Золотова Наталья Александровна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на биологическом факультете Московского государственного университета им.М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор **Макарова Ольга Васильевна**

Официальные оппоненты:

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией электронной Централизованного микроскопии иммуногистохимии И патологоанатомического отделения Клинического центра Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего государственный образования Первый Московский медицинский Министерства vниверситет имени И.М. Сеченова здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

Тертычный Александр Семенович

кандидат медицинских наук, заведующий межкафедральной лабораторией цифровой микроскопии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Есев Леонид Иванович

Михайлова Лилия Петровна

Ведущая	органи	зация:	Федер	альное	госуд	царственн	ioe	бюдж	кетное
образовател	ьное	учрежден	ние	высшего	об	разовани	Я	«Куба	нский
государстве	нный м	едицински	ий унив	ерситет»	Мини	стерства	здрав	ooxpa	нения
Российской	Федерац	ции (35006	53, г. Кр	аснодар,	ул. Сед	дина, 4)			
Защита дисо диссертацио бюджетного морфологии	онного о научн	совета (Д юго учре	Ц 001.0 еждения	004.01) ı «Науч	Федера но-исс.	льного педовател	госуда пьский	арстве	енного
С диссерт государстве исследовате http://www.r	нного ельский	бюджет институ	ТНОГО	научно	ГО	учрежде	ния	«На	аучно-
Авторефера	т разосла	ан «»		2017 г.					

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Известно, что в толстой кишке по сравнению с другими органами содержится максимальное количество микроорганизмов и пищевых антигенов (Кіт Y.S., Но 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 на клиническом материале затруднены из-за 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 выполнимой экспериментальных моделей. Наиболее легко высоко воспроизводимой моделью, адекватной ЯК человека, является 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).

Степень разработанности темы исследования

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 изменениях ультраструктурных эпителиального сведения 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 индуцированном 1% раствором ДСН у самцов мышей С57ВL/6, изменения секреторных эпителиальных клеток и выраженность язвенно-воспалительного имеют региональные особенности. При остром цитофизиологические изменения бокаловидных клеток наиболее выражены в дистальном отделе, что коррелирует с наибольшей выраженностью язвенновоспалительного 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 обусловливает 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.
- хроническом колите ПО сравнению острым c эпителиального барьера менее выражены и характеризуются повышением экспрессии основного компонента слизи муцина *Muc2* и уменьшением его экспрессии сульфатирования; изменением муцинов гликокаликса повышением Muc13, Muc1 снижением 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.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 217 страницах машинописного текста и состоит из глав введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, а также списка литературы, включающего 207 российских и зарубежных источников. Работа иллюстрирована 45 таблицами и 30 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 100 половозрелых самцах мышей линии C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая». Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол № 8в от 22.11.2012 г.)

Мышей содержали в открытой системе при температуре 18-25°С при естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССКИ.nO81.B00113, ГОСТ P50258-92).

Колит индуцировали заменой питьевой воды на 5 суток 1%-ым водным раствором ДСН (Dextran sulfate sodium salt, Mr ~40,000, AppliChem, Германия). Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом на 7-е (острый колит; n=43) и 28-е (хронический колит; n=32) сутки. Мыши контрольной группы (n=25) на протяжении всего эксперимента получали питьевую воду.

Оценка клинических проявлений колита и массометрия. Перед индукцией колита и при выведении из эксперимента животных взвешивали. В процессе клинического наблюдения у мышей оценивали характер стула,

двигательную активность и состояние шерстного покрова. При вскрытии измеряли длину ободочной кишки от илеоцекального угла до прямой кишки.

Гистологические методы. Для гистологического исследования ободочную кишку разделяли на проксимальный, медиальный, дистальный отделы, фиксировали в жидкости Буэна, заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5-8 мкм. Полученные препараты использовали для гистохимического и иммуногистохимического исследования и окрашивали гематоксилином и эозином.

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

Иммуногистохимические методы. Энтероэндокринные клетки (ЭЭК) выявляли с помощью антител к хромогранину А (Rabbit polyclonal anti-ChromograninA antibody, ab15160, Abcam, Великобритания), в разведении 1:400. В качестве вторых антител использовали коммерческий раствор синтетического полимера, сцепленного с пероксидазой хрена — Simple Stain Mouse MAX PO (R) (N-Histofine Universal Immuno-peroxidase polimer for mouse tissue Anti-Rabbit Redy-to-use, Nichirei Bioscience Inc., Япония). Связывание антител выявляли с помощью набора N-Histofine DAB-2V (Nichirei Bioscience Inc., Япония).

Морфометрические методы. Для оценки выраженности язвенновоспалительного процесса, окрашенные гематоксилином И **ЭОЗИНОМ** препараты трех ободочной гистологические отделов кишки экспериментальных групп снимали на протяжении всей длины на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) с объективом x10. В программе ImageScope (Leica Microsystems, Германия) полученные фотографии объединяли оценивали распространенность панорамы И воспалительного инфильтрата в базальной части собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО). Для оценки изменений клеточного состава инфильтрата на 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.

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 слизистой оболочки (CO) 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). На срезах, окрашенных альциановым синим, измеряли площадь бокаловидных

клеток и подсчитывали их число на крипту. На бинаризованных изображениях ШИК-позитивных объемную долю клеток. высокосульфатированных и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках определяли, соответственно, по интенсивности окрашивания альциановым синим и ШИК-реакции. Интенсивность окрашивания рассчитывали как средний десятичный логарифм отношения яркости фона и точки объекта. 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 бокаловидных окрашивания клеток нормировали ПО интенсивности окрашивания расположенных рядом участков соединительной ткани.

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. Фрагмент медиального отдела ободочной кишки помещали в 1 мл PBS при температуре 4°С, гомогенизировали (гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Нидерланды) 10 мин при 40 Гц, центрифугировали (центрифуга-вортекс СМ-70М, ELMI, Латвия) 15 мин при 9000 об/мин. Проводили определение концентрации интерлейкинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 и интерферона-γ (IFNγ) в гомогенате ободочной кишки методом иммуноферментного анализа с помощью наборов фирмы eBioscience (США). Концентрацию цитокинов нормировали на общее содержание белка в каждой пробе, определяемое УФ-методом с помощью спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Из фрагмента медиального отдела ободочной кишки выделяли мРНК тризольным методом (Trizol RNA Prep 100 Isogene Lab.ltd, Россия). Для разрушения геномной ДНК использовали набор «DNase I, Amplification Grade» (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США). Проводили обратную транскрипцию с помощью набора «Реверта-L» (ИнтерЛабСервис, Россия). Методом ПЦР в режиме реального времени (Real-Time амплификатор qTOWER 2.2 Analytik Jena, Германия) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) определяли уровень экспрессии мРНК цитокинов IL1β, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12р40, IL17, IFNγ, TGFβ, муцинов 1, 2, 3, 13, белков плотных контактов клаудинов 2 и 4 относительно уровня экспрессии мРНК β-актина (праймеры синтезированы фирмой Синтол, Россия).

Метод электронной микроскопии. У трех животных из каждой группы забирали два фрагмента ободочной кишки на границе дистального и фрагмент фиксировали медиального отделов. Один 2,5% глутаровым альдегидом с постфиксацией 1% OsO4 для изучения ультраструктуры клеток; использовали ДЛЯ выявления гликокаликса модифицированного контрастирования рутениевым красным по Монису и Замбрано (Гайер Г., 1974). Фиксированные образцы дегидратировали и заливали в смесь смол эпон-аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме 8800 Ultrotome III (LKB, Швеция), контрастировали в растворе Рейнольдса, исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа TEM Libra120 (Carl Zeiss, Германия).

Статистические Статистическую обработку методы. 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). Так как в экспериментальных группах было небольшое число животных (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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

проявления и морфологическая характеристика экспериментального острого и хронического колита. У самцов мышей С57ВL/6, потреблявших 1% ДСН в течение 5-и сут., с 3-их по 7-ые сут. эксперимента развивалась диарея с примесью крови. На 5-7-ые сут. у мышей отмечалось снижение двигательной активности, 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 (6 из 20). На 28-ые сут. показатели массы тела, длины ободочной кишки, характер стула и состояние шерстного покрова нормализовались. При морфологическом исследовании стенки ободочной кишки на 7-ые сут. эксперимента выявлялись обширные острые язвы, выраженная воспалительная инфильтрация СПСО и ПО преимущественно из нейтрофилов и лимфоцитов, единичные крипт-абсцессы (рис. 1 Б). На 28-ые сут. наблюдалась деформация расширение их просветов и заполнение слизью, бокаловидных клеток, небольшое число эпителизирующихся язв, выраженная воспалительная инфильтрация преимущественно базального отдела СПСО лимфоцитами, плазмоцитами и единичными нейтрофилами, очаговый фиброз всех оболочек ободочной кишки (рис.1 В). Выявленные на 7-ые и 28-ые сут. проявления и морфологические эксперимента клинические ободочной кишки соответствуют описанным в литературе при остром (Hans W. et al., 2000; Hall L.J. et al., 2011; Kim J.J. et al., 2012) и хроническом (Hans W. et al., 2000; Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E., 2005; Perše M., Cerar A., 2012) ДСН-колите у мышей.

У человека при обострении ЯК наблюдаются диарея, кишечные кровотечения, снижение массы тела, на микроскопическом уровне – выраженная воспалительная инфильтрация СО толстой кишки лимфоцитами,

плазмоцитами и нейтрофилами, эрозии, язвы, криптиты и крипт-абсцессы (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012; Ткачев А.В. и др., 2012). Признаками хронизации считаются нарушение гистоархитектоники крипт, выраженная инфильтрация базального отдела СПСО лимфоцитами и плазмоцитами, утолщение ПО за счет разрастания в ней жировой ткани и фиброза, появление клеток Панета в левом отделе толстой кишки (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012; DeRoche T.C., Xiao S.Y., Liu X., 2014). В период ремиссии ЯК выраженность морфологических изменений не соответствует тяжести клинических проявлений заболевания: при исследовании биоптатов СО прямой кишки пациентов с клинической и эндоскопической ремиссией ЯК во всех образцах выявлен воспалительный инфильтрат из лимфоцитов и плазмоцитов, в 58% – нарушение архитектоники крипт, в 32% – признаки острого воспаления (Riley S.A. et al., 1991). Таким образом, воспроизведенный в нашей работе острый ДСН-колит по клиническим проявлениям и морфологическим изменениям в целом соответствует обострению ЯК у человека, а хронический ДСН-колит – клинической ремиссии или легкому течению ЯК.

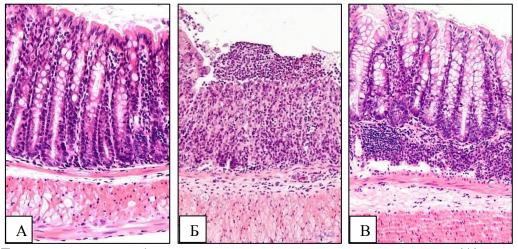


Рис.1. Дистальный отдел ободочной кишки мышей контрольной группы (A) и с острым (Б) и хроническим (В) колитом. А – эпителиальная выстилка сохранена, в СО небольшое число равномерно распределенных клеточных элементов, ув.160. Б – острая язва, на ее поверхности скопление лейкоцитов, выраженная воспалительная инфильтрация СО, ув.100. В – крипты деформированы, их просветы расширены, заполнены слизью, выраженная воспалительная инфильтрация базального отдела СПСО, ув.160.

Морфометрическое исследование выраженности язвенного воспалительного процессов в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки. При остром колите распространенность язв и воспалительного процесса в СПСО и ПО в дистальном отделе была статистически значимо выше, чем в проксимальном. В дистальном отделе ДЛИНЫ среза ободочной кишки около половины воспалительный инфильтрат в СПСО и ПО распространялся, соответственно, примерно на 80 и 40% длины СО. При хроническом колите по сравнению с острым, распространенность язвенного процесса в дистальном

снижалась, а воспалительного — не изменялась и оставалась максимальной в дистальном отделе (рис.2).

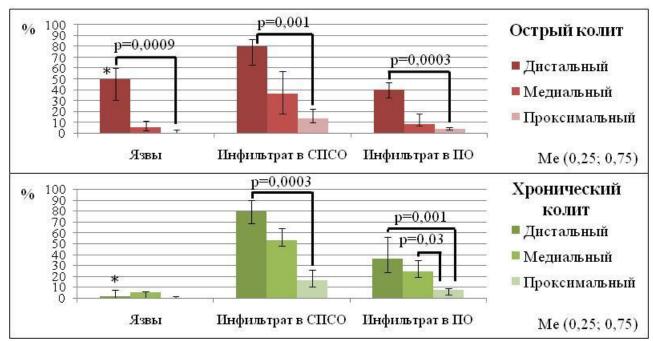


Рис.2. Распространенность язвенного и воспалительного процесса в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) и подслизистой основе (ПО) при остром и хроническом колите в разных отделах ободочной кишки, р — достигнутая значимость различий, * — статистически значимые различия между распространенностью язв в дистальном отделе ободочной кишки при остром и хроническом колите

По данным литературы, 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 язвенновоспалительного процесса преимущественно в дистальном отделе толстой кишки.

Морфометрическое исследование состава воспалительного инфильтрата в дистальном отделе ободочной кишки при остром и хроническом колите. При остром колите как в СПСО, так и ПО статистически значимо возрастали показатели числа нейтрофилов и лимфоцитов. Число плазмоцитов не отличалось от контрольных значений. При хроническом колите по сравнению с контролем было выше число плазмоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в СПСО и ПО. По сравнению с острым колитом, в СПСО и ПО возрастало количество плазмоцитов и снижалось - нейтрофилов, в ПО также статистически значимо уменьшался показатель числа лимфоцитов (рис.3). По данным L.J. Hall et al. (2011) при остром ДСН-колите в дистальном отделе ободочной кишки возрастает число нейтрофилов, дендритных макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, при хроническом по сравнению с нормой увеличено содержание нейтрофилов, дендритных клеток, макрофагов, Т- и Влимфоцитов. S. Melgar, A. Karlsson, E. Michaelsson (2005) на качественном уровне отмечают при хроническом ДСН-колите преобладание макрофагов, лимфоцитов и плазмоцитов в воспалительном инфильтрате ободочной кишки. Для ЯК у человека характерна лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация слизистой оболочки (Капуллер Л.Л., 2008; Маркова А.А., Кашкина Е.И., 2012; DeRoche T.C., Xiao S.Y., Liu X., 2014), а преобладание в инфильтрате полиморфноядерных лейкоцитов является одним из признаков обострения заболевания (Василенко И.В., 2010).

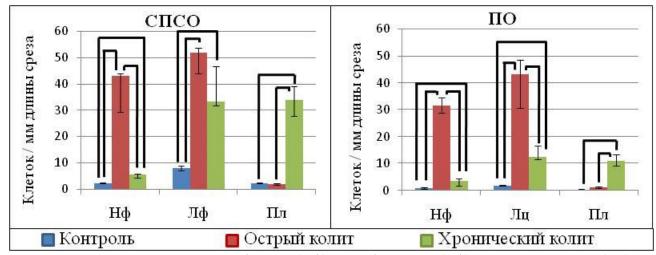


Рис.3. Изменение числа нейтрофилов (Нф), лимфоцитов (Лф) и плазмоцитов (Пл) в собственной пластинке слизистой оболочки (СПСО) и подслизистой основе (ПО) в дистальном отделе ободочной кишки при остром и хроническом колите Ме (0,25; 0,75), скобками соединены группы, между которыми достигнутая значимость различий p<0,017

Изменения продукции цитокинов в стенке медиального отдела ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром и хроническом колите. При остром колите концентрация цитокинов IL-2, IL-4, IL-6, IL-17 и IFN в гомогенате медиального отдела ободочной кишки была статистически значимо ниже, чем у животных контрольной группы, а при хроническом колите соответствовала контрольным значениям. Так как изменения концентрации как про-, так и противовоспалительных цитокинов, имели одинаковую динамику, логично предположить, что иммуноферментный анализ не отражает истинного уровня продукции цитокинов, а снижение их концентрации при остром колите 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. Поэтому продукцию цитокинов мы также оценивали по экспрессии их генов (рис.4).

При остром колите повышался уровень мРНК цитокинов острой фазы воспаления IL-1 β , IL-6, что согласуется с литературными данными по острому ДСН-колиту (Melgar S., Karlsson A, Michaëlsson E., 2005; Erickson N.A. et al., 2016; Ahmad R. et al., 2014) и обострению ЯК у человека (Roda G. et al., 2011; Конович Е.А. и др., 2016; Mora-Buch R. et al., 2016). Также при остром колите мы выявили повышение экспрессии гена противовоспалительного цитокина ТСБР, что указывает на активацию репаративных процессов. По данным G. Roda et al. (2011), уровень ТСБР в толстой кишке при ЯК выше, а по данным D.S. Pearl et al. (2013) — ниже, чем у здоровых лиц. Данные по экспрессии ТСБР при ДСН-колите в литературе отсутствуют.

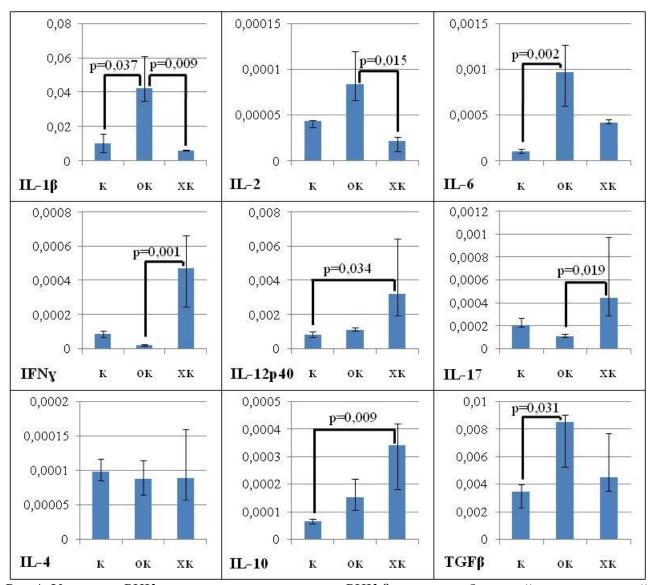


Рис.4. Уровень мРНК цитокинов относительно мРНК β -актина в ободочной кишке у мышей контрольной группы (K) и с острым (OK) и хроническим (XK) колитом, Ме (0,25;0,75), р – достигнутая значимость различий

При хроническом колите по сравнению с контрольной группой была экспрессия мРНК IL-10 IL-12. IL-10 является повышена иммуносупрессорным цитокином, но он также стимулирует активацию Вклеток и их дифференцировку в плазмоциты, пролиферацию цитотоксических лимфоцитов (Mosser D.M., Zhang X., 2008; Ярилин А.А., 2010). При ЯК у человека продукция IL-10 в толстой кишке повышается, причем при легком течении заболевания его уровень выше (Matsuda R. et al., 2009; Roda G. et al., 2011; Yue W. et al., 2012). Данные о продукции IL-10 в ободочной кишке при ДСН-колите отсутствуют. Выявленное хроническом нами повышение экспрессии IL-10 указывает на активацию механизмов иммуносупрессии и, вероятно, является одной из причин увеличение количества плазмоцитов в составе инфильтрата CO. Белок IL-12p40 входит состав двух провоспалительных цитокинов IL-12 и IL-23, а также может образовывать гомодимеры, ингибирующие эффекты IL-12 и IL-23 (Abdi K., Singh N.J., 2015; Sun L. et al., 2015). По данным О.Н. Nielsen et al. (2003), экспрессия мРНК IL- 12р40 повышена при обострении ЯК, а в период ремиссии она соответствует контрольным значениям. При хроническом ДСН-колите в ободочной кишке у мышей показано повышение продукции IL-12р40 (Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E., 2005), что согласуется с полученными нами данными. Учитывая, что IL-12р40 может оказывать как про-, так и противовоспалительное действие, полученные данные трактовать сложно.

При хроническом колите по сравнению с острым снижался уровень мРНК IL-1β и IL-2 и повышался IFNу и IL-17. Сопоставление продукции цитокинов в ободочной кишке при остром и хроническом ДСН-колите представлено только в одной работе: Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. (2005) показали, что возрастает, IL-1B. IL-17 И IFNy содержание исследовалось. Выявленное нами снижение уровня мРНК IL-1β указывает на завершение острой воспалительной реакции. Снижение IL-2, вызывающего клональную экспансию всех типов Т-клеток (Bachmann M.F., Oxenius A., 2007; Ярилин А.А., 2010) отражает окончание формирования адаптивного иммунного ответа. IL-17 способствует гранулопоэзу и привлечению нейтрофилов в зону поражения, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов (Ярилин A.A., 2010; Beringer A., Noack M., Miossec P., 2016). IFNy индуцирует дифференцировку Th1-клеток, стимулирует антибактериальную активность макрофагов, повышает экспрессию МНСІ и МНСІІ (Schroder K. et al., 2004; Ярилин А.А., 2010). Повышение уровня мРНК IL-17 и IFNy указывает на активный воспалительный процесс в ободочной кишке при хроническом колите.

Изменения эпителиального барьера ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при остром и хроническом колите

исследование поверхности **Ультраструктурное** выстилки ободочной кишки у мышей контрольной группы и при остром и хроническом колите. При остром колите по сравнению с контрольной группой 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. Увеличение числа бактерий в непосредственной близости от поверхности эпителиальных клеток указывает на нарушение барьерной функции слоя слизи. По данным M.E. Johansson et al. (2010) 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, а воспалительная инфильтрация СО развивается через 120 часов. У человека при ЯК слой слизи значительно истончается, на изъязвленных участках он отсутствует (Pullan R.D., 1996), а число бактерий в непосредственной близости от эпителиальных клеток возрастает (Swidsinski A. et al, 2005). При обострении ЯК наблюдается повреждение опустошение эпителиальных клеток: бокаловидных клеток, снижение числа или исчезновение микроворсинок, разрушение плотных контактов, вакуолизация и лизис цитоплазмы, пикнотические ядра, повреждения ЭПР, митохондрий, комплекса Гольджи (Fratila O. et al., 2008). Данные по ультраструктурным изменениям эпителиальных клеток при остром ДСН-колите отсутствуют. Относительно небольшое повреждение эпителиальных клеток объясняется тем, что для ультраструктурного исследования были выбраны сохранные участки СО на границе медиального и дистального отделов ободочной кишки, где язвенновоспалительный процесс менее выражен, чем в дистальном отделе.

При хроническом колите длина и структура микроворсинок и толщина гликокаликса нормализуются, снижается число бактерий в непосредственной близости от эпителиальных клеток. По сравнению с контрольной группой и мышами с острым колитом, увеличивается число муциновых вакуолей в бескаемчатых колоноцитах. Литературные данные по ультраструктурным клеток ободочной кишки эпителиальных изменениям хроническом ДСН-колите отсутствуют. При ремиссии ЯК у человека толщина эпителиальной выстилки меньше, чем В норме, микроворсинки деформированы, увеличены межклеточные пространства встречаются поврежденные органеллы (Fratila O. et al., 2008).

Морфологическое и морфометрическое исследование секреторных клеток в дистальном, медиальном и проксимальном отделах ободочной кишки у мышей контрольной группы и при остром и хроническом колите (рис.5, 6). У мышей контрольной группы число выявляемых бокаловидных клеток на крипту возрастало от проксимального к дистальному отделу, а показатель их объемной доли между отделами не различался. У человека число бокаловидных клеток также повышается от проксимального к дистальному отделу толстой кишки (Montgomery E.A., Voltaggio L., 2012). Средняя площадь бокаловидных клеток на срезах в медиальном отделе была выше, чем в проксимальном и дистальном. В литературе данные о размерах этих клеток в разных отделах ободочной кишки отсутствуют. Интенсивность окрашивания как высокосульфатированных, так и нейтральных муцинов, в дистальном отделе ободочной кишки была выше, чем в медиальном, но их соотношение между отделами не различалось. У человека и грызунов, согласно ряду статей, от слепой кишки к дистальному отделу толстой кишки содержание в эпителии нейтральных муцинов уменьшается, a высокосульфатированных увеличивается (Sakata T. и von Engelhardt W. 1981; Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump B.F., 1982; Iacopetta В., 2002). Соотношение высокосульфатированных и нейтральных муцинов косвенно характеризует сульфатированные слизи: муцины более устойчивы разрушению бактериальными ферментами (Deplancke B., Gaskins H.R., 2001). Вероятно, отсутствие различий соотношения сульфатированных и нейтральных муцинов в разных отделах ободочной кишки у мышей C57BL/6 является одним из факторов хронизации ДСН-колита (Mähler M. et al., 1998; Melgar S., Karlsson A., Michaëlsson E., 2005).

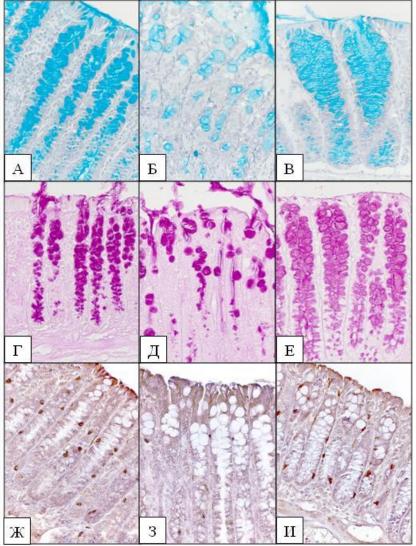


Рис.5. Дистальный отдел ободочной кишки мышей контрольной группы (A, Γ, \mathbb{K}) и с острым $(B, \mathbb{Z}, 3)$ и хроническим (B, E, \mathbb{U}) колитом, ув.320. A-B — окраска альциановым синим рН 1.0 (высокосульфатированные муцины), Γ -E — ШИК-реакция (нейтральные муцины), \mathbb{K} -3 — иммуногистохимическая реакция с антителами к хромогранину A (энтероэндокринные клетки)

Число выявляемых ЭЭК на крипту возрастало от проксимального к дистальному отделу. Литературные данные о распределении ЭЭК по длине толстой кишки фрагментарны и противоречивы. Так, по данным С.В. Костюкевича (2004) и G. Peranzi, Т. Lehy (1984), в эпителиальной выстилке толстой кишки у человека и млекопитающих 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 (Cristina M.L. et al., 1978; Shamsuddin A.M., Phelps P.C., Trump B.F., 1982; Sjölund K et al., 1983; El-Salhy М. et al., 1997). Противоречивость данных, вероятно, связана с разными методиками выявления ЭЭК, оценки их количества, а также меж- и внутривидовыми различиями.

При остром колите число выявляемых бокаловидных клеток снижалось на всем протяжении ободочной кишки, но их объемная доля – только в дистальном отделе. Снижение числа бокаловидных клеток, заполненных муцином, характерно для ЯК у человека, оно коррелирует с тяжестью ЯК (Кіт Y.S., Ho S.B., 2010; Парфенов А.И., 2012,). У мышей при остром ДСН-колите также показано снижение числа бокаловидных клеток (Melgar S., Karlsson A. и Michaëlsson E. 2005; Issa C.M. et al., 2014), что согласуется с нашими данными. Снижение числа выявляемых бокаловидных клеток может быть обусловлено гиперсекрецией, направленной на восстановление муцинового барьера, их гибелью и изменением путей дифференцировки прогениторных клеток. У крыс Sprague-Dawley при остром ДСН-колите показано уменьшение числа заполненных и увеличение числа опустошенных бокаловидных клеток в ободочной кишке (Dharmani P, Leung P, Chadee K., 2011). Во всех отделах увеличивались размеры бокаловидных клеток что, вероятно, компенсаторным процессом. Литературные данные по изменению размеров бокаловидных клеток при колите отсутствуют. На всем протяжении ободочной кишки в бокаловидных клетках снижалась интенсивность окрашивания высокосульфатированных муцинов, повышалась В дистальном отделе интенсивность окрашивания нейтральных муцинов И снижалась При активном ЯК показано сульфатированных муцинов. значительное снижение содержания сульфомуцинов в бокаловидных клетках (Van Klinken В.Ј. et al., 1999), что согласуется с нашими результатами. Литературные данные сульфатирования муцинов у мышей при ДСН-колите изменению отсутствуют.

В медиальном отделе снижалось число выявляемых ЭЭК на крипту, что может быть связано с их гибелью, гиперсекрецией или изменением путей дифференцировки предшественников. Учитывая, что мы подсчитывали количество выявляемых ЭЭК в сохранных криптах, вероятно, снижение их числа обусловлено преимущественно 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 В.М., 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. Введение серотонина мышам на фоне потребления ДСН усугубляет течение острого ДСН-колита (Chen M. et al., 2016). Следовательно, 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. В ободочной кишке у мышей при остром колите показано усиление секреции серотонина, увеличение числа ЕС-клеток и хромогранин А-позитивных клеток (Bertrand P.P. et al. 2010; Hernández-Trejo J.A. et al. 2016). Противоречивость данных литературы и полученных нами, вероятно, связана с использованием меньших концентрации ДСН и сроков индукции колита, при которых развивается гиперсекреция, но не гиперплазия ЭЭК.

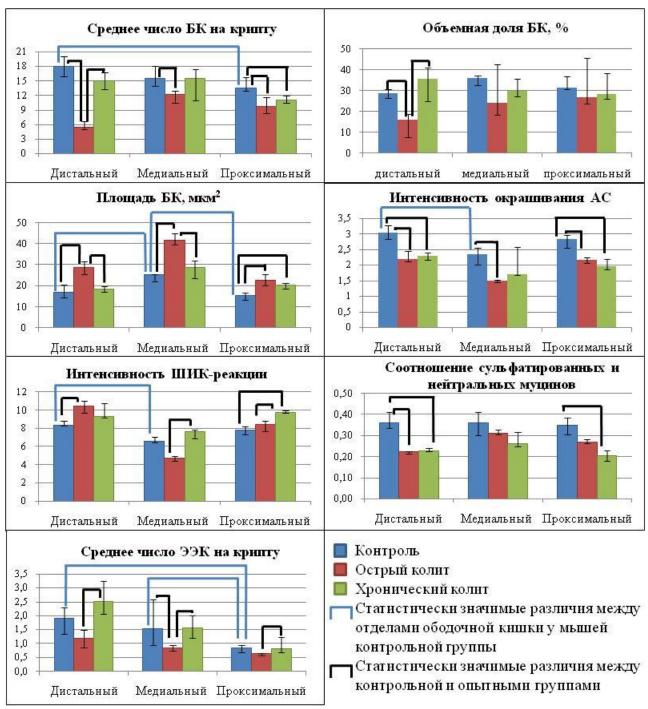


Рис. 6. Цитофизиологические изменения бокаловидных (БК) и энтероэндокринных (ЭЭК) клеток в разных отделах ободочной кишки при остром и хроническом колите

При хроническом колите по сравнению с острым в дистальном отделе ободочной кишки возрастали число и объемная доля выявляемых бокаловидных клеток, возвращаясь к контрольным значениям. В проксимальном отделе число выявляемых бокаловидных клеток оставалось

сниженным. У человека в период ремиссии ЯК в дистальном отделе толстой кишки число бокаловидных клеток увеличивается (Sommers S.C., Korelitz B.I., 1975). Литературные данные по изменению количества бокаловидных клеток при хроническом ДСН-колите отсутствуют. Размеры бокаловидных клеток снижались в дистальном и медиальном отделах, возвращаясь к контрольным значениям, а в проксимальном отделе оставались увеличенными. Литературные данные по изменению размеров бокаловидных клеток при хроническом колите отсутствуют. Интенсивность окрашивания высокосульфатированных муцинов оставалась сниженной в дистальном и проксимальном отделах ободочной кишки, интенсивность окрашивания нейтральных муцинов возрастала в медиальном и проксимальном отделах, причем в проксимальном была выше значений. По сравнению контрольных cнормой, соотношение сульфатированных и нейтральных муцинов было снижено в дистальном и проксимальном отделах. В период ремиссии ЯК у человека содержание сульфомуцинов в бокаловидных клетках возвращается к контрольным значениям (Van Klinken B.J. et al., 1999). По изменению сульфатирования отсутствуют. хроническом ДСН-колите данные выявляемых ЭЭК на всем протяжении ободочной кишки повышалось по сравнению с острым колитом, но не отличалось от контрольных значений. 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). Литературные данные по изменению числа ЭЭК при хроническом ДСН-колите отсутствуют.

Исследование экспрессии мРНК секреторного муцина Мис2 трансмембранных муцинов Мис1, Мис3 и Мис13 в медиальном отделе ободочной кишки при остром и хроническом колите. По нашим данным, экспрессия мРНК муцина Muc2 – основного структурного компонента кишечной слизи, при остром колите не изменялась, а при хроническом – возрастала по сравнению с нормой (рис.7). При ЯК у человека показано снижение уровня синтеза и секреции МUС2, 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). По данным С. Hoebler Et al. (2006) у мышей уровень мРНК *Muc2* в проксимальном отделе ободочной кишки при остром ДСН-колите снижался, при хроническом – повышался, возвращаясь к контрольным значениям, а в дистальном отделе – не изменялся. Несоответствие литературных данных и полученных объясняется использованием разных линий животных и методик индукции колита. Наблюдаемое нами при хроническом колите повышение экспрессии мРНК Muc2 в медиальном отделе ободочной кишки у самцов мышей C57BL/6 при хроническом колите, вероятно, является компенсаторным процессом, направленным на восстановление непроницаемого для бактерий слоя слизи.

Экспрессия гена муцина *Muc1* при остром колите не изменялась, но возрастала при хроническом колите (рис.7). По данным литературы, избыточная экспрессия, аномальная внутриклеточная локализация и изменение

гликозилирования этого муцина ассоциированы с канцерогенезом. 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). У больных ЯК продукция МUС1 в толстой кишке возрастает (Longman R.J. et al., 2006). У мышей при остром ДСН-колите экспрессия Muc1 в ободочной кишке возрастает, а при хроническом возвращается к контрольным значениям (Hoebler C. et al., 2006).

Мы выявили снижение уровня мРНК *Мис3* при остром колите и его нормализацию при хроническом колите (рис.7). Гомологом мышиного гена *Мис3* у человека является *МUС17*, кодирующий один из основных структурных компонентов гликокаликса эпителиальных клеток толстой кишки (Pelaseyed T. et al., 2014). Данных об экспрессии *МИС17* при ЯК крайне мало, и они противоречивы даже в рамках одного исследования (Moehle C. et al. 2006, Senapati S. et al. 2010). Согласно данным С. Hoebler et al. (2006), у мышей при остром ДСН-колите экспрессия мРНК *Мис3* возрастает в дистальном отделе ободочной кишки, а при хроническом не отличается от контрольных значений. У крыс при остром ДСН-колите выявлено значительно снижение экспрессии *Мис3* (Dharmani P., Leung P., Chadee K., 2011). Снижение экспрессии мРНК при остром колите согласуется с наблюдаемым нами при ультраструктурном исследовании уменьшением толщины гликокаликса.

Уровень мРНК Muc13 снижался при хроническом колите по сравнению с нормой (рис.7). Данные об экспрессии MUC13 в толстой кишке у человека при ЯК 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 и хроническом 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 Y.H. et al., 2011).

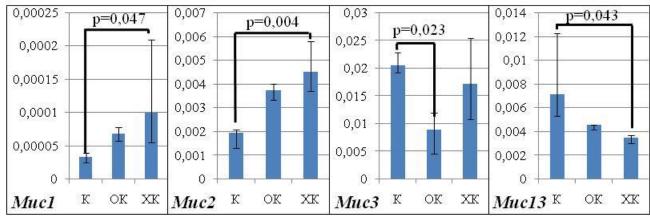


Рис.7. Уровень мРНК секреторного муцина Muc2 и трансмембранных муцинов Muc1, Muc3, Muc13 относительно мРНК β -актина в ободочной кишке мышей контрольной группы (K) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом, Ме (0,25; 0,75), р — достигнутая значимость различий

Изменение уровня мРНК белков плотных контактов клаудинов CLDN2 и CLDN4 в медиальном отделе ободочной кишки при остром и хроническом колите. По нашим данным, при остром колите уровень мРНК «порообразующего» клаудина Cldn2 в медиальном отделе ободочной кишки статистически значимо возрастает и остается повышенным при хроническом колите (рис.8). При ЯК у человека и при остром ДСН-колите у крыс экспрессия Cldn2 в толстой кишке увеличивается (Oshima T., Miwa H., Joh T., 2008; Yuan B. et al., 2015; Randall K. et al., 2016), что согласуется с нашими данными. Литературные данные по изменению экспрессии Cldn2 при хроническом колите отсутствуют.

Экспрессия мРНК «запирающего» клаудина *Cldn4* не изменяется ни при остром ни при хроническом колите (рис.8). По данным литературы, при обострении ЯК у человека и при остром ДСН-колите у мышей его экспрессия в толстой кишке снижается (Oshima T., Miwa H., Joh T., 2008; Mennigen R. et al., 2009), по хроническому колиту данных нет. Вероятно, отсутствие изменений уровня мРНК в нашем эксперименте связано с использованием меньших концентрации ДСН и сроков индукции колита.

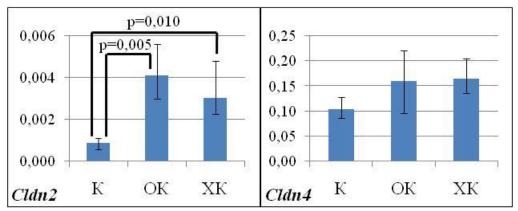


Рис.8. Уровень мРНК «порообразующего» клаудина Cldn2 и «запирающего» Cldn4 относительно мРНК β -актина в ободочной кишке мышей контрольной группы (K) и с острым (ОК) и хроническим (ХК) колитом, Ме (0,25; 0,75), p – достигнутая значимость различий

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 прогрессирование колита И его распространение направлении при длительном течении заболевания. проксимальном Статистически значимое изменение числа выявляемых ЭЭК отмечается только в медиальном отделе при остром колите.

Острый колит характеризуется выраженной воспалительной слизистой оболочки преимущественно инфильтрацией нейтрофилами лимфоцитами, увеличенной экспрессией цитокинов острой фазы воспаления IL-1β и IL-6 и противовоспалительного цитокина ТGF_β. Нарушения эпителиального барьера характеризуются увеличением числа бактерий в непосредственной близости от поверхности эпителиальных клеток, обусловлено повышением проницаемости слоя слизи; снижением содержания в бокаловидных клетках, что указывает устойчивости слизи к бактериальным ферментам; уменьшением количества муциновых вакуолей В бескаемчатых колоноцитах, гипертрофией бокаловидных клеток, что, вероятно, является компенсаторным процессом, восстановление защитного слоя слизи. Гликокаликс на истончен, экспрессия гена его основного структурного компонента Мис3 снижена. Микроворсинки деформированы, расположены нерегулярно, что может приводить к нарушению всасывания веществ из просвета кишки. Наблюдаются изменения клеточного состава эпителия: снижено 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.

характеризуется Хронический колит выраженной воспалительной инфильтрацией СО с повышенным содержанием плазмоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов, увеличенной экспрессией иммуносупрессорного цитокина IL10 и являющегося субъединицей двух провоспалительных цитокинов – IL-12 и IL-23. Изменения эпителиального барьера характеризуются сульфомуцинов в бокаловидных клетках, содержанием сниженным 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-1β и IL-2 и возрастает – IFNy и IL-17. Повышенная экспрессия *Cldn2* сохраняется.

морфофункциональных Полученные новые В работе данные 0 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.

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 острой фазы воспаления IL-1 β , IL-6 цитокинов 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-1β и IL-2 и повышается IFNγ и IL-17, а по сравнению с контрольной группой увеличивается содержание мРНК IL-10 и IL-12р40.
- 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.

- При хроническом колите нарушения эпителиального барьера ободочной 5. 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 бокаловидных клеток нормализуются в дистальном и медиальном отделах. Содержание сульфомуцинов в бокаловидных клетках снижается в дистальном и проксимальном отделах. Экспрессия мРНК клаудина Cldn2 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 что выражены В дистальном отделе, коррелирует распространенность язвенно-воспалительного процесса, а при хроническом колите – в проксимальном отделе, но воспалительный процесс в нем выражен минимально.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук

- 1. Золотова Н.А., Кирюхин С.О., Хочанский Д.Н., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Морфологические изменения ободочной кишки при экспериментальном хроническом колите, индуцированном декстрансульфатом натрия // Архив патологии. -2014.-N24.-C.29-34
- 2. Золотова Н.А., Диатроптов М.Е., Чернышева М.Б., Хочанский Д.Н., Кирюхин С.О., Постовалова Е.А. Цитокины в ободочной кишке у самцов мышей С57ВL/6 при остром и хроническом декстраниндуцированном колите // Цитокины и воспаление. − 2015. -№2 (14). C. 70-76
- 3. Золотова Н.А., Хочанский Д.Н., Поликарпова А.В., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Цитофизиологическая характеристика эпителиальных секреторных клеток разных отделов ободочной кишки при экспериментальном язвенном колите // Клиническая и экспериментальная морфология. − 2016. − №2 (18). − С. 29-37

Другие публикации

- 4. Золотова Н.А. Структурная и функциональная характеристика муцинов. Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – №1(9). – С. 66-72
- 5. Золотова Н.А., Макарова О.В. Барьерная роль муцинов толстой кишки в норме и при язвенном колите // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. Note 2019. С. 69-74
- 6. Хочанский Д.Н., Кирюхин С.О., Золотова Н.А. Морфологическая характеристика экспериментального хронического колита у самцов мышей линии C57Bl/6 // Материалы в сборнике «Бюллетень северного государственного медицинского университета» выпуск XXX. 2013. С. 108-109
- 7. Золотова Н.А., Постовалова Е.А., Кирюхин С.О., Хочанский Д.Н. Морфологическая и иммунологическая характеристика экспериментального острого и хронического колита // Материалы международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». 2014. С.114-116
- 8. Золотова Н.А. Эпителиальный барьер ободочной кишки при экспериментальном язвенном колите. Журнал анатомии и гистопатологии. 2015. Т. 4. № 3 (15). С. 54
- 9. Zolotova N.A., Polikarpova A.V. Colonic mucin barrier in acute and chronic DSS colitis // «PhD Scientific Days 2017». Budapest. 2017. http://phd.kmcongress.com/osszefoglalo/1955 (дата обращения 29.05.2017)
- 10. Золотова Н.А., Хочанский Д.Н., Поликарпова А.В., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Цитофизиологическая характеристика эпителиальных секреторных клеток разных отделов ободочной кишки при экспериментальном остром и хроническом язвенном колите // Материалы научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. 2016. С. 65-67