцированный колит, по сравнению с животными дикого типа (Ito R. et al., 2008). В нашем исследовании не было выявлено статистически значимых изменений уровня мРНК IL-17 в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите. Вероятно, это связано с более «мягкой» моделью острого колита, чем в работах других авторов. Основными продуцентами IL-17 являются Т-лимфоциты, поэтому отсутствие повышения экспрессии IL-17 может быть связано с низкой активацией адаптивного звена иммунитета при остром колите.

IFN γ – единственный представитель семейства интерферонов II типа, отличается от других интерферонов по всем показателям; спектр его биологической активности коренным образом отличается от таковой интерферонов I и III типов. IFN γ продуцируют преимущественно лимфоидные клетки: Th1-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты, $\gamma\delta$ Т-клетки, НК-клетки, НКТ-клетки, но также он может вырабатываться дендритными клетками, макрофагами и эозинофилами. В отсутствие иммунного ответа основные его продуценты IFN γ – НК- и НКТ-клетки, при иммунном ответе главным источником IFN γ становятся Т-лимфоциты – цитотоксические CD8⁺ Т-клетки и особенно Th1-клетки. Рецепторы для IFN γ экспрессируют практически все

популяции лейкоцитов, а также эндотелиальные, эпителиальные и некоторые другие клетки. Основные мишени действия IFN γ – моноциты и макрофаги. Противовирусная активность IFN γ выражена слабо, однако он обладает сильным иммунорегуляторным действием и занимает одно из центральных мест в регуляции адаптивного иммунного ответа. IFN γ направляет дифференцировку наивных CD4⁺ Т-клеток в Th1-лимфоциты, регулирующие иммунный ответ на внутриклеточные бактериальные и вирусные патогены. IFN γ стимулирует противобактериальную активность макрофагов, продукцию противовирусных ферментов, активных форм кислорода и азота, ингибирует пролиферацию клеток, повышает экспрессию *MHCI* и *MHCII*. У мышей, нокаутных по IFN γ , снижена сопротивляемость к бактериальным, паразитарным и вирусным инфекциям (Schroder K. et al., 2004; Ярилин А.А., 2010).

Считается, что для ЯК у человека увеличение продукции IFN γ не характерно (Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D.; 2011, Pearl D.S. et al., 2011; Strober W. Fuss I. J., 2011), однако в ряде работ показано, что при активном ЯК уровень как мРНК IFN γ , так и белкового продукта выше, чем у здоровых лиц (Masuda H. et al., 1995; Roda G. et al., 2011; Múzes G. et al., 2012; Verma R., Verma N, Paul J., 2013; Конович Е.А. и др., 2016). Данные относительно продукции IFN γ при остром ДСН-колите у мышей также противоречивы. N.A. Erickson et al. (2016) и В. Egger et al. (2000) показали повышение экспрессии мРНК IFN γ , R. Ahmad et al. (2014) – повышение концентрации белка IFN γ в ободочной кишке мышей при остром ДСН-колите, а S. Melgar, A. Karlsson, E. Michaëlsson (2005) и P. Alex et al. (2009) не выявили изменений концентрации IFN γ в ободочной кишке и сыворотке крови. В нашем исследовании не обнаружено изменения уровня мРНК IFN γ в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите. Так как при воспалении основными продуцентами IFN γ являются Т-клетки, отсутствие повышения экспрессии IFN γ при остром колите указывает на преобладание реакций врожденного иммунитета.

TGF β . Продуцентами TGF β служит огромное число клеток, включая стромальные, эпителиальные клетки, макрофаги, регуляторные Т-лимфоциты,

НКТ-клетки, эозинофилы, тучные клетки. Мишенями фактора служат также очень многие виды клеток. Ключевая функция TGF β в иммунной системе состоит в поддержании толерантности посредством регуляции пролиферации, дифференцировки и выживаемости лимфоцитов. TGF β подавляет синтез воспалительных цитокинов, ответ Т-лимфоцитов на ростовые цитокины, дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов, активность естественных киллеров, усиливает синтез белков межклеточного матрикса, ускоряет заживление ран, оказывает анаболический эффект. В то же время TGF β способствует мобилизации нейтрофилов и моноцитов в очаг воспаления и стимулирует синтез IgA. TGF β необходим для развития Th17-клеток и регуляторных Т-клеток (Wrzesinski S.H., Wan Y.Y., Flavell R.A., 2007; Ярилин А.А., 2010).

Данных относительно продукции TGF β при ЯК у человека крайне мало и они противоречивы. По данным G. Roda et al. (2011), уровень TGF β в толстой кишке при ЯК выше, а по данным D.S. Pearl et al. (2013) – ниже, чем у здоровых лиц. Причем D.S. Pearl et al. (2013) отмечают обратную корреляцию между продукцией TGF β и активностью заболевания. Данные по экспрессии TGF β при остром ДСН-индуцированном колите в литературе отсутствуют. Генетические мутации рецептора TGF β RII (Transforming Growth Factor β receptor II) у человека связаны с предрасположенностью к ЯК и ЯК-ассоциированному раку, а у мышей при ингибировании чувствительности эпителиальных клеток или Т-лимфоцитов к TGF β развивается более тяжелый ДСН-колит, чем у животных дикого типа (Múzes G. et al., 2012). В нашем исследовании выявлено повышение уровня мРНК TGF β в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром колите по сравнению с животными контрольной группы, что свидетельствует об активации механизмов супрессии иммунного ответа, также TGF β может выступать как фактор, привлекающий в очаг воспаления нейтрофилы и моноциты, в значительном количестве выявляемые в гистологических срезах ободочной кишки.

Таблица 39

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению продукции цитокинов в толстой кишке при ЯК у человека и при остром ДСН-индуцированном колите у мышей по сравнению с нормой (авторы указаны в тексте)

Цитокин	ЯК у человека	Острый ДСН-колит у мышей	
	Литературные данные	Литературные данные	Результаты собственных исследований
IL-1 β	↑	↑	↑
IL-2	↑	↑	=
IL-4	=/↓/↑	=	=
IL-6	↑	↑	↑
IL-10	↑/=	↑	=
IL-12p40	↑	↑/=	=
IL-17	↑	↑/=	=
IFN γ	=/↑/↓	↑/=	=
TGF β	↑/↓	?	↑

↑ – возрастает, ↓ – снижается, = – не изменяется

Таким образом, у самцов мышей C57BL/6 при остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, в медиальном отделе ободочной кишки наблюдается инфильтрация СО нейтрофилами и лимфоцитами. Нами не выявлено изменения экспрессии мРНК IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, IFN γ , продуцируемых при иммунном ответе преимущественно активированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, что указывает на низкую активность адаптивного иммунитета. Показано повышение экспрессии мРНК IL-1 β и IL-6, продуцируемых преимущественно макрофагами и характерных для острого воспалительного ответа. Следовательно, у самцов мышей C57BL/6 при остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН в течение 5 дней, на 7 сутки эксперимента в ободочной кишке преобладают реакции врожденного иммунитета. Также нами обнаружено повышение уровня мРНК TGF β , продуцируемого широким спектром клеток как адаптивного, так и

врожденного иммунитета, основной его функцией является супрессия воспалительного ответа и активация репарации. Мы не выявили отмеченного другими авторами повышения уровня мРНК IL-12p40 – субъединицы, входящей в состав провоспалительных цитокинов IL-12 и IL-23, продуцируемых преимущественно дендритными клетками и индуцирующими Th1- и Th17-типы иммунного ответа. Отсутствие повышения синтеза мРНК IL-12p40 может быть связано с преобладанием реакций врожденного и низкой вовлеченностью адаптивного иммунитета, а также с тем, что субъединица IL-12p40 синтезируется в избытке. Возможно, ее фоновый уровень синтеза достаточно для образования необходимого количества IL-12 и IL-23 при индуцированном нами относительно слабо выраженном остром колите. Изменение продукции мРНК TGF β при остром ДСН-колите у мышей нами было оценено впервые (табл.39).

Ультраструктурные изменения эпителиальной выстилки ободочной кишки при остром колите по сравнению с контрольной группой. При остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, значительно возрастает число бактерий в непосредственной близости от эпителиальных клеток. Толщина гликокаликса и высота микроворсинок снижаются. Микроворсинки на каемчатых колоноцитах деформируются, их расположение становится нерегулярным. В цитоплазме каемчатых и бескаемчатых колоноцитов и бокаловидных клеток возрастает число мелких светлых вакуолей и митохондрий, в бескаемчатых колоноцитах снижается количество везикул диаметром 0,3-0,8 мкм.

Увеличение числа бактерий в непосредственной близости от поверхности эпителиальных клеток указывает на нарушение барьерной функции слоя слизи. По мнению M.E. Johansson et al. (2010), повышение проницаемости слизи для бактерий является ключевым моментом в индукции ДСН-колита. В соответствии с их данными через 12 часов после замены питьевой воды на 3% раствор ДСН в толстой кишке у мышей внутренний слой слизи становится проницаемым для бактерий, через 24 часа он практически исчезает, в то время как воспалительная инфильтрация СО развивается только через 120 часов. У человека при ЯК слой слизи значительно истончается, на изъязвленных участках он отсутствует (Pullan

R.D., 1996), а число бактерий, ассоциированных со СО, возрастает (Swidsinski A. et al, 2005). O. Fratila et al. (2008) исследовали ультраструктурные изменения эпителиальных клеток толстой кишки у больных ЯК. При обострении ЯК авторами выявлено значительное повреждение эпителиальных клеток: опустошение бокаловидных клеток, снижение числа или исчезновение микроворсинок, разрушение плотных контактов, вакуолизация и лизис цитоплазмы, пикнотические ядра, повреждения ЭПР, митохондрий, комплекса Гольджи. При ремиссии ЯК, толщина эпителиальной выстилки ниже, чем в норме, микроворсинки деформированы, увеличены межклеточные пространства и встречаются поврежденные органеллы. Сведения об ультраструктурных изменениях эпителиальных клеток при ДСН-колите в литературе отсутствуют. По нашим данным наблюдается повреждение щеточной каемки (микроворсинки и гликокаликс), увеличение числа мелких вакуолей и митохондрий, которые в литературе описываются как пиноцитозные, и снижается число крупных вакуолей в бескаемчатых колоноцитах (по литературным данным, это муциновые вакуоли (Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump V.F., 1982)). Относительно небольшое повреждение эпителиальных клеток объясняется тем, что мы выбирали сохраненные участки СО на границе медиального и дистального отделов ободочной кишки, где язвенно-воспалительный процесс менее выражен, чем в дистальном отделе. Истончение гликокаликса, являющегося «молекулярным ситом», может приводить к проникновению различных повреждающих молекул непосредственно к мембране клетки. Деформация микроворсинок и их разрежение указывает на повреждение клетки и, возможно, на нарушение функции всасывания. Снижение числа муциновых вакуолей, по-видимому, происходит в результате гиперсекреции слизи и является компенсаторным процессом, направленным на восстановление слоя слизи. Накопление пиноцитозных вакуолей может отражать усиление захвата бактериальных антигенов, транспорта их к иммунным клеткам и активации иммунного ответа. Увеличение числа митохондрий, вероятно, является компенсаторным процессом, отражающим повышение энергетических затрат клетки.

Изменение числа ЭЭК при остром колите по сравнению с контрольной группой. При остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, показатель числа ЭЭК на крипту в медиальном отделе ободочной кишки был снижен, в проксимальном – не отличался от контрольных значений, а в дистальном отделе наблюдалась тенденция к снижению числа ЭЭК, однако статистической значимости различия не достигали.

Мы выявляли ЭЭК по небольшому растворимому белку, накапливающемуся в секреторных гранулах вместе с гормонами, – хромогранину А. В толстой кишке хромогранин А синтезируется ЕС- и L-клетками. ЕС-клетки продуцируют серотонин, у человека они составляют более 70% ЭЭК в проксимальной части толстой кишки и около 40% - в прямой кишке. L-клетки секретируют пептид YY, глюкогоноподобные пептиды 1 и 2, глицентин, оксинтомодулин, у человека их число растет от проксимального отдела толстой кишки к дистальному, и в прямой кишке они составляют 14% ЭЭК (Gunawardene A.R., Corfe V.M., Staton C.A., 2011). Снижение числа выявляемых нами ЭЭК в медиальном отделе ободочной кишки может быть связано с их гибелью, гиперсекрецией или изменением путей дифференцировки предшественников. Учитывая то, что мы подсчитывали количество ЭЭК в сохранных криптах, вероятно снижение числа выявляемых ЭЭК преимущественно обусловлено гиперсекрецией. Преобладающим типом ЭЭК в толстой кишке являются секретирующие серотонин ЕС-клетки, поэтому наши данные косвенно указывают на повышение секреции серотонина, который стимулирует перистальтику кишечника (Gunawardene A.R., Corfe V.M., Staton C.A., 2011). Действительно, на 5-7 сутки эксперимента у животных отмечалась диарея. По-видимому, эти изменения ЭЭК носят защитный характер и способствуют элиминации повреждающих веществ и бактерий из кишечника. Кроме того, серотонин вовлечен в регуляцию иммунных реакций. Показано, что рецепторы к серотонину есть на многих иммунных клетках, таких как В- и Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Тучные клетки, макрофаги и Т-клетки сами могут синтезировать серотонин из триптофана. Серотонин является

хемоаттрактантом для эозинофилов, дендритных и тучных клеток (Manocha M., Khan W.I. 2012). Введение серотонина мышам на фоне потребления ДСН усугубляет течение острого ДСН-колита (Chen M. et al., 2016). У мышей, нокаутных по триптофангидроксилазе 1 (*Tph1^{-/-}*) со сниженной продукцией серотонина ДСН-колит протекает легче, чем у животных дикого типа, а восстановление у нокаутных животных уровня продукции серотонина путем введения его предшественника 5-гидрокси-L-триптофан усиливает тяжесть экспериментального колита. Аналогично, нокаут транспортера обратного захвата серотонина SERT приводит к увеличению тяжести TNBS-индуцированного колита и спонтанного колита у *IL-10^{-/-}* мышей (Manocha M., Khan W.I. 2012). Таким образом, усиление секреции серотонина вносит вклад в развитие воспалительного процесса.

M.D. Coates et al. (2004) выявили снижение числа ЕС-клеток и продукции серотонина в прямой кишке при тяжелом течении ЯК. Однако по данным M. El-Salhy et al. (1997) в ободочной кишке у больных ЯК значительно возрастает число хромогранин А- и серотонин-позитивных клеток. P.P. Bertrand et al. (2010) обнаружили усиление секреции серотонина и увеличение числа ЕС-клеток в ободочной кишке у мышей CD-1 при колите, индуцированном 5% раствором ДСН в течение 5 дней на 7 сутки эксперимента, а J.A. Hernández-Trejo et al. (2016) выявили увеличение числа хромогранин А-позитивных клеток в ободочной кишке мышей C57BL/6J с колитом, индуцированным 3% ДСН в течение 3 дней на 3 сутки эксперимента.

Противоречивость литературных данных и полученных нами, вероятно, связана с использованием нами меньшей концентрации ДСН и сроков индукции колита, при которых развивается гиперсекреция, но не гиперплазия ЭЭК.

Морфологические и гистохимические изменения бокаловидных клеток при остром колите по сравнению с контрольной группой. При остром колите по сравнению с контрольной группой показатель числа бокаловидных клеток был снижен на всем протяжении ободочной кишки, но их объемная доля - только в дистальном отделе. Во всех отделах возрастали размеры бокаловидных клеток и

снижалась интенсивность окрашивания высокосульфатированных муцинов. В отличие от проксимального и медиального, в дистальном отделе повышалась интенсивность окрашивания нейтральных муцинов и снижалась доля высокосульфатированных муцинов.

Снижение числа бокаловидных клеток характерно для ЯК у человека, оно коррелирует с тяжестью ЯК и варьирует от незначительного уменьшения их количества с преобладанием клеток с мелкими, незрелыми вакуолями у больных ЯК легкой степени до выраженного снижения и иногда полного отсутствия у пациентов со среднетяжелым течением ЯК (Парфенов А.И., 2012, Kim YS, Но SB., 2010). С.М. Issa et al. (2014) выявили статистически значимое снижение числа ШИК-позитивных клеток в ободочной кишке у мышей при остром ДСН-колите. Также S. Melgar, A. Karlsson и E. Michaëlsson (2005) на качественном уровне отмечают снижение количества бокаловидных клеток. Наши данные о снижении числа и объемной доли бокаловидных клеток при остром колите согласуются с литературными по ДСН-колиту у мышей и ЯК у человека. Бокаловидные клетки во всех указанных работах выявлялись по содержимому их секреторных гранул, поэтому, вероятно, снижение их числа обусловлено гиперсекрецией, направленной на восстановление муцинового барьера. Но также в снижении числа видимых бокаловидных клеток может вносить вклад их гибель и изменение путей дифференцировки прогениторных клеток. У крыс Sprague-Dawley на 5-ые сутки потребления 5% раствора ДСН показано увеличение секреции слизи, что приводит к опустошению бокаловидных клеток, и исчезает плотный адгезивный слой слизи. Значительно уменьшалось число заполненных бокаловидных клеток (21% по сравнению с 84% контрольной группы) с соответствующим увеличением числа опустошенных бокаловидных клеток (49% по сравнению с 4% в контрольной группе) и бокаловидных клеток в процессе секреции муцина (31% по сравнению с 12% в контрольной группе) (Dharmani P, Leung P, Chadee K., 2011)

ШИК-реакция выявляет концевые -ОН группы углеводов, которые преобладают в нейтральных муцинах. Альциановый синий – катион, который при рН 1.0 связывается с остатками серной кислоты в сульфатированных концевых

углеводных группах муцинов. Уменьшение отношения интенсивности окрашивания альциановым синим рН 1.0 к интенсивности ШИК-реакции секрета бокаловидных клеток, указывает на смещение баланса между сульфатированными и нейтральными муцинами в сторону последних. При активном ЯК показано значительное снижение сульфатирования муцина в бокаловидных клетках. Однако содержание сульфомуцинов во внеклеточной слизи не изменяется благодаря компенсаторному механизму, обеспечивающему преимущественную секрецию сульфатированной формы (Van Klinken BJ et al., 1999). Литературные данные по сульфатированию муцинов у мышей при ДСН-колите отсутствуют. Сниженное содержание сульфатированных муцинов у мышей, дефицитных по сульфатазе GlcNAc6ST-2 (N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2), приводит к развитию более тяжелого по течению ДСН-колита, чем у мышей дикого типа (Tobisawa Y et al., 2010).

Мы выявили снижение содержания высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках на всем протяжении ободочной кишки, повышение содержания нейтральных муцинов и снижение доли высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках медиального и дистального отделов ободочной кишки у мышей C57BL/6 при остром колите, что согласуется с данными о снижении сульфатирования и преимущественной секреции сульфатированных муцинов при ЯК у человека.

Таким образом, при остром ДСН-колите наблюдается снижение числа выявляемых бокаловидных клеток, что, вероятно, обусловлено гиперсекрецией слизи, и их гипертрофия. Эти изменения носят адаптивный характер и направлены на восстановление непроницаемого для бактерий слоя слизи. Кроме того, наблюдается уменьшение доли высокосульфатированных муцинов, что делает слизь менее устойчивой к разрушению бактериальными ферментами и может способствовать прогрессированию и хронизации воспалительного процесса.

Изменение экспрессии гель-образующего и трансмембранных муцинов при остром колите по сравнению с контрольной группой. При остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, статистически значимо снижается экспрессия мРНК трансмембранного муцина *Muc3*, а уровень экспрессии генов секреторного муцина *Muc2* и трансмембранных муцинов *Muc1* и *Muc13* не отличается от контрольных значений.

MUC2 – секреторный гель-образующий муцин, является главным структурным компонентом кишечной слизи (Longman R.J. et al., 2006). Биосинтез MUC2 при ЯК снижается (Tytgat KM et al., 1996; Van Klinken VJ et al., 1999), при активном ЯК снижается секреция гликопротеина MUC2 (Tytgat KM et al., 1996), однако изменения уровня мРНК *MUC2* в бокаловидных клетках при этом заболевании не выявлено (метод гибридизации *in situ*) (Hanski C. et al., 1999; Weiss AA et al., 1996) При остром ДСН-колите у крыс P. Dharmani, P. Leung и K. Chadee (2011) показали снижение уровня мРНК *Muc2*. С. Hoebler et al. (2006) у мышей в проксимальном отделе ободочной кишки выявили снижение экспрессии *Muc2* вдвое, однако в дистальном отделе его экспрессия не изменилась. У мышей, нокаутных по гену муцина 2 (*Muc2^{-/-}*), отсутствует слой слизи и развивается спонтанный колит, а у гетерозиготных мышей *Muc2^{+/-}* ДСН-колит протекает значительно тяжелее, чем у животных дикого типа (Van der Sluis M et al., 2006). Толщина плотного слоя слизи снижается при остром ДСН-колите в ободочной кишке у мышей (Johansson ME et al., 2010) и при обострении ЯК в прямой кишке у человека (Hoebler C. et al., 2006). Таким образом, литературные данные относительно синтеза муцина 2 у человека и мыши не однозначны, но в целом указывают на истощение запасов слизи и снижение продукции этого муцина. Первое, вероятно, связано с гиперсекрецией и опустошением бокаловидных клеток, а второе – с их гибелью и изменением направления дифференцировки прогениторных клеток. В нашей работе не выявлено изменения уровня мРНК *Muc2* в медиальном отделе ободочной кишки у мышей C57BL/6 при остром колите. При этом было обнаружено снижение числа бокаловидных клеток, окрашенных альциановым синим, и увеличение размеров и концентрации

муцинов в сохранных бокаловидных клетках. Вероятно, часть бокаловидных клеток гибнет, а сохранные берут на себя их функцию, что приводит к увеличению в них уровня продукции MUC2 и, соответственно, числа и размеров секреторных гранул. Однако наша модель колита является более «мягкой», чем воспроизведенные другими авторами, и в медиальном отделе ободочной кишки патологические изменения менее выражены, чем в дистальном. Возможно, оказываемое нами воздействие не влияет на экспрессию гена *Muc2*, а регуляция синтеза этого муцина происходит на посттрансляционном уровне.

MUC1 – мембран-ассоциированный муцин, экспрессируется на апикальной поверхности эпителиальных клеток многих органов, включая дыхательные пути, молочные железы, эндометрий, желудок, поджелудочную железу, а также на мембране активированных и неактивированных Т-лимфоцитов. Избыточная экспрессия, аномальная внутриклеточная локализация и изменения гликозилирования этого муцина наблюдаются в опухолях. Циркулирующие антитела к MUC1 являются одним из маркеров рака молочной железы (Longman R.J. et al., 2006). У больных ЖК продукция MUC1 в толстой кишке возрастает. Кроме того, у пациентов с ЖК выявляются циркулирующие анти-MUC1 антитела (Longman R.J. et al., 2006). При остром ДСН-колите у мышей также показано увеличение экспрессии *Muc1* в ободочной кишке почти в 5 раз (Hoebler C. et al., 2006). У мышей, нокаутных по гену муцина 1 (*Muc1^{-/-}*) развивается ДСН-индуцированный колит значительно меньшей тяжести, чем у животных дикого типа (Petersson J. et al., 2011). Мы не выявили статистически значимого изменения уровня мРНК *Muc1* в медиальном отделе ободочной кишки у мышей C57BL/6 при остром колите.

Гомологом мышинового гена *Muc3* у человека является *MUC17*, кодирующий мембрано-ассоциированный муцин, один из основных структурных компонентов гликокаликса ЭКК (Pelaseyed T. et al., 2014). Данных об экспрессии *MUC17* при ЖК крайне мало, и они противоречивы даже в рамках одного исследования. Так в работе С. Moehle et al. (2006) в СО толстой кишки у больных ЖК методом microarray выявлено снижение уровней мРНК *MUC17*, а методом ПЦР в режиме

реального времени – его повышение. S. Senapati et al. (2010) с помощью иммуногистохимического метода продемонстрировали значительное снижение экспрессии MUC17 на поверхности и в криптах СО толстой кишки. У мышей при остром ДСН-индуцированном колите по данным С. Hoebler et al. (2006) экспрессия мРНК *Muc3* в дистальном отделе ободочной кишки возрастает более чем в 2 раза, а в проксимальном – не изменяется. У крыс при остром ДСН-колите выявлено значительно снижение экспрессии *Muc3* (Dharmani P, Leung P, Chadee K., 2011). Мы выявили статистически значимое снижение уровня мРНК *Muc3* в медиальном отделе ободочной кишки у мышей C57BL/6 при остром колите, что согласуется с полученными нами при ультраструктурном исследовании данными по уменьшению толщины гликокаликса.

MUC13 – короткий трансмембранный муцин, также входящий в состав гликокаликса (Pelaseyed T. et al., 2014). Данные об экспрессии MUC13 в толстой кишке у человека при ЖК единичны и противоречивы: С. Moehle et al. (2006) методом micro-array выявили снижение уровня мРНК *MUC13*, а методом ПЦР в режиме реального времени – повышение. Данные об изменении экспрессии *Muc13* при остром ДСН-колите в литературе отсутствуют. Показано, что у мышей нокаутных по гену муцина 13 (*Muc13^{-/-}*) развивается более тяжелый ДСН-колит, чем у животных дикого типа (Sheng YH et al., 2011). В нашем исследовании не выявлено статистически значимого изменения уровня мРНК *Muc13* в медиальном отделе ободочной кишки у мышей C57BL/6 при остром колите.

Таким образом, при остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, у самцов мышей C57BL/6 в медиальном отделе ободочной кишки снижается экспрессия гена трансмембранного муцина *Muc3* – основного структурного компонента гликокаликса колоноцитов, что указывает на снижение барьерной функции гликокаликса. Экспрессия муцинов *Muc1*, *Muc2* и *Muc13* не изменяется, что, вероятно, связано с относительно небольшой выраженностью язвенно-воспалительного процесса в медиальном отделе ободочной кишки (табл. 40).

Таблица 40

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению экспрессии муцинов в толстой кишке при ЯК у человека и при остром ДСН-индуцированном колите у мышей по сравнению с нормой (авторы указаны в тексте)

Муцины (мышь/человек)	ЯК у человека	Острый ДСН-колит у мышей и крыс	
	Литературные данные	Литературные данные	Результаты собственных исследований
<i>Muc1 / MUC1</i>	↑	↑	=
<i>Muc2 / MUC2</i>	↓/=	↓/=	=
<i>Muc3 / MUC17</i>	↓/↑	↓/↑/=	↓
<i>Muc13 / MUC13</i>	↓/↑	Нет данных	=

↑ – возрастает, ↓ – снижается, = – не изменяется

Изменения экспрессии белков плотных контактов при остром колите по сравнению с контрольной группой. При остром колите уровень мРНК клаудина *Cldn2* в медиальном отделе ободочной кишки статистически значимо возрастает, а уровень *Cldn4* не отличается от контрольных значений.

CLDN2 – «порообразующий» клаудин, способный образовывать каналы для катионов (Günzel D, Yu AS., 2013). При ЯК его экспрессия в толстой кишке возрастает и коррелирует с тяжестью заболевания (Oshima T, Miwa H, Joh T., 2008; Randall K et al., 2016). У крыс при остром ДСН колите экспрессия *Cldn2* также возрастает (Yuan B et al., 2015). Трансгенные мыши с повышенной экспрессией *Cldn2* более устойчивы к ДСН-колиту по сравнению с мышами дикого типа. У трансгенных мышей повышена пролиферативная активность эпителиальных клеток, снижена их ДСН-индуцированная гибель, повышено содержание регуляторных Т-лимфоцитов в ободочной кишке и снижена активация иммунного ответа в ответ на ДСН (Ahmad R. et al., 2014). По нашим данным у мышей C57BL/6 при остром колите экспрессия мРНК *Cldn2* возрастает в медиальном отделе ободочной кишки, что согласуется с литературными данными.

CLDN4 в сочетании с CLDN8 может образовывать анионные поры, но есть указания, что в толстой кишке он выполняет функцию «запирающего» клаудина (Günzel D, Yu AS., 2013). При обострении ЯК его экспрессия в толстой кишке снижается (Oshima T, Miwa H, Joh T., 2008). При остром ДСН-колите у мышей также показано снижение экспрессии *Cldn4* (Mennigen R et al., 2009). В нашем исследовании не выявлено статистически значимого изменения уровня экспрессии мРНК *Cldn4* в медиальном отделе ободочной кишки у мышей C57BL/6 при остром колите, что объясняется более «мягкой» моделью колита, чем в указанной работе.

Таким образом, при остром колите, индуцированном 1% раствором ДСН, у самцов мышей C57BL/6 в медиальном отделе ободочной кишки повышается экспрессия гена «порообразующего» *Cldn2*, что приводит к повышению проницаемости эпителиального барьера для катионов и может вносить вклад в развитие диареи. Однако, согласно данным R. Ahmad et al. (2014) повышение экспрессии *Cldn2* оказывает протективное действие на течение ДСН-колита. Экспрессия муцинов *Cldn4* при остром колите по нашим данным не изменяется, что, вероятно, связано с использованием относительно «мягкой» модели колита (табл. 41).

Таблица 41

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению экспрессии клаудинов в толстой кишке при ЯК у человека и при остром ДСН-индуцированном колите у мышей по сравнению с нормой (авторы указаны в тексте)

Клаудины	ЯК у человека	Острый ДСН-колит у мышей	
	Литературные данные	Литературные данные	Результаты собственных исследований
<i>Cldn2</i>	↑	↑	↑
<i>Cldn4</i>	↓	↓	=

↑ – возрастает, ↓ – снижается, = – не изменяется

Воспроизведенная в нашей работе модель острого колита по клиническим проявлениям и морфологическим признакам соответствует литературным сведениям об остром ДСН-индуцированном колите и является адекватной моделью обострения ЯК у человека. Иммунные реакции характеризуются выраженной воспалительной инфильтрацией СО с повышенным содержанием нейтрофилов и лимфоцитов, увеличенной экспрессией цитокинов острой фазы воспаления IL-1 β и IL-6 и противовоспалительного цитокина TGF β . Наблюдается ряд нарушений эпителиального барьера. Значительно увеличено число бактерий в непосредственной близости от поверхности эпителиальных клеток, что указывает на нарушение защитной функции слоя слизи; снижено содержание высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках; уменьшено количество муциновых вакуолей в бескаемчатых колоноцитах; наблюдается гипертрофия бокаловидных клеток, что, вероятно, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление защитного слоя слизи; истончен гликокаликс, снижена экспрессия мРНК его основного структурного компонента – муцина *Muc3*; микроворсинки деформированы, нарушена регулярность их расположения, что может приводить к нарушению всасывания веществ из просвета кишки; наблюдаются изменения клеточного состава эпителия: снижено число ЭЭК в медиальном отделе ободочной кишки и бокаловидных клеток на всем протяжении ободочной кишки, что может влиять на нарушения моторики и кишки и продукцию слизи; повышена продукция «порообразующего» клаудина 2, что приводит к повышению проницаемости плотных контактов.

Изменения эпителиального барьера ободочной кишки при экспериментальном хроническом колите по сравнению с контрольной группой

Клинические и морфологические проявления острого колита. На 28-ые сут. сутки эксперимента самцы мышей C57BL/6, потреблявшие в течение первых 5-и сут. эксперимента 1% раствор ДСН, внешне не отличались от контрольных животных: имели гладкий, чистый, лоснящийся шерстный покров, были активны,

при переносе из клетки на стол проявляли исследовательское поведение. Их фекалии, как и у животных контрольной группы, были оформлены в виде болюсов. Показатели массы тела и длины ободочной кишки соответствовали контрольным значениям. Таким образом, у животных каких-либо клинических признаков колита выявлено не было.

При гистологическом исследовании ободочной кишки у животных с хроническим колитом на нашем материале выявлялись узкие эпителизирующиеся язвы, выраженная воспалительная инфильтрация преимущественно СПСО лимфоцитами, плазмócитами и единичными нейтрофилами, увеличение расстояния между мышечной пластинкой и дном крипт, деформация крипт, расширение их просветов и заполнение слизью, увеличение числа бокаловидных клеток, очаговый фиброз базального отдела СПСО и мышечной оболочки. Язвы во всех отделах ободочной кишки выявлялись менее чем на 10% длины срезов, а распространенность воспалительной инфильтрации была наибольшей в дистальном отделе, где составляла примерно 80% длины среза в СПСО и 35% в ПО. У одного животного выявлена очаговая дисплазия эпителия.

Клинические проявления в хронической фазе ДСН-колита, как правило, не отражают тяжести воспаления в толстой кишке (Perše M., Cerar A., 2012). По данным S. Melgar, A. Karlsson, E. Michaelsson (2005) у самок мышей C57BL/6, потреблявших в течение 5 дней 3% раствор ДСН, на 26-33 сут. отсутствует кровь в кале, масса тела и длина ободочной кишки соответствуют контрольным, единственным клиническим признаком колита является «мягкий» стул. По данным W. Hans et al. (2000) у самок мышей BALB/c после 4 циклов потребления 5% ДСН в течение 7 дней, а затем 10 дней питьевой воды наблюдался «мягкий» стул, у 10% - диарея, кровь в кале определялась только микроскопически. Эти симптомы исчезали в течение 8 недель после окончания 5 цикла потребления ДСН, но по данным микроскопического исследования через 4 месяца после окончания 5 цикла ДСН воспалительные изменения ободочной кишки сохранялись.

Наиболее распространенной формой ЯК у человека является рецидивирующая, при которой эпизоды обострения чередуются с периодами ремиссии (Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А., 2009). У 30-54% пациентов с клинической ремиссией ЯК выявляются эндоскопические и морфологические признаки воспаления (Moss A.C., 2014). В клинике выделяют легкую форму течения ЯК, при которой частота дефекаций незначительно превышает норму, крови в кале мало, отмечается небольшая болезненность по ходу толстой кишки и увеличение СОЭ (Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А., 2009).

Течение ЯК у человека может сопровождаться развитием ряда угрожающих жизни осложнений, в том числе колоректальным раком. При длительном течении ЯК приблизительно у 10% больных развивается колоректальный рак (Сергиенко Е.И., 2012). ДСН используется для моделирования данной патологии на мышах: хронический ДСН-колит приводит к развитию дисплазии эпителия и рака толстой кишки с патологическими особенностями, схожими с таковыми при колит-ассоциированной неоплазии у человека (Clapper M.L., Cooper H.S., Chang W.C., 2007).

Для хронического ДСН-колита характерны лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация, нарушение гистоархитектоники крипт, увеличение расстояния между дном крипт и мышечной пластинкой за счет воспалительной инфильтрации (Perše M., Cerar A., 2012). У самок мышей C57BL/6, потреблявших в течение 5 дней 3% раствор ДСН, на 33 сут. эксперимента наблюдается выраженная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация СПСО и ПО, фиброз СО, регенерация крипт и реэпителизация, очаговая десквамация эпителия, встречаются язвы (Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E., 2005). У самок мышей BALB/c после 5 циклов, состоящих из потребления 5% ДСН в течение 7 дней и 10 дней питьевой воды, наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация СО из лимфоцитов и макрофагов, а также небольшого числа гранулоцитов (<15%), снижение числа бокаловидных клеток и крипт; язвы встречались нечасто (Hans W. et al., 2000).

При ЯК у человека признаками хронизации воспалительного процесса считаются нарушение гистоархитектоники крипт (крипты расположены с разной частотой, не перпендикулярно СО, ветвятся), выраженная инфильтрация базальной части СПСО лимфоцитами и плазмócитами, что обуславливает увеличение расстояния между дном крипт и мышечной пластинкой, утолщение ПО за счет разрастания в ней жировой ткани и фиброза, увеличение числа ЭЭК, появление клеток Панета в левом отделе толстой кишки (в правом отделе толстой кишки у человека они встречаются в норме) (DeRoche T.C., Xiao S.Y., Liu X., 2014, Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012). При этом выраженность морфологических изменений не соответствует тяжести клинических проявлений заболевания. Так, при гистологическом исследовании биоптатов СО прямой кишки у 82-ух пациентов с клинической и эндоскопической ремиссией ЯК во всех образцах выявлен воспалительный инфильтрат из лимфоцитов и плазмócитов, в 58% – нарушение архитектоники крипт, в 32% – признаки острого воспаления, в 22% – снижение количества слизи, в 11% – крипт-абсцессы (Riley S.A. et al., 1991).

Таким образом, воспроизведенная в нашей работе модель хронического колита по клиническим проявлениям и морфологическим признакам соответствует представленным в литературе сведениям, характеризующим хронический ДСН-индуцированный колит у мышей. Эта модель в целом соответствует клинической ремиссии или легкому течению ЯК у человека .

Иммунологические изменения при хроническом колите по сравнению с контрольной группой. При хроническом колите по сравнению с контролем были статистически значимо выше показатели числа плазматических клеток, лимфоцитов и нейтрофилов. С использованием метода иммуногистохимии на криостатных срезах у самок мышей C57BL/6, потреблявших 6 дней 3% раствор ДСН и далее до 25 дня эксперимента питьевую воду, в дистальном отделе ободочной кишки показано статистически значимое увеличение числа нейтрофилов, дендритных клеток, макрофагов, Т- и В-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой (Hall L.J. et al., 2011). S. Melgar, A. Karlsson, E. Michaelsson

(2005) на качественном уровне отмечают преобладание в воспалительном инфильтрате ободочной кишки при хроническом колите макрофагов, лимфоцитов и плазмоцитов. Как было сказано выше, для ЖК человека также характерна лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация СО (DeRoche T.C., Xiao S.Y., Liu X., 2014, Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012).

По нашим данным, при хроническом колите у мышей согласно результатам иммуноферментного анализа концентрация IL-2, IL-6, IL-17, IFN γ и IL-4 не отличается от контрольных значений. Экспрессия мРНК IL-10 и IL-12p40 повышена, а IL1 β , IL2, IL4, IL6, IL17, IFN γ и TGF β не изменяется по сравнению с контрольной группой. Как уже обсуждалось, результаты иммуноферментного анализа, вероятно, не отражают реальной концентрации цитокинов.

Подробная характеристика цитокинов и данные литературы об изменении их содержания в ободочной кишке при ЖК у человека были подробно разобраны в предыдущем разделе. Удалось найти только две работы, в которых описано изменение продукции цитокинов при хроническом ДСН-колите. S. Melgar, A. Karlsson, E. Michaelsson (2005) оценивали продукцию цитокинов с использованием технологии xMAP и иммуноферментного анализа в гомогенате всей ободочной кишки у самок мышей C57BL/6, потреблявших в течение первых 5-и дней эксперимента 3% раствор ДСН, на 26-ые и 33-и сут. эксперимента, и выявили повышение уровня IL-1 β , IL-12p40, IL-17 и IFN γ . P. Alex et al. (2009) изучали изменение уровня цитокинов с использованием multiplex sandwich immunoassay в сыворотке крови мышей C57BL/6 обоего пола, у которых индуцировали хронический колит 4-мя циклами 3% ДСН по 7 дней, чередующихся с 10-ю днями нормальной питьевой воды. Согласно их данным, в крови мышей при хроническом ДСН-колите повышается концентрация IL-4, IL-6, IL-10 и IFN γ , а уровень IL-1 β , IL-2, IL-12p40 и IL-17 не изменяется (таблице 42).

По нашим данным, уровень мРНК IL-1 β и IL-6 в ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6 при хроническом колите соответствует контрольным значениям, что указывает на завершение острой воспалительной реакции. Не отличается от нормы экспрессия противовоспалительного TGF β , что также, вероятно, связано с

окончанием острой воспалительной реакции. Экспрессия мРНК IL-2, IL-4, IL-17 и IFN γ , участвующих в формировании адаптивного иммунного ответа, также не отличается от контрольных значений. Вероятно, к 28-ому дню эксперимента уже заканчивается антиген-зависимая пролиферация и дифференцировка Т- и В-клеток.

Таблица 42

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению уровня цитокинов в толстой кишке при ЯК у человека и в стенке ободочной кишки и сыворотке крови при хроническом ДСН-индуцированном колите у мышей по сравнению с нормой

Цитокин	ЯК у человека	Хронический ДСН-колит у мышей		
	Литературные данные (авторы указаны в тексте)	Литературные данные		Результаты собственных исследований
	СО толстой кишки	Ободочная кишка (Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E., 2005)	Сыворотка крови (Alex P. et al., 2009)	Ободочная кишка
IL-1 β	↑	↑	=	=
IL-2	↑		=	=
IL-4	=/↓/↑		↑	=
IL-6	↑		↑	=
IL-10	↑/=		↑	↑
IL-12p40	↑/=	↑	=	↑
IL-17	↑	↑	=	=
IFN γ	=/↑/↓	↑	↑	=
TGF β	↑/↓			=

↑ - увеличивается, ↓ снижается, = - не изменяется

Нами выявлено повышение продукции мРНК IL-10, свидетельствующее об активации иммуносупрессорных механизмов, также IL-10 может вносить вклад в развитие плазмоцитарной инфильтрации. Повышена продукция субъединицы IL-12p40, что может указывать как на повышение продукции провоспалительных цитокинов IL12 и IL23, так и на образование гомодимеров IL-12p80, подавляющего действие указанных цитокинов и, таким образом, оказывающего противовоспалительное действие.

Изменения экспрессии мРНК цитокинов IL2, IL4, IL6, IL-10 и TGF β в ободочной кишке у мышей при хроническом ДСН-индуцированном колите нами оценены впервые.

Несоответствия полученных нами результатов и литературных данных по изменению экспрессии цитокинов при ЯК у человека и хроническом ДСН-колите у мышей объясняются межвидовыми, внутривидовыми различиями, различиями схем индукции колита и методик анализа продукции цитокинов.

Ультраструктурные изменения эпителиальной выстилки ободочной кишки при хроническом колите по сравнению с контрольной группой. У мышей с хроническим колитом чаще, чем у животных контрольной группы встречаются бактерии в непосредственной близости от эпителиальных клеток. Гликокаликс и микроворсинки имеют нормальное строение. По сравнению с контрольной группой увеличивается число вакуолей средних размеров в бескаемчатых колоноцитах.

Литературные данные по ультраструктурным изменениям эпителиальных клеток ободочной кишки у мышей при хроническом ДСН-колите отсутствуют. При ремиссии ЯК у человека толщина эпителиальной выстилки меньше, чем в норме, микроворсинки деформированы, увеличены межклеточные пространства и встречаются поврежденные органеллы (Fratila O. et al., 2008).

Повышенная частота встречаемости бактерии в непосредственной близости от эпителиальных клеток по сравнению с контрольной группой указывает на недостаточную эффективность плотного слоя слизи. Увеличение числа

муциновых вакуолей в бескаемчатых колоноцитах, вероятно, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление защитного слоя слизи.

Изменение числа ЭЭК при хроническом колите по сравнению с контрольной группой. На нашем материале у мышей с хроническим колитом показатель числа ЭЭК соответствует контрольным значениям во всех отделах ободочной кишки.

У крыс, потреблявших в течение месяца 1,5% раствор ДСН, показано увеличение плотности ЕС-клеток и содержания серотонина в СО всей дистального и проксимального отделов толстой кишки (Oshima S, Fujimura M, Fukimiya M., 1999). При ЯК у человека число ЭЭК в толстой кишке увеличивается (Gledhill A. et al., 1986; El-Salhy M. et al., 1997; Rybakova M.G., Botina A.V., Solov'eva O.I. 2005). Приблизительно у половины пациентов с длительной ремиссией ЯК наблюдаются симптомы, напоминающие синдром раздраженной кишки, которые могут быть связаны с изменениями ЕС-клеток и серотонинового сигналинга в условиях хронического воспаления (Manocha M., Khan W.I. et al., 2012). Мы не выявили статистически значимого повышения числа выявляемых ЭЭК при хроническом колите у самцов мышей C57BL/6, однако в дистальном отделе ободочной кишки наблюдалась тенденция к увеличению их количества. Вероятно, это связано с тем, что была воспроизведена модель колита относительно легкого течения.

Морфологические и гистохимические изменения бокаловидных клеток при хроническом колите по сравнению с контрольной группой. При хроническом колите в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с контролем были снижены показатели интенсивности окрашивания и доли высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках. В медиальном отделе все исследуемые параметры возвращались к контрольным значениям. В проксимальном отделе при хроническом колите по сравнению с контролем были снижены показатели числа бокаловидных клеток на крипту, интенсивности

окрашивания и доли высокосульфатированных муцинов и увеличены размеры бокаловидных клеток и показатель интенсивности ШИК-реакции.

Литературные сведения об изменении числа и объемной доли бокаловидных клеток, их размеров, содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов в ободочной кишке при ДСН-колите у мышей отсутствуют. У человека при ЯК в период обострения заболевания в дистальном отделе число бокаловидных клеток уменьшается, а в период ремиссии – увеличивается (Sommers S.C., Korelitz B.I., 1975). При обострении ЯК у человека показано значительное снижение сульфатирования муцина в бокаловидных клетках, однако в период ремиссии оно возвращается к контрольным значениям (Van Klinken BJ et al., 1999).

По нашим данным, в дистальном и медиальном отделах ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 содержание бокаловидных клеток соответствует норме, однако в медиальном отделе повышено содержание нейтральных, а в дистальном – снижено содержание высокосульфатированных муцинов, что, очевидно, отражает наличие воспалительного процесса в этих отделах.

Наиболее выраженные изменения бокаловидных клеток по сравнению с контрольной группой наблюдаются в проксимальном отделе ободочной кишки: снижено число бокаловидных клеток, увеличены их размеры, содержание нейтральных муцинов в бокаловидных клетках повышено, а высокосульфатированных – снижено, соотношение высокосульфатированных и нейтральных муцинов смещено в сторону последних. Такие же изменения бокаловидных клеток мы наблюдали в дистальном отделе ободочной кишки при остром колите.

Дистальный и проксимальный отделы толстой кишки различаются по источнику развития, экспрессии ряда генов, кровоснабжению, метаболизму, абсорбционной активности, количественному и качественному составу микрофлоры (Glebov O.K et al., 2003, van der Post S., Hansson G.C., 2014), с чем, вероятно, и связаны наблюдаемые нами различия реактивных изменений разных отделов ободочной кишки у мышей при хроническом колите.

Изменение экспрессии гель-образующего и трансмембранных муцинов при хроническом колите по сравнению с контрольной группой. При хроническом колите по сравнению с контрольной группой статистически значимо возрастает уровень мРНК муцинов *Muc1* и *Muc2*, а уровень *Muc13* снижается.

С. Hoebler Et al. (2006) индуцировали хронический колит у самцов мышей BALB/c путем замены питьевой воды на 1% раствор ДСН на 5 дней и далее на 0,15% раствор ДСН на 28 дней. Согласно их данным, экспрессия мРНК *Muc2* в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки не отличается от контрольных значений. При ЯК у человека показано снижение уровня его биосинтеза и секреции, однако не выявлено изменений экспрессии его мРНК в бокаловидных клетках (Tytgat K.M. et al., 1996; Weiss A.A. et al., 1996; Hanski C. et al., 1999; Van Klinken B.J. et al., 1999). Нами выявлено повышение экспрессии мРНК *Muc2* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при хроническом колите, что, вероятно, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление непроницаемого для бактерий слоя слизи.

Согласно данным С. Hoebler et al. (2006), у самцов мышей BALB/c при хроническом ДСН-колите в дистальном отделе ободочной кишки экспрессия мРНК *Muc1* статистически значимо снижается по сравнению с контрольной группой. У больных ЯК продукция MUC1 в толстой кишке возрастает (Longman R.J. et al., 2006). Нами выявлено повышение экспрессии мРНК *Muc1* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при хроническом колите, что соответствует данным, полученным при ЯК у человека.

Согласно данным С. Hoebler et al. (2006), у мышей у самцов мышей BALB/c при хроническом ДСН-колите в ободочной кишке экспрессия мРНК *Muc3* не отличается от контрольных значений. Нами также не выявлено отличий экспрессии мРНК *Muc3* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при хроническом колите, по сравнению с контрольной группой, что соответствует нашим данным по ультраструктурному исследованию поверхности эпителиальной выстилки, согласно которым гликокаликс при хроническом колите имеет нормальную толщину.

Данные об экспрессии MUC13 в толстой кишке у человека при ЯК фрагментарны и противоречивы (Moehle C. et al. 2006), а данные об изменении продукции этого муцина при хроническом ДСН-колите в литературе отсутствуют. У мышей, нокаутных по гену муцина 13 (*Muc13^{-/-}*), острый ДСН-колит протекает тяжелее, чем у животных дикого типа (Sheng Y.H. et al., 2011). Нами выявлено снижение экспрессии мРНК *Muc13* в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при хроническом колите, что указывает на повреждение гликокаликса.

Таблица 43

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению экспрессии муцинов в толстой кишке при ЯК у человека и при хроническом ДСН-индуцированном колите у мышей по сравнению с нормой (авторы указаны в тексте)

Муцины (мышь/человек)	ЯК у человека	Острый ДСН-колит у мышей и крыс	
	Литературные данные	Литературные данные	Результаты собственных исследований
<i>Muc1 / MUC1</i>	↑	↓	↑
<i>Muc2 / MUC2</i>	↓/=	=	↑
<i>Muc3 / MUC17</i>	↓/↑	=	=
<i>Muc13 / MUC13</i>	↓/↑	Нет данных	↓

↑ - увеличивается, ↓ снижается, = - не изменяется

Таким образом, При хроническом колите в медиальном отделе ободочной кишки у мышей показано повышение уровня мРНК гель-образующего муцина *Muc2*, что, вероятно, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление защитного слоя слизи, повышение экспрессии трансмембранного повышение уровня мРНК *Muc1*, экспрессия которого отрицательно коррелирует с тяжестью течения колита, и снижение экспрессии короткого трансмембранного муцина *Muc13*, оказывающего защитное действие. Повышение продукции *Muc1* и снижение *Muc13* может вносить вклад в прогрессирование патологического

процесса. Изменение экспрессии *Muc13* при хроническом ДСН-колите нами оценено впервые (табл. 43).

Изменения экспрессии белков плотных контактов при хроническом колите по сравнению с контрольной группой. По нашим данным при хроническом колите экспрессия мРНК *Cldn2* статистически значимо выше нормы, а уровень *Cldn4* не отличается от контрольных значений. Литературные данные об изменении экспрессии клаудинов при хроническом ДСН-колите отсутствуют. При ЯК у человека экспрессия CLDN2 в толстой кишке возрастает и коррелирует с тяжестью заболевания (Oshima T., Miwa H., Joh T., 2008; Randall K et al., 2016), а экспрессия CLDN4 снижается при обострении (Oshima T., Miwa H., Joh T., 2008).

Выявленное нами повышение продукции мРНК *Cldn2*, вероятно, носит защитный характер, так как показано, что у трансгенных мышей с увеличенной экспрессией *Cldn2* как острый, так и хронический ДСН-колит протекает значительно легче, чем у животных дикого типа (Ahmad R. et al., 2014).

Таким образом, воспроизведенная в нашей работе модель хронического колита по клиническим проявлениям и морфологическим признакам соответствует литературным сведениям о хроническом ДСН-колите. Хронический колит, индуцированный потреблением 1% раствора ДСН в течение 5-и дней, является адекватной моделью клинической ремиссии или легкого течения ЯК у человека. Иммунные реакции в ободочной кишке при хроническом колите характеризуются выраженной воспалительной инфильтрацией СО с повышенным содержанием плазмоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, увеличенной экспрессией иммуносупрессорного цитокина IL10 и белка IL-12p40, являющегося субъединицей двух провоспалительных цитокинов. Выявлены морфофункциональные изменения эпителиального барьера. Нарушена барьерная роль слоя слизи: снижено содержания и доли высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках, что указывает на уменьшение сульфатирования муцинов, чаще чем в норме встречаются бактерии в непосредственной близости

от поверхности эпителиальной выстилки, усилена экспрессия мРНК *Muc2* – основного структурного компонента слизи, что, вероятно, направлено на компенсацию недостаточности муцинового барьера. Гликокаликс, хотя и имеет нормальную толщину, также изменен: повышена экспрессия *Muc1* и снижена *Muc13*, что негативно влияет на тяжесть течения колита. Клеточный состав эпителиальной выстилки соответствует норме в дистальном и медиальном отделах ободочной кишки, однако в проксимальном число бокаловидных клеток снижено и увеличены их размеры. Аналогичные изменения наблюдаются в дистальном отделе ободочной кишки при остром колите, они могут вносить вклад в распространение воспалительного процесса в проксимальном направлении, что характерно для больных ЯК. Повышена экспрессия «порообразующего» клаудина CLDN2. Итак, при хроническом колите, индуцированном ДСН, у мышей, несмотря на отсутствие клинических симптомов, в ободочной кишке выявляется хронический воспалительный процесс и нарушения эпителиального барьера.

Хронизация воспалительного процесса

У человека не удается выявить инициальные стадии ЯК, что не позволяет изучать механизмы хронизации воспалительного процесса на клиническом материале. Однако их можно проследить на экспериментальных моделях колита.

Клинические и морфологические проявления хронизации колита. С 9-ых по 22-ые сут. эксперимента наблюдалась гибель 30% (6 из 20) самцов мышей C57BL/6, потреблявших в течение первых 5-и сут. эксперимента 1% раствор ДСН. На 12-ые сут. у 10% животных наблюдалась диарея. На 28-ые сутки эксперимента по сравнению с 7-ыми сутками прекращалась диарея, повышалась активность животных, улучшалось состояние шерстного покрова, возрастали показатели массы тела и длины ободочной кишки. Распространенность язв в дистальном отделе ободочной кишки при хроническом колите статистически значимо уменьшалась по сравнению с острым. Язвы становились узкими, эпителизировались. Распространенность воспалительного процесса в СПСО и ПО не изменялась по сравнению с острым колитом. Увеличивалось расстояние между

дном крипт и мышечной пластинки из-за выраженной воспалительной инфильтрации базальной части СПСО. Крипты деформировались: появлялись ветвящиеся, изогнутые крипты с расширенными просветами. Увеличивалось число бокаловидных клеток. Развивался фиброз базального отдела СПСО. У одного животного развилась очаговая дисплазия эпителия ободочной кишки.

Таким образом, по мере хронизации воспалительного процесса клинические симптомы постепенно исчезают, восстанавливаются масса тела и длина ободочной кишки, снижается выраженность язвенного процесса в ободочной кишке, однако сохраняется выраженная воспалительная инфильтрация, кроме того нарушается гистоархитектоника крипт и наблюдается фиброз базальной части СПСО. Наши данные соответствуют литературным сведениям по ДСН-индуцированному колиту у мышей (Ahmad R. et al., 2014; Alex P. et al., 2009; Hall L.J. et al., 2011; Hans W., et al., 2000; Malgar S., Karlsson A., Michaelsson E., 2005).

Воспалительные и иммунные реакции при хроническом колите по сравнению с острым. При хроническом колите по сравнению с острым в СПСО ПО статистически значимо снижается показатель числа нейтрофилов и возрастает показатель числа плазмоцитов, в ПО также снижается количество лимфоцитов. В литературе данные по количественной оценке состава воспалительного инфильтрата при остром и хроническом колите представлены только в одной статье - Hall L.J. et al., 2011. Однако авторы, провели статистический анализ только для экспериментальных групп по сравнению с контрольной, а между собой группы мышей с острым и хроническим колитом не сравнивали. Анализ представленных в статье результатов указывает, что у самок мышей C57BL/6, потреблявших 6 дней 3% раствор ДСН и далее питьевую воду, на 25-ые сут. эксперимента по сравнению с 8-ми сут. в дистальном отделе ободочной кишки число нейтрофилов и макрофагов снижается, а число дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов не изменяется. Снижение числа нейтрофилов указывает на уменьшение выраженности реакций врожденного иммунитета, характерных для острого воспалительного ответа, а увеличение числа плазмоцитов – на активацию адаптивного звена иммунитета.

По нашим данным при хроническом колите по сравнению с острым в медиальном отделе ободочной кишки снижалась экспрессия мРНК IL-1 β и IL-2 и повышался уровень IFN γ и IL-17, а экспрессия IL4, IL6, IL-10, IL-12p40 и TGF β не изменялась. Литературные данные по изменению продукции цитокинов при хронизации ДСН-колита также немногочисленны. S. Melgar, A. Karlsson, E. Michaelsson (2005) оценивали продукцию цитокинов с использованием технологии xMAP и иммуноферментного анализа в гомогенате всей ободочной кишки у самок мышей C57BL/6, потреблявших в течение 5-и дней 3% раствор ДСН. Однако в статье не представлено статистической значимости различий продукции цитокинов в разные сроки эксперимента. Судя по графикам и таблицам, на 33-ые сутки эксперимента (хронический колит) по сравнению с 5-ми сутками (острый колит), возрастает продукция IL-1 β , IL-17 и IFN γ , но не изменяется продукция IL6 и IL-12p40. P. Alex et al. (2009) с использованием технологии xMAP оценивали изменение уровня цитокинов в сыворотке крови у мышей C57BL/6 обоего пола, у которых острый колит индуцировали потреблением 3% ДСН в течение 7 дней, а хронический колит - 4-мя циклами 3% ДСН по 7 дней с 10-ю дневными интервалами. Показано, что при хроническом колите по сравнению с острым в сыворотке крови снижается уровень IL-17 и повышается уровень IL-4 и IL-10. Уровни IFN γ , IL-12p40, IL-6 не изменяются. Несоответствие наших и литературных данных, очевидно, объясняется тем, что были использованы животные разного пола, разные методы индукции колита и сроки эксперимента, разные методики определения продукции цитокинов, разные биологические среды (табл. 44).

Изменение экспрессии IL-2 и TGF β при хроническом колите по сравнению с острым нами оценено впервые. Снижение экспрессии IL-2, вероятно, связано с завершением клональной экспансии и дифференцировки Т-лимфоцитов. Выявленное нами снижение экспрессии IL-1 β указывает на разрешение острого воспалительного процесса. Повышение продукции IL-17 и IFN γ может быть обусловлено активацией адаптивного звена иммунитета (Th1, Th17).

Таблица 44

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению уровня цитокинов в ободочной кишке и сыворотке крови у мышей при хроническом ДСН-индуцированном колите по сравнению с острым

Цитокин	Литературные данные		Результаты собственных исследований
	Ободочная кишка (Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E., 2005)	Сыворотка крови (Alex P. et al., 2009)	
IL-1 β	↑		↓
IL-2			↓
IL-4		↑	=
IL-6	=	=	=
IL-10		↑	=
IL-12p40	=	=	=
IL-17	↑	↓	↑
IFN γ	↑	=	↑
TGF β			=

↑ - увеличивается, ↓ снижается, = не изменяется

Ультраструктурные изменения эпителиальной выстилки при хроническом колите по сравнению с острым. Снижается число бактерий в непосредственной близости от поверхности эпителиальных клеток. Восстанавливается толщина гликокаликса, форма и регулярность расположения микроворсинок. Увеличивается число муциновых вакуолей в бескаемчатых колоноцитах. Таким образом, мы наблюдаем нормализацию ультраструктуры эпителиальных клеток ободочной кишки на границе медиального и дистального отделов. Литературные данные по ультраструктурным изменениям эпителиальных клеток ободочной кишки у мышей при хроническом ДСН-колите по сравнению с острым отсутствуют.

Изменение числа ЭЭК при хроническом колите по сравнению с острым.

Показатель числа ЭЭК во всех отделах ободочной кишки статистически значимо возрастает по сравнению с острым колитом. При остром колите мы выявили снижение количества выявляемых ЭЭК по сравнению с нормой и предположили, что это снижение вызвано гиперсекрецией. Вероятно, увеличение числа выявляемых ЭЭК при хроническом колите по сравнению с острым указывает на снижение секреторной активности этих клеток, но также может быть связано с изменением путей дифференцировки эпителиальных клеток. Литературные данные по изменению числа ЭЭК и продукции серотонина у мышей при хроническом ДСН-колите по сравнению с острым отсутствуют.

Морфологические и гистохимические изменения бокаловидных клеток при хроническом колите по сравнению с острым. По сравнению с острым колитом, при хроническом в дистальном отделе ободочной кишки возрастает показатель числа бокаловидных клеток и их объемная доля. В дистальном и медиальном отделах уменьшаются размеры бокаловидных клеток. Интенсивность окрашивания бокаловидных клеток альциановым синим не изменяется ни в одном из отделов ободочной кишки, а интенсивность ШИК-реакции возрастает в медиальном и проксимальном отделах. Соотношение высокосульфатированных и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках не изменяется.

Увеличение числа и объемной доли бокаловидных клеток, по-видимому, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление слизистого барьера. Увеличение числа бокаловидных клеток позволяет снизить их размеры, распределив продукцию необходимого объема слизи между большим числом клеток. Возрастание интенсивности ШИК-реакции в медиальном и проксимальном отделах может быть связано с распространением патологического процесса в проксимальном направлении. Литературные сведения об изменении числа и объемной доли бокаловидных клеток, их размеров, содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов в ободочной кишке при хроническом ДСН-колите у мышей отсутствуют.

Изменение экспрессии гель-образующего и трансмембранных муцинов при хроническом колите по сравнению с острым. При хроническом колите по сравнению с острым статистически значимых изменений экспрессии мРНК муцинов *Muc1*, *Muc2*, *Muc3* и *Muc13* не выявлено. Литературные данные об изменении продукции муцинов при хроническом ДСН-колите по сравнению с острым представлены всего в одной статье - Hoebler C. et al., 2006. У самцов мышей BALB/c, потреблявших в течение 5 дней 1% ДСН, а затем 28 дней 0,15% раствор ДСН, по сравнению с мышами, выведенными из эксперимента на 5 сутки, более чем в 6 раз снижалась экспрессия мРНК *Muc1* в дистальном отделе ободочной кишки, но не изменялась в проксимальном, экспрессия *Muc2* почти вдвое повышалась в проксимальном отделе, но не изменялась в дистальном, экспрессия *Muc3* статистически значимо не изменялась ни в одном из отделов (таблица 45).

Таблица 45

Сопоставление литературных и собственных данных по изменению экспрессии муцинов в ободочной кишке у мышей при хроническом ДСН-индуцированном по сравнению с острым колитом

Муцины	Литературные данные (Hoebler C. et al., 2006)	Результаты собственных исследований
<i>Muc1</i>	=/↓	=
<i>Muc2</i>	=/↑	=
<i>Muc3</i>	=	=
<i>Muc13</i>	Нет данных	=

↑ – возрастает, ↓ – снижается, = – не изменяется

Несоответствие наших и литературных данных объясняется использованием разных линий животных, разными методами индукции колита и сроками эксперимента. Кроме того, в работе С. Hoebler et al. (2006) животные получали 0,15% раствор ДСН до самого окончания эксперимента (до 28 дня), в связи с чем данный вариант колита правильнее считать подострым, а не хроническим.

Изменение экспрессии *Muc13* в ободочной кишке при хроническом колите по сравнению с острым нами было оценено впервые.

Изменения экспрессии белков плотных контактов при хроническом колите по сравнению с острым. При хроническом колите уровень экспрессии мРНК клаудинов *Cldn2* и *Cldn4* статистически значимо не отличается от соответствующих значений при остром колите. Литературные данные об изменении экспрессии клаудинов при хроническом ДСН-колите отсутствуют.

Изучение механизмов хронизации воспалительного процесса при ЯК необходимо для понимания механизмов развития данного заболевания. Как было показано в двух предыдущих разделах, ДСН-индуцированный колит у мышей является адекватной моделью ЯК у человека, сравнение хронического и острого ДСН-колита может пролить свет на механизмы развития ЯК. Однако литературные данные по иммунным реакциям и изменениям эпителиального барьера ободочной кишки при хроническом ДСН-колите по сравнению с острым представлены крайне скудно. Мы показали, что при хронизации воспалительного процесса в ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6, потреблявших в течение первых 5-и сут. эксперимента 1% раствор ДСН, на микроскопическом и ультрамикроскопическом уровне наблюдается регенерация СО и восстановление ультраструктуры эпителиальных клеток. Однако встречаются язвы, сохраняется выраженная воспалительная инфильтрация СО, но снижается количество нейтрофилов и возрастает – плазмочитов. В медиальном отделе ободочной кишки снижается экспрессия мРНК $IL-1\beta$ и $IL-2$ и возрастает экспрессия $IFN\gamma$ и $IL-17$. Число бактерий в непосредственной близости от эпителиальной выстилки значительно уменьшается, что свидетельствует о восстановлении защитного слоя слизи. На восстановление слоя слизи также указывает возрастание числа и объемной доли бокаловидных клеток, выявляемых по содержимому их секреторных отделов, и уменьшение их размеров. Толщина гликокаликса возрастает, возвращаясь к норме. Хотя статистически значимых различий по экспрессии трансмембранных муцинов между группами мышей с хроническим и

острым колитом не выявлено, отмечается тенденция к нормализации экспрессии *Muc3* (при остром колите она статистически значимо снижена, а при хроническом – не отличается от контрольных значений), повышению экспрессии *Muc1* (при остром колите она не отличается от контрольных значений, а при хроническом статистически значимо выше чем в контрольной группе) и снижению экспрессии *Muc13* (при остром колите она не отличается от контрольных значений, а при хроническом статистически значимо ниже чем в контрольной группе). Значимых изменений состава гликокаликса в процессе хронизации не выявляется. В составе эпителиальной выстилки возрастает число выявляемых секреторных (бокаловидных и ЭЭК) клеток. Гистоархитектоника крипт нарушается: крипты, расширяются, изгибаются, ветвятся. Изменений экспрессии белков плотных контактов не выявлено.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели колита, индуцированного заменой питьевой воды на 5 суток 1% раствором декстрансульфата натрия, у самцов мышей C57BL/6 исследованы морфофункциональные изменения эпителиального барьера ободочной кишки.

У животных контрольной группы выявлены цитофизиологические различия секреторных клеток между отделами ободочной кишки. Число выявляемых энтероэндокринных и бокаловидных клеток, а также содержание в последних высокосульфатированных и нейтральных муцинов возрастают от проксимального к дистальному отделу. Размеры бокаловидных клеток максимальны в медиальном отделе. Данные различия, очевидно, обусловлены особенностями развития, строения, функции и состава микрофлоры разных отделов.

При остром и хроническом колите у самцов мышей C57BL/6 наблюдаются региональные особенности цитофизиологических изменений секреторных клеток. Изменения бокаловидных клеток при остром колите наиболее выражены в дистальном отделе, что соответствует наибольшей выраженности язвенно-воспалительного процесса. При хроническом колите изменения бокаловидных клеток наиболее выражены в проксимальном отделе, хотя воспалительный процесс здесь минимален. Возможно, эти изменения вносят вклад в прогрессирование колита и его распространение в проксимальном направлении при длительном течении заболевания. Статистически значимое изменение числа выявляемых ЭЭК отмечается только в медиальном отделе при остром колите.

Острый колит характеризуется выраженной воспалительной инфильтрацией слизистой оболочки преимущественно нейтрофилами и лимфоцитами, увеличенной экспрессией цитокинов острой фазы воспаления IL-1 β и IL-6 и противовоспалительного цитокина TGF β . Нарушения эпителиального барьера характеризуются увеличением числа бактерий в непосредственной близости от поверхности эпителиальных клеток, что обусловлено повышением проницаемости слоя слизи; снижением содержания сульфомуцинов в бокаловидных клетках, что указывает на снижение устойчивости слизи к

бактериальным ферментам; уменьшением количества муциновых вакуолей в бескаемчатых колоноцитах, гипертрофией бокаловидных клеток, что, вероятно, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление защитного слоя слизи. Гликокаликс истончен, экспрессия гена его основного структурного компонента *Muc3* снижена. Микроворсинки деформированы, расположены нерегулярно, что может приводить к нарушению всасывания веществ из просвета кишки. Наблюдаются изменения клеточного состава эпителия: снижено число выявляемых ЭЭК в медиальном отделе ободочной кишки и бокаловидных клеток на всем протяжении ободочной кишки, что может влиять на моторику кишечника и продукцию слизи. Увеличена экспрессия мРНК клаудина *Cldn2*, что отражает повышение проницаемости плотных контактов.

Хронический колит характеризуется выраженной воспалительной инфильтрацией СО с повышенным содержанием плазмоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, увеличенной экспрессией иммуносупрессорного цитокина IL10 и белка IL-12p40, являющегося субъединицей двух провоспалительных цитокинов – IL-12 и IL-23. Изменения эпителиального барьера характеризуются сниженным содержанием сульфомуцинов в бокаловидных клетках, повышенной экспрессией мРНК *Muc2* – основного структурного компонента слизи, что, вероятно, направлено на восстановление плотного слоя слизи, изменением экспрессии муцинов гликокаликса: повышенной экспрессией *Muc1*, ассоциированного с канцерогенезом, и сниженной *Muc13*, отсутствие которого приводит к более тяжелому течению колита; в проксимальном отделе ободочной кишки число выявляемых бокаловидных клеток снижено и увеличены их размеры; повышена экспрессия порообразующего клаудина *Cldn2*.

При хронизации колита на микроскопическом и ультрамикроскопическом уровне наблюдается восстановление эпителиальной выстилки. Число бактерий в непосредственной близости от эпителиальной выстилки уменьшается, что свидетельствует о восстановлении защитного слоя слизи. На восстановление слоя слизи также указывает возрастание числа и объемной доли выявляемых бокаловидных клеток и уменьшение их размеров. Толщина гликокаликса

возрастает, возвращаясь к норме. В составе эпителиальной выстилки увеличивается число выявляемых бокаловидных и энтероэндокринных клеток. Однако обнаруживаются язвы, сохраняется выраженная воспалительная инфильтрация слизистой оболочки. Снижается экспрессия мРНК IL-1 β и IL-2 и возрастает – IFN γ и IL-17. Повышенная экспрессия *Cldn2* сохраняется.

Полученные в работе новые данные о морфофункциональных нарушениях эпителиального барьера при остром и хроническом экспериментальном колите следует учитывать при изучении механизмов ЯК у человека и разработке новых подходов к диагностике и лечению этого заболевания.

7. ВЫВОДЫ

1. На модели колита, индуцированного 1% раствором декстрансульфата натрия у половозрелых самцов мышей C57BL/6, установлено, что при остром и хроническом колите наблюдаются различающиеся по механизмам структурные, цитофизиологические и молекулярно-биологические нарушения эпителиального барьера ободочной кишки.
2. Экспериментальный острый колит характеризуется выраженными клиническими и морфологическими изменениями. В ободочной кишке выявляются острые язвы, крипт-абсцессы, преимущественно нейтрофильная и лимфоцитарная инфильтрация слизистой оболочки, повышение экспрессии мРНК цитокинов острой фазы воспаления – IL-1 β , IL-6 и противовоспалительного TGF β .
3. При экспериментальном хроническом колите клинические проявления отсутствуют, а в ободочной кишке определяются признаки колита: эпителизированные язвы, нарушение гистоархитектоники крипт, воспалительная лимфоцитарная и плазмоцитарная инфильтрация слизистой оболочки, очаговый фиброз. По сравнению с острым колитом снижается уровень мРНК IL-1 β и IL-2 и повышается – IFN γ и IL-17, а по сравнению с контрольной группой увеличивается содержание мРНК IL-10 и IL-12p40.
4. При остром колите выявлены нарушения эпителиального барьера ободочной кишки: повышение проницаемости слоя слизи для бактерий; истончение гликокаликса и снижение экспрессии мРНК его основного структурного компонента – муцина Muc3; уменьшение числа выявляемых энтероэндокринных и бокаловидных клеток, увеличение размеров последних и снижение содержания в них сульфомуцинов; повышение экспрессии мРНК порообразующего клаудина Cldn2. В зонах с сохраненной эпителиальной выстилкой на ультраструктурном уровне обнаружены повреждения колоноцитов.
5. При хроническом колите нарушения эпителиального барьера ободочной кишки по сравнению с острым колитом менее выражены. Барьерная функция слизи восстанавливается и повышается экспрессия ее основного структурного

компонента Muc2; нормализуется толщина гликокаликса, но изменяется экспрессия его компонентов: уровень мРНК Muc1 повышается, а Muc13 – снижается. Клеточный состав эпителиальной выстилки и размеры бокаловидных клеток нормализуются в дистальном и медиальном отделах. Содержание сульфомуцинов в бокаловидных клетках снижается в дистальном и проксимальном отделах. Экспрессия мРНК клаудина Cldn2 остается повышенной. На ультраструктурном уровне изменения эпителиальных клеток не выражены.

6. Выявлены региональные различия секреторных клеток ободочной кишки у мышей C57BL/6 в норме и при остром и хроническом колите. В норме в направлении от проксимального к дистальному отделу возрастает число секреторных клеток. Содержание сульфатированных и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках в дистальном отделе выше, чем в медиальном. При остром колите цитофизиологические изменения бокаловидных клеток наиболее выражены в дистальном отделе, что коррелирует с высокой распространенностью язвенно-воспалительного процесса, а при хроническом колите – в проксимальном отделе, но воспалительный процесс в нем выражен минимально.

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1. ДСН – декстрансульфат натрия
2. ИФА – иммуноферментный анализ
3. кДНК – комплементарная ДНК
4. МСК – мезенхимальные стромальные клетки
5. МЭЛ – межэпителиальные лимфоциты
6. ПО – подслизистая основа
7. ПЦР – полимеразная цепная реакция
8. СО – слизистая оболочка
9. СОЭ – скорость оседания эритроцитов
10. СПСО – собственная пластинка слизистой оболочки
11. ТНБС – 2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота
12. ЭКК – эпителиальные клетки кишечника
13. ЭЭК – энтероэндокринные клетки
14. ЯК – язвенный колит
15. ALR – AIM2 (Absent In Melanoma 2)-Like Receptors – AIM2-подобные рецепторы
16. ANCA – Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies – антинейтрофильные цитоплазматические антитела
17. APRIL – A ProlifeRation-Inducing Ligand – лиганд, индуцирующий пролиферацию
18. ASCA – Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies – антитела к *Saccharomyces Cerevisiae*
19. BAFF – B cell-Activating Factor – фактор, активирующий В-клетки
20. C1GALT1 – Glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase 1 – Гликопротеин-N-ацетилгалактозамин-3-бета-галактозилтрансфераза 1
21. CAMP – Commensal-Associated Molecular Patterns – молекулярные паттерны, ассоциированы с комменсальными микроорганизмами
22. CCL20 – C-C motif chemokine Ligand 20

23. CEA - CarcinoEmbryonic Antigen – раковый эмбриональный антиген
24. CLDN – claudin – клаудин
25. CLR – C-type Lectin Receptors – лектиновые рецепторы С-типа
26. DAMP – Danger-Associated Molecular Patterns – молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью
27. EBV3 – Epstein-Barr virus Induced 3 – индуцируемый вирусом Эпштейна-Барра 3
28. EC cells – EnteroChromaffin cells – энтерохромаффинные клетки
29. ECM1 – ExtraCellular Matrix protein 1 – внеклеточный матриксный белок 1
30. EGF – Epidermal Growth Factor – эпидермальный фактор роста
31. FCGBP – Fc- γ binding protein – Fc- γ связывающий белок
32. FOXP3 – forkhead box P3
33. FRMPD2 – FERM and PDZ Domain-containing protein 2 – белок, содержащий домены FERM and PDZ
34. GlcNAc6ST-2 – N-Acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 – N-ацетилглюкозамин 6-О-сульфотрансфераза-2
35. GLP – Glucagon-Like Peptide – глюкагоноподобный пептид
36. GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
37. GP2 – GlycoProtein 2 - гликопротеин 2
38. GRB2 – Growth factor Receptor Bound protein 2 - белок, связывающий рецептор фактора роста, 2
39. HBD – Human Beta Defensin – β -дефензин человека
40. HLA – Human Leukocyte Antigen – человеческий лейкоцитарный антиген
41. HNF4a – Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha – ядерный фактор гепатоцитов 4 α
42. HSP – Heat Shock Protein – белок теплового шока
43. IFN – InterFeroN – интерферон
44. IL – InterLeukin – интерлейкин
45. ILC – Innate Lymphoid Cells - врожденные лимфоидные клетки
46. I κ B – Inhibitor of NF- κ B – ингибитор NF- κ B

47. JAM – Junctional Adhesion Molecules – молекулы адгезии межклеточных контактов
48. MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase – митоген-активируемая протеинкиназа
49. MCP-1 – Monocyte Chemoattractant Protein 1 – хемоаттрактант моноцитов 1
50. МНС – Major Histocompatibility Complex – Главный комплекс гистосовместимости
51. MUC – Mucin – муцин
52. NF- κ B – Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерный фактор «каппа-би»
53. NK – Natural Killer – естественные киллеры
54. NLR – NOD-like receptors – NOD-подобные рецепторы
55. NOD – Nucleotide-binding Oligomerization Domain - нуклеотид-связывающий домен олигомеризации
56. OD – optical density – оптическая плотность
57. PAMP – Pathogen-Associated Molecular Patterns - патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
58. pANKA – Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies – Перинуклеарные антинейтрофильные цитоплазматические антитела
59. PBS – Phosphate buffered saline – Фосфатно-Солевой Буфер
60. pIgR – polymeric Immunoglobulin Receptor – полимерный рецептор иммуноглобулина
61. PRR – Pattern-Recognition Receptors – паттерн-распознающие рецепторы
62. PTS – тандемные повторы с высоким содержанием пролина (P), треонина (T) и серина (S)
63. RAG – Recombination Activating Gene – ген, активирующий рекомбинацию
64. RELM β – Resistin-like Molecule Beta – резистин-подобная молекула β
65. RLR – RIG-I (Retinoic acid-Inducible Gene 1)-like receptor – RIG-I-подобные рецепторы
66. EA – Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin

67. SLC9A3 – SoLute Carrier family 9 member A3
68. TCR – T-cell receptor – Т-клеточный рецептор
69. TFF3 – TreFoil Factor 3 – фактор трилистника 3
70. TGF – Transforming Growth Factor – трансформирующий фактор роста
71. TGF β R – Transforming Growth Factor β receptor – рецептор трансформирующего фактора роста β
72. TLR – Toll-Like Receptors - Толл-подобные рецепторы
73. TNF – Tumor Necrosis Factor - фактор некроза опухоли
74. TPH1 – Tryptophan hydroxylase 1 – триптофангидроксилаза 1
75. Treg – regulatory T cells – регуляторные Т-клетки
76. TSLP – Thymic Stromal LymphoPoietin – тимический стромальный лимфопоэтин
77. VNTR – Variable Number Tandem Repeats
78. vWF-C, vWF-D – von Willebrand Factor C, D –домены фактора фон Виллебранда D и C
79. ZO – Zona Occludens

9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулхаков С.Р., Абдулхаков Р.А. Неспецифический язвенный колит: современные подходы к диагностике и лечению // Вестник современной клинической медицины. – 2009. – №1(2). – С.32-41.
2. Василенко И.В. Морфологическая диагностика неспецифического язвенного колита. // Журнал Новости медицины и фармации. Гастроэнтерология (тематический номер). – 2010. – №313. - С.21-25.
3. Ватутин Н.Т., Шевелёк А.Н., Карапыш В.А., Василенко И.В. Неспецифический язвенный колит // Архивъ внутренней медицины. – 2015. – № 4(24). – С.62-65.
4. Гайер Г. Электронная гистохимия // М.: Мир. – 1974. – 488 с.
5. Гржибовский А.М., Иванов С.В., Горбатова М.А. Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии // Наука и здравоохранение. – 2016. – № 4. – С.5-37
6. Дорофеев А.Э., Василенко И.В., Рассохина О.А. Изменения экспрессии MUC2, MUC3, MUC4, TFF3 в слизистой оболочке толстого кишечника у больных неспецифическим язвенным колитом // Гастроэнтерология. – 2013. - №1(47). – С.80-84.
7. Ивашкин В.Т., Шельгин Ю.А., Халиф И.Л. и др. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита // Колопроктология. – 2017. – №1(59). – С. 6-30.
8. Капуллер Л.Л. Патологоанатомические изменения толстой кишки при неспецифических воспалительных заболеваниях кишечника // Неспецифические воспалительные заболевания кишечника / под ред. Воробьева Г. И., Халифа И. Л. - М.: Миклош, 2008. – С.73-76.
9. Князев О.В., Каграманова А.В., Болдырева О.Н. и др. Применение мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в лечении больных с

- острой атакой язвенного колита // SCIENCEWISE. – 2015. – №4/4(9). – С. 24-31.
10. Конович Е.А., Широких К.Е., Халиф И.Л., Шапина М.В. Цитокины толстой кишки при тяжелой форме язвенного колита // РЖГГК. – 2016. – №1(25). – С.93-98.
 11. Костюкевич С.В. Эндокринный аппарат эпителия слизистой оболочки толстой кишки отдельных представителей позвоночных животных и человека в норме и некоторых видах патологии: автореферат дис. доктора медицинских наук: 03.00.25 / НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, 2004. – 39 с.
 12. Маркова А.А., Кашкина Е.И. Современные методы диагностики и оценки тяжести течения неспецифического язвенного колита // Вестник ТГУ. – 2012. – №3(17). – С.915-919.
 13. Мастицкий С. Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований / Минск, РУП «Институт рыбного хозяйства», 2009. – 79с.
 14. Могильная Г.М., Могильная В.Л. Гастроинтестинальный защитный барьер // Морфология: научно-теоретический медицинский журнал. – 2007. – №6(131). - С. 9-16.
 15. Парфенов А.И. Воспалительные заболевания кишечника в XXI веке // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. –2012. – №3. – С.3-6.
 16. Сергиенко Е.И. О риске развития колоректального рака у больных неспецифическим язвенным колитом по данным доказательной медицины // Современная гастроэнтерология. – 2012. – №6(68). – С.62-67.
 17. Сичинава И.В., Горелов А.В. Неспецифический язвенный колит у детей // ДОКТОР.РУ. –2009. – №1(45). – С.82-88.
 18. Тертычный А.С., Ахриева Х.М., Селиванова Л.С. Сравнительная оценка результатов эндоскопического и морфологического методов исследования у больных с воспалительными заболеваниями кишечника // Хирург. – 2014. – №12. – С.4-14.

19. 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. – № 4(20). – С. 49-54.
20. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е., Волынская Е.И. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем // Практическая медицина. – 2012. – №3(58). – С.17-22.
21. Хэм А., Кормак Д. Гистология. В пяти томах. Том 4 / Перевод с английского Быкова В.Л., под редакцией Афанасьева Ю.И., Ченцова Ю.С. Москва «МИР», 1983. – 246с.
22. Циммерман Я.С., Циммерман И.Я., Третьякова Ю.И. Язвенный колит и болезнь Крона: современные представления. Часть 2. Диагностика и дифференцированная терапия // Клиническая медицина. – 2013. – №12. – С.9-16.
23. Шапошников В.И. К вопросу патогенеза неспецифического язвенного колита // Успехи современного естествознания. –2013. – №7. – С.27-29.
24. Шапошников В.И. Сторожук П.Г. О патогенезе неспецифического язвенного колита // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – №142 (7). – С.129-131.
25. Щукина О.Б., Кондрашина Э.А., Харитидис А.М., Ботина А.В., Маркова Е.А. Оценка гистологических показателей у больных с клинической ремиссией язвенного колита // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – №6(100). – С.39-43.
26. Элина А.А. Клинические проявления и особенности течения неспецифического язвенного колита и болезни Крона // Гастроэнтерология. – 2013. – №451. – С.14-19
27. Ярилин А. А. Иммунология: учебник / М. : ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 752 с.
28. Abdi K., Singh N.J. Making many from few: IL-12p40 as a model for the combinatorial assembly of heterodimeric cytokines // Cytokine. –2015. – №76(1). – P.53-57.

29. Ahmad R., Chaturvedi R., Olivares-Villagomez D. et al. Targeted colonic claudin-2 expression renders resistance to epithelial injury, induces immune suppression, and protects from colitis // *Mucosal Immunol.* – 2014. – №7(6) – P.1340-1353.
30. Alex P., Zachos N.C., Nguyen T. et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis // *Inflamm Bowel Dis.* – 2009. – №15(3). –P.341-352.
31. Antoni L., Nuding S., Wehkamp J., Stange E.F. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease // *World J Gastroenterol.* – 2014. – №20(5). – P.1165-1179.
32. Antoni L., Nuding S., Weller D. et al. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides // *J Crohns Colitis.* – 2013. – №7(12). –P.e652-664.
33. Arai Y., Takanashi H, Kitagawa H, Okayasu I. Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice // *Cytokine.* –1998. – №10(11). – P.890-896.
34. Bach S.P., Renehan A.G., Potten C.S. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm // *Carcinogenesis.* – 2000. – №21(3). – P.469-476.
35. Bachmann M.F., Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again // *EMBO Rep.* – 2007. – №8(12). – P.1142-1148/
36. Bamias G., Kaltsa G., Ladas S.D. Cytokines in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis // *Discov Med.* – 2011. – №11(60). – P.459-467.
37. Barkas F., Liberopoulos E., Kei A., Elisaf M. Electrolyte and acid-base disorders in inflammatory bowel disease // *Ann Gastroenterol.* – 2013. – №26(1). – P.23-28.
38. Belousova E.A. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Russia // *Falk Symposium.* – 2006. – P.31.
39. Benítez J.M., García-Sánchez V. Faecal calprotectin: Management in inflammatory bowel disease // *World J Gastrointest Pathophysiol.* – 2015 – №6(4). – P.203-209.
40. Bennett K.M., Parnell E.A., Sanscartier C. et al. Induction of Colonic M Cells during Intestinal Inflammation // *Am J Pathol.* – 2016. – №186(5). – P.1166-1179.

41. Beringer A., Noack M., Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting // Trends Mol Med. – 2016. – №22(3). – P.230-241.
42. Bernardo D., Vallejo-Diez S., Mann E.R. et al. IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and Tcells they stimulate // Eur J Immunol. – 2012. – №42(5). – P.1337-1353.
43. Bertrand P.P., Barajas-Espinosa A., Neshat S. et al. Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2010. – №298(3). – P.G446-455.
44. Boismenu R., Chen Y. Insights from mouse models of colitis // J Leukoc Biol. – 2000. – №67(3). – P.267-278.
45. Brubaker S.W., Bonham K.S., Zanoni I., Kagan J.C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective // Annu Rev Immunol. – 2015. – №33. – P.257-290.
46. Bustos D., Negri G., De Paula J.A. et al. Colonic proteinases: increased activity in patients with ulcerative colitis // Medicina (B Aires). – 1998. – №58(3). – P.262-264.
47. Cerutti A., Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses // Immunity. – 2008. – №28(6). – P.740-750.
48. Chen M., Gao L., Chen P. et al. Serotonin-exacerbated DSS-induced colitis is associated with increase in MMP-3 and MMP-9 expression in the mouse colon // Mediators Inflamm. – 2016. – №2016. – P.5359768.
49. Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes // Nat Rev Immunol. – 2011. – №11(7). –P. 445-456.
50. Cioffi M., Rosa A.D., Serao R. et al. Laboratory markers in ulcerative colitis: Current insights and future advances // World J Gastrointest Pathophysiol. – 2015. – №6(1). – P.13-22.
51. Clapper M.L., Cooper H.S., Chang W.C. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions // Acta Pharmacol Sin. – 2007. – №28(9). – P.1450-1459.

52. Coates M.D., Mahoney C.R., Linden D.R. et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome // *Gastroenterology*. – 2004. – №126(7). – P.1657-1664.
53. Cooper A.M., Khader S.A. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine // *Trends Immunol.* – 2007. – №28(1). – P.33-38.
54. Corfield A.P., Carroll D., Myerscough N., Probert C.S. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease // *Front Biosci.* – 2001. – №6. – P.D1321-1357.
55. Corfield A.P., Wagner S.A., O'Donnell L.J. et al. The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin // *Glycoconj J.* – 1993. – №10(1). – P. 72-81.
56. Coskun M. Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease // *Front Med (Lausanne)*. – 2014. – №1. – P.24.
57. Cosnes J., Gower-Rousseau C., Seksik P., Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases // *Gastroenterology*. – 2011. – №140(6). – P.1785-1794.
58. Coutinho de Sousa B., Reis Machado J., da Silva M.V. et al. Morinda citrifolia (Noni) Fruit Juice Reduces Inflammatory Cytokines Expression and Contributes to the Maintenance of Intestinal Mucosal Integrity in DSS Experimental Colitis // *Mediators Inflamm.* – 2017. – №2017. – P.6567432.
59. Cristina M.L., Lehy T., Zeitoun P., Dufougeray F. Fine structural classification and comparative distribution of endocrine cells in normal human large intestine // *Gastroenterology*. – 1978. – №75. – P. 20–28.
60. de Mattos B.R., Garcia M.P., Nogueira J.B., Paiatto L.N., Albuquerque C.G., Souza C.L., Fernandes L.G., Tamashiro W.M., Simioni P.U. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments // *Mediators Inflamm.* – 2015. – №2015. – P.493012.
61. Delva E., Tucker D.K., Kowalczyk A.P. The desmosome // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2009. – №1(2). – P.a002543.

62. Deplancke B., Gaskins H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer // *Am J Clin Nutr.* – 2001. – №73(6). – P.1131S-1141S.
63. DeRoche T.C., Xiao S.Y., Liu X. Histological evaluation in ulcerative colitis // *Gastroenterol Rep (Oxf).* – 2014. – №2(3). –P.178-192.
64. Dharmani P., Leung P., Chadee K. Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis // *PLoS One.* – 2011. – №6(9). – P.e25058.
65. Egger B., Bajaj-Elliott M., MacDonald T.T. et al. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency // *Digestion.* –2000. – №62(4). – P.240-248.
66. El-Salhy M., Danielsson A., Stenling R., Grimelius L. Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease // *J Intern Med.* – 1997. – №242(5). – P.413-419.
67. El-Salhy M., Mazzawi T., Gundersen D. et al. The role of peptide YY in gastrointestinal diseases and disorders (review) // *Int J Mol Med.* – 2013. – №31(2). – P.275-282.
68. Erickson NA, Mundhenk L, Giovannini S, Glauben R, Heimesaat MM, Gruber AD. Role of goblet cell protein CLCA1 in murine DSS colitis // *J Inflamm (Lond).* – 2016. – №13. – P.5.
69. Evans D.F., Pye G., Bramley R., Clark A.G., Dyson T.J., Hardcastle J.D. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects // *Gut.* – 1988 – №29(8). –P.1035-1041.
70. Fratila O., Ilias T., Maghiar T.T. et al. Ultrastructural aspects of the colonic epithelium in ulcerative colitis // *Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, Seria Științele Vieții (Life Sciences Series).* – 2008. – №18. – P.215-218
71. Fujimura Y., Iida M. A new marker for cup cells in the rabbit small intestine: expression of vimentin intermediate filament protein // *Med Electron Microsc.* – 2001. – №34(4). – P.223-229.

72. Fukuda S., Kato H., Sano M., Baba T. et al. Investigation of regional differences in water and electrolyte absorption across the human colon by in vivo perfusion method // *Jpn J Med.* –1986. – №25(2). – P.162-166.
73. Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation // *Arthritis Res Ther.* – 2006. – №8 – Suppl 2:S3.
74. Gadaleta R.M., Garcia-Irigoyen O., Moschetta A. Exploration of Inflammatory Bowel Disease in Mice: Chemically Induced Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD) // *Curr Protoc Mouse Biol.* – 2017. – №7(1). – P.13-28.
75. Garlanda C., Dinarello C.A., Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future // *Immunity.* – 2013. – №39(6). – P.1003-1018.
76. GeneCards®: The Human Gene Database <http://www.genecards.org/> (дата обращения 25.11.2015)
77. Geremia A., Biancheri P., Allan P. et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease // *Autoimmun Rev.* – 2014. – №13(1). – P.3-10.
78. Glebov O.K., Rodriguez L.M., Nakahara K., et al. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2003. – №12(8). – P.755-762.
79. Gledhill A., Hall P.A., Cruse J.P., Pollock D.J. Enteroendocrine cell hyperplasia, carcinoid tumours and adenocarcinoma in long-standing ulcerative colitis // *Histopathology.* – 1986. – №10(5). – P.501-508.
80. Globig A.M., Hennecke N., Martin B. et al. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN- γ +IL-17+coproducing CD4+ T cells in active inflammatory bowel disease // *Inflamm Bowel Dis.* – 2014. – №20(12). – P.2321-2329.
81. Groschwitz K.R., Hogan S.P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis // *J Allergy Clin Immunol.* –2009. – №124(1). – P.3-20.
82. Gunawardene A.R., Corfe B.M., Staton C.A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract // *Int J Exp Pathol.* – 2011. – №92(4). – P.219-231.

83. Günzel D., Yu A.S. Claudins and the modulation of tight junction permeability // *Physiol Rev.* – 2013. – №93(2). – P.525-569.
84. Hall L.J., Faivre E., Quinlan A. et al. Induction and activation of adaptive immune populations during acute and chronic phases of a murine model of experimental colitis // *Dig Dis Sci.* – 2011. – №56(1). – P.79-89.
85. Hans W., Scholmerich J., Gross V., Falk W. The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2000. – №12. – P.267–273.
86. Hanski C., Born M., Foss H.D. et al. Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core // *J Pathol.* – 1999. – №188(3). – P.304-311.
87. Hernández-Trejo J.A., Suárez-Pérez D., Gutiérrez-Martínez I.Z. et al. The pro-inflammatory cytokines IFN γ /TNF α increase chromogranin A-positive neuroendocrine cells in the colonic epithelium // *Biochem J.* – 2016. – №473(21). – P.3805-3818.
88. Higuchi T., Orita T., Nakanishi S. et al. Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of MUC20, a novel mucin protein, up-regulated in injured kidney // *J Biol Chem.* – 2004. – №279(3). – P.1968-1979.
89. Hirano I., Kuhara K., Yamaji T. et al. Carcinogenicity of dextran sulfate sodium in relation to its molecular weight // *Cancer Lett.* – 1983. – №18(1). – P.29-34.
90. Hoebler C., Gaudier E., De Coppet P. et al. MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice // *Dig Dis Sci.* – 2006.– №51(2). – P.381-389.
91. Hu S., Wang Y., Lichtenstein L. et al. Regional differences in colonic mucosa-associated microbiota determine the physiological expression of host heat shock proteins // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2010. – №299(6). – P.G1266-75.
92. Hudcovic T., Stěpánková R., Cebra J., Tlaskalová-Hogenová H. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared

- immunocompetent and immunodeficient mice // *Folia Microbiol (Praha)*. –2001. – №46(6). – P.565-572
93. HUGO Gene Nomenclature Committee <http://www.hugo-international.org/> (дата обращения 25.11.2015)
94. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? // *Int J Cancer*. – 2002. – №101(5). – P.403-408.
95. Issa C.M., Hambly B.D., Wang Y. et al. TRPV2 in the development of experimental colitis // *Scand J Immunol*. – 2014. – №80(5). – P.307-12.
96. Ito R., Kita M., Shin-Ya M. et al. Involvement of IL-17A in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2008. – №377(1). – P.12-16.
97. Itoh Y., Kamata-Sakurai M., Denda-Nagai K. et al. Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin // *Glycobiology*. – 2008. – №18 (1). – P.74-83.
98. Johansson M.E., Gustafsson J.K., Sjöberg K.E. et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model // *PLoS One*. – 2010. – №5(8). – P.e12238.
99. Johansson M.E., Sjövall H., Hansson G.C. The gastrointestinal mucus system in health and disease // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2013. – №10 (6) – P.352-361.
100. Jonckheere N., Skrypek N., Frénois F., Van Seuning I. Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function // *Biochimie*. – 2013. – №95(6). – P.1077-1086.
101. Kaiko G.E., Horvat J.C., Beagley K.W., Hansbro P.M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? // *Immunology*. – 2008. – №123(3). – P.326-338.
102. Kiesler P., Fuss I.J., Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. – 2015.– №1(2). – P.154-170.
103. Kim D.H., Cheon J.H. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies // *Immune Netw*. –2017. – №17(1). – P.25-40.

104. Kim D.J., Kim K.S., Song M.Y. et al. Delivery of IL-12p40 ameliorates DSS-induced colitis by suppressing IL-17A expression and inflammation in the intestinal mucosa // *Clin Immunol.* – 2012. – №144(3). – P.190-199.
105. Kim J.J., Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD // *J Vis Exp.* – 2012. – №60. – P. pii: 3678.
106. Kim Y.S., Ho S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress // *Curr Gastroenterol Rep.* – 2010. – №12(5). – P.319-330.
107. Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights // *Exp Anim.* – 2000. – №49(1). – P.9-15.
108. Koutroubakis I.E. Recent advances in the management of distal ulcerative colitis // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* – 2010. – №1(2). – P.43-50.
109. Laroui H., Ingersoll S.A., Liu H.C. et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon // *PLoS One.* – 2012. – №7(3). – P.e32084.
110. Legaki E., Gazouli M. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* – 2016. – №7(1). – P.112-125.
111. Liu L.U., Holt P.R., Krivosheyev V., Moss S.F. Human right and left colon differ in epithelial cell apoptosis and in expression of Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 homologue // *Gut.* – 1999. – №45(1). – P.45-50.
112. Longman R.J., Poulosom R., Corfield A.P. et al. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis // *J Histochem Cytochem.* – 2006. – №54(12). – P.1335-1348.
113. Lu Z., Ding L., Lu Q., Chen Y.H. Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases // *Tissue Barriers.* – 2013.– №1(3). – P.e24978.

114. Madsen K.L., Jijon H. IL-10 and IL-2 Knockout Mice. Effect on Intestinal Inflammation // Cytokine Knockouts (Part of the series Contemporary Immunology). – 2003. – pp 237-25.
115. Magnusson M.K., Brynjólfsson S.F., Dige A. et al. Macrophage and dendritic cell subsets in IBD: ALDH+ cells are reduced in colon tissue of patients with ulcerative colitis regardless of inflammation // Mucosal Immunol. – 2016. – №9(1). – P.171-182.
116. Mähler M., Bristol I.J., Leiter E.H. et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis // Am J Physiol. – 1998. – №274(3 Pt 1). – P.G544-551.
117. Manocha M., Khan W.I. Serotonin and GI Disorders: An Update on Clinical and Experimental Studies // Clin Transl Gastroenterol. – 2012. – №3. – P.e13.
118. Masuda H., Iwai S., Tanaka T., Hayakawa S. Expression of IL-8, TNF-alpha and IFN-gamma m-RNA in ulcerative colitis, particularly in patients with inactive phase // J Clin Lab Immunol. – 1995. – №46(3). – P.111-123.
119. Matsuda R., Koide T., Tokoro C. et al. Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naive ulcerative colitis during active and quiescent disease // Inflamm Bowel Dis. – 2009. – №15(3). – P.328-34.
120. Matsuo K., Ota H., Akamatsu T. et al. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon // Gut. – 1997. – №40(6). – P.782-789.
121. McClure R., Massari P. TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens // Front Immunol. – 2014. – №5. – P.386.
122. McCole D.F. IBD candidate genes and intestinal barrier regulation // Inflamm Bowel Dis. 2014. – №20(10). – P.1829-1849.
123. Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2005. – №288(6). – P.G1328-1338.

124. Melgar S., Karlsson L., Rehnström E. et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease // *Int Immunopharmacol.* – 2008. – №8(6). – P.836-844.
125. Mennigen R., Nolte K., Rijcken E. et al. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2009. – №296(5). – P.G1140-1149.
126. Merga Y., Campbell B.J., Rhodes J.M. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy // *Dig Dis.* – 2014. – №32(4). – P.475-483.
127. Moehle C., Ackermann N., Langmann T. et al. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease // *J Mol Med (Berl).* – 2006. – №84(12). – P.1055-1066.
128. Montgomery E.A., Voltaggio L. Biopsy Interpretation of the Gastrointestinal Tract Mucosa Vol.1: Non-neoplastic // Philadelphia, USA: LWW. – 2012. – 268 p.
129. Mora-Buch R., Dotti I., Planell N. et al. Epithelial IL-1R2 acts as a homeostatic regulator during remission of ulcerative colitis // *Mucosal Immunol.* – 2016. – №9(4). – P.950-959.
130. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins // *J Immunol.* –1986. – №136. – P.2348-2357.
131. Moss AC Residual inflammation and ulcerative colitis in remission. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2014 Mar; – №10(3):181-3.
132. Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine // *Immunol Rev.* – 2008. – №226. – P.205-218.
133. Múzes G., Molnár B., Tulassay Z., Sipos F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases // *World J Gastroenterol.* – 2012. – №18(41). – P.5848-5861.
134. Myllärniemi H., Nickels J. Scanning electron microscopy of Crohn's disease and ulcerative colitis of the colon // *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* – 1980. – №385(3). – P.343-350.

135. Naito Y., Takagi T., Uchiyama K. et al. Reduced intestinal inflammation induced by dextran sodium sulfate in interleukin-6-deficient mice // *Int J Mol Med.* – 2004. – №14(2). – P.191-196.
136. Nielsen O.H., Kirman I., Rudiger N. et al. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease // *Scand J Gastroenterol.* – 2003. – №38(2). – P.180-185.
137. Nishitani H., Okabayashi M., Satomi M. et al. Infiltration of peroxidase-producing eosinophils into the lamina propria of patients with ulcerative colitis // *J Gastroenterol.* 1998. – №33(2). – P.189-195.
138. Noah T.K., Donahue B., Shroyer N.F. et al. Intestinal development and differentiation // *Exp Cell Res.* – 2011. – №317(19). – P.2702-2710.
139. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora // *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* – 1985. – №82(5). – P.1327-1336.
140. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M. et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice // *Gastroenterology.* – 1990. – №98(3). – P.694-702.
141. Okubo H., Kushiya A., Sakoda H. et al. Involvement of resistin-like molecule β in the development of methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice // *Sci Rep.* – 2016. – №6. – P.20157.
142. Oshima S., Fujimura M., Fukimiya M. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate // *Histochem Cell Biol.* – 1999. – №112(4). – P.257-263.
143. Oshima T., Miwa H., Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2008. – Suppl 2. – P.S146-150.
144. Ostanin D.V., Bao J., Koboziev I. et al. T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2009. – №296(2). – P.G135-146.
145. Oswald I.P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine // *Vet Res.* – 2006. – №37(3). – P.359-368.

146. Pallesen L.T., Berglund L., Rasmussen L.K., et al. Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin // *Eur J Biochem.* – 2002. – №269(11). – P.2755-2763.
147. Paul W.E. History of interleukin-4 // *Cytokine.* – 2015. – №75(1). – P.3-7.
148. Pearl D.S., Shah K., Brown J. et al. Active ulcerative colitis is associated with downregulation of the TH1, TH2 and TH17 cytokine response and elevated IL-8 levels in mucosal biopsies. Posters Inflammation bowel disease II // *Gut.* – 2011. – №60. – P.A214.
149. Pearl D.S., Shah K., Whittaker M.A. et al. Cytokine mucosal expression in ulcerative colitis, the relationship between cytokine release and disease activity // *J Crohns Colitis.* – 2013. – №7(6). – P.481-489.
150. Pelaseyed T., Bergstrom J.H., Gustafsson J.K. et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system // *Immunol Rev.* – 2014. – №260(1). – P.8-20.
151. Peranzi G., Lehy T. Endocrine cell populations in the colon and rectum of cat, dog, and monkey: fine structure, immunocytochemistry, and distribution // *Anat Rec.* – 1984. – №210(1). – 87-100.
152. Perše M., Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks // *J Biomed Biotechnol.* – 2012. – №2012. – P.718617.
153. Peterson L.W., Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – №14(3). – P.141-153.
154. Petersson J., Schreiber O., Hansson G.C. et al. Importance and regulation of the colonic mucus barrier in a mouse model of colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2011. – №300(2). – P.G327-333.
155. Pullan R.D. Colonic mucus, smoking and ulcerative colitis // *Ann R Coll Surg Engl.* – 1996. – №78(2). – P.85-91.
156. Pullan R.D., Thomas G.A., Rhodes M., et al. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis // *Gut.* – 1994. – №35(3). – P.353-359.

157. Randall K., Henderson N., Reens J. et al. Claudin-2 Expression Levels in Ulcerative Colitis: Development and Validation of an In-Situ Hybridisation Assay for Therapeutic Studies // PLoS One. – 2016. – №11(9). – P.e0162076.
158. Randhawa P.K., Singh K., Singh N., Jaggi A.S. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents // Korean J Physiol Pharmacol. – 2014. – №18(4). – P.279-288.
159. Riley S.A., Mani V., Goodman M.J. et al. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? // Gut. – 1991. – №32(2). – P.174-178.
160. Roda G., Marocchi M., Sartini A., Roda E. Cytokine Networks in Ulcerative Colitis (Review Article) // Ulcers Volume 2011. – 2011.
161. Roda G., Sartini A., Zambon E. et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases // World J Gastroenterol. – 2010. – №16(34). – P.4264-4271.
162. Ross M.H., Pawlina W. Histology: A text and atlas : with correlated cell and molecular biology / Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. – 2006. – 906p.
163. Rybakova M.G., Botina A.V., Solov'eva O.I. [Immunomorphological characteristics of mucosal and endocrine cells of the colon in patients with chronic ulcerative colitis] // Arkh Patol. – 2005. – №67(2). – P.30-33.
164. Sadlack B., Merz H., Schorle H. et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene // Cell. – 1993. – №75(2). – P.253-261.
165. Sakata T., von Engelhardt W. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs // Cell Tissue Res. – 1981. – №219(3). – P.629-635.
166. Sävendahl L., Underwood L.E., Haldeman K.M. et al. Fasting prevents experimental murine colitis produced by dextran sulfate sodium and decreases interleukin-1 beta and insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid // Endocrinology. – 1997. – №138(2). – P.734-740.
167. Sayer B, Lu J., Green C. et al. Dextran sodium sulphate-induced colitis perturbs muscarinic cholinergic control of colonic epithelial ion transport // Br J Pharmacol. – 2002. – №135(7). – P.1794-1800.

168. Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M. et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis // *Gastroenterology*. – 1999. – №116(2). – P.301-309.
169. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions // *J Leukoc Biol*. – 2004. – №75(2). – P.163-189.
170. Senapati S., Ho S.B., Sharma P. et al. Expression of intestinal MUC17 membrane-bound mucin in inflammatory and neoplastic diseases of the colon // *J Clin Pathol*. – 2010. – №63 (8). – P.702-707.
171. Shajib M.S., Wang H., Kim J.J. et al. Interleukin 13 and serotonin: linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation // *PLoS One*. – 2013. – №8(8). – P.e72774.
172. Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump B.F. Human large intestinal epithelium: light microscopy, histochemistry, and ultrastructure // *Hum Pathol*. – 1982. – №13(9). – P.790-803.
173. Sheng Y.H., Lourie R., Linden S.K. et al. The MUC13 cell-surface mucin protects against intestinal inflammation by inhibiting epithelial cell apoptosis // *Gut*. – 2011. – №60(12). – P.1661-1670.
174. Shi X.Z., Winston J.H., Sarna S.K. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2011. – №300(1). – P.G41-51.
175. Shintani N., Nakajima T., Sugiura M. et al. Proliferative effect of dextran sulfate sodium (DSS)-pulsed macrophages on T cells from mice with DSS-induced colitis and inhibition of effect by IgG // *Scand.J.Immunol*. – 1997. – №46. – P.581-586.
176. Shokrani M. Inflammatory bowel disease: diagnosis and research trends: the clinical lab is playing an increasingly important role // *MLO Med Lab Obs*. – 2012. – №44(8). – P.8-12.
177. Sjölund K., Sandén G., Håkanson R., Sundler F. Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study // *Gastroenterology*. – 1983. – №85. – P.1120–1130.

178. Sommers S.C., Korelitz B.I. Mucosal-cell counts in ulcerative and granulomatous colitis // *Am J Clin Pathol.* – 1975. – №63(3). – P.359-365.
179. Stagg A.J., Hart A.L., Knight S.C., Kamm M.A. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria // *Gut.* – 2003. – №52(10). – P.1522-1529.
180. Stevceva L., Pavli P., Husband A. et al. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice // *Genes Immun.* – 2001. – №2(6). – P.309-316. (b)
181. Stevceva L., Pavli P., Husband A.J., Doe W.F. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it // *BMC Clin Pathol.* – 2001. – №1(1). – P.3. (a)
182. Strober W. Fuss I.J. Pro-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of IBD // *Gastroenterology.* – 2011. – №140(6). – P.1756–1767.
183. Sun L., He C., Nair L. et al. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease // *Cytokine.* – 2015. – №75(2). –P.249-255.
184. Sund M., Xu L.L., Rahman A. et al. Reduced susceptibility to dextran sulphate sodium-induced colitis in the interleukin-2 heterozygous (IL-2) mouse // *Immunology.* – 2005. – №114(4). – P.554-564.
185. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V. et al. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease // *J Clin Microbiol.* – 2005. – №43(7). – P.3380-3389.
186. Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression // *Front Immunol.* – 2014. – №5. – P.508.
187. Thompson A.I., Lees C.W. Genetics of ulcerative colitis // *Inflamm Bowel Dis.* – 2011. – №17(3). – P. 831-848.
188. Tobisawa Y., Imai Y., Fukuda M., Kawashima H. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice // *J Biol Chem.* – 2010. – №285(9). – P.6750-6760.

189. Treuting P.M., Dintzis S.M., Frevert C.W. et al. Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas / Amsterdam: Elsevier/Academic Press. Xii. – 2012. – 461 p.
190. Tsai H.H., Dwarakanath A.D., Hart C.A. et al. Increased faecal mucin sulphatase activity in ulcerative colitis: a potential target for treatment // Gut. – 1995. – №36(4). – P.570-576.
191. Tytgat K.M., van der Wal J.W., Einerhand A.W. et al. Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis // Biochem Biophys Res Commun. – 1996. – №224(2). – P.397-405.
192. van der Post S., Hansson G.C. Membrane protein profiling of human colon reveals distinct regional differences // Mol Cell Proteomics. – 2014. – №13(9). – P.2277-2287.
193. Van der Sluis M., De Koning B.A., De Bruijn A.C. et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection // Gastroenterology. – 2006. – №131(1). – P.117-129.
194. Van Klinken B.J., Van der Wal J.W., Einerhand A.W. et al. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis // Gut. – 1999. – №44(3). – P.387-393.
195. Verma R., Verma N., Paul J. Expression of inflammatory genes in the colon of ulcerative colitis patients varies with activity both at the mRNA and protein level // Eur Cytokine Netw. – 2013. – №24(3). – P.130-138.
196. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins // Pharmaceuticals (Basel). – 2014. – №7(5). – P.545-594.
197. Wang X., Wu T., Zhou F. et al. IL12p40 regulates functional development of human CD4+ T cells: enlightenment by the elevated expressions of IL12p40 in patients with inflammatory bowel diseases // Medicine (Baltimore). – 2015. – №94(10). – P.e613.
198. Wang Y., Devkota S., Musch M.W. et al. Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon // PLoS One. – 2010. – №5(10). – P.e13607.

199. Weiss A.A., Babyatsky M.W., Ogata S. et al. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues // *J Histochem Cytochem.* – 1996. – №44(10). – P.1161-1166.
200. Wéra O., Lancellotti P., Oury C. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases // *J Clin Med.* – 2016. – №5(12). – pii: E118.
201. Wrzesinski S.H., Wan Y.Y., Flavell R.A. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy // *Clin Cancer Res.* – 2007. – №13(18 Pt 1). – P.5262-5270.
202. Wulff S. Guide to special stains / Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA, 2004. – 95p.
203. Yadav P.K., Chen C., Liu Z. Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // *J Biomed Biotechnol.* – 2011. – №2011. – P.348530.
204. Yamamoto-Furusho J., Ascaño-Gutiérrez I., Furuzawa-Carballeda J., Fonseca-Camarillo G. Mucin 16 (MUC16) and mucin 20 (MUC20) over-expression in colonic mucosa is associated with histological remission in patients with ulcerative colitis // *J Crohns Colitis.* First published online. – 2014. – №8(Issue Supplement 1). – P.S139.
205. Yuan B., Zhou S., Lu Y. et al. Changes in the Expression and Distribution of Claudins, Increased Epithelial Apoptosis, and a Mannan-Binding Lectin-Associated Immune Response Lead to Barrier Dysfunction in Dextran Sodium Sulfate-Induced Rat Colitis // *Gut Liver.* – 2015. – №9(6). – P.734-740.
206. Yue W., Liu Y., Xu W. et al. The expressions of IL-2,IL-4,IL-17 and IL-10 in ulcerative colitis (UC) mucosa and its relation with disease activity // *Fudan Univ J Mad Sci.* – 2012. – №39(05). – P.454-459.
207. Zhang C., Liu L.W., Sun W.J. et al. Expressions of E-cadherin, p120ctn, β -catenin and NF- κ B in ulcerative colitis // *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* – 2015. – №35(3). –P.368-373.