

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 616.348-002:615.244:616-092.9

Морфофункциональная характеристика модели острого умеренного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей

Н.А. Золотова¹ , М.В. Кириллова¹ , И.С. Цветков¹ , Д.Ш. Джалилова¹ ,
Л.В. Озерская^{1, *} , М.Т. Добрынина^{1, 2} , О.В. Макарова^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Россия, 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

*e-mail: lozloz.o@yandex.ru

Язвенный колит — социально значимое заболевание, но его этиология не ясна. Наиболее широко используемой экспериментальной моделью является колит, индуцированный декстрансульфатом натрия. Целью настоящей работы стала оценка морфофункциональных и молекулярно-биологических изменений ободочной кишки и брыжеечных лимфатических узлов при остром колите, индуцированном 1%-ным раствором декстрансульфата натрия у самцов мышей C57BL/6. При индукции колита в ободочной кишке развивался язвенно-воспалительный процесс умеренной тяжести, в брыжеечных лимфатических узлах наблюдались гиперплазия коркового вещества, плазматизация мозговых тяжей и макрофагальная реакция в синусах. В ободочной кишке были выявлены воспалительная инфильтрация, повышение содержания макрофагов, снижение объемной доли бокаловидных клеток и содержания в них нейтральных муцинов, повышение содержания эндокринных клеток, увеличение экспрессии *Cldn4*, *Cldn7*, *Bax* и *Bcl2*. Также наблюдались количественные изменения состава микробиома кишечника.

Ключевые слова: язвенный колит, экспериментальный колит, декстрансульфат натрия, микрофлора, биологическая модель, воспаление

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-2

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CgA — хромогранин А;
FDR — частота ложных обнаружений, False Discovery Rate;
М — молекулярная масса;
qPCR-RT — количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction);
БК — бокаловидные клетки;
БЛУ — брыжеечные лимфатические узлы;
ДСН — декстрансульфат натрия;
ПЦР — полимеразная цепная реакция;
рРНК — рибосомальная рибонуклеиновая кислота;
СПСО — собственная пластинка слизистой оболочки;
ШИК — реакция с Шифф-йодной кислотой для выявления нейтральных муцинов;
ЯК — язвенный колит.

Введение

Язвенный колит (ЯК) — это хроническое рецидивирующее заболевание толстой кишки. Характеризуется непрерывным воспалением слизистой оболочки, начинающимся с прямой кишки и распространяющимся в проксимальном направлении. В России распространенность ЯК составляет 20 случаев на 100 тысяч населения [1]. При этом заболеваемость ЯК во всем мире продолжает расти [2]. Этиология ЯК не установлена, предполагается роль множества факторов: наследственность, «западная диета», дисбиоз кишечника, стрессы и т.д. В связи с неясной этиологией существующие методы диагностики и лечения недостаточно эффективны [2, 3].

Изучение этиологии и патогенеза на клиническом материале затруднено, а разработка новых методов лечения требует проведения доклинических исследований. Поэтому был разработан ряд экспериментальных моделей ЯК. Наиболее широ-

ко используемой и адекватной болезни человека моделью является колит, индуцируемый декстран-сульфатом натрия (ДСН) [4, 5]. В этой модели колит индуцируют заменой питьевой воды мышам на 1–5%-ный раствор ДСН на 4–9 сут. Терапия, эффективная при ЯК, вызывает сходный эффект при ДСН-индуцированном колите у мышей, что позволяет использовать данную модель для разработки и оценки эффективности новых лекарственных средств [6]. Модель технически легко выполняема, обладает высокой воспроизводимостью, не требует больших временных и материальных затрат. Течение воспалительного процесса хорошо контролируется. Изменяя концентрацию, продолжительность и число курсов воздействия ДСН, можно моделировать острый, хронический и рецидивирующий колит разной тяжести. Точный механизм действия ДСН неизвестен, но показано, что ДСН разрушает слой слизи, ДСН в комплексе с жирными кислотами проникает в эпителиальные клетки и вызывает их гибель, что приводит к нарушению эпителиального барьера, при этом ДСН поглощается макрофагами, что приводит к их провоспалительной активации [4].

Хотя модель ДСН-индуцированного колита давно и широко используется, полностью стандартизовать ее не удается. Вариативность проявлений ДСН-индуцированного колита обусловлена как характеристиками самого ДСН (концентрация, молекулярная масса, производитель и партия) и продолжительностью его воздействия, так и генетическими особенностями животных (линия, пол) и микробиомом кишечника [4].

Целью исследования стала подробная характеристика модели колита умеренной тяжести, индуцированного 1%-ным раствором ДСН, у самцов мышей C57BL/6.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 30 половозрелых самцах мышей C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая» (филиал ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»). Мышей содержали при 18–25°C и естественном освещении, со свободным доступом к воде и комбикорму. Для индукции колита животным воду в поилках на 5 сут заменяли на 1%-ный раствор ДСН (молекулярная масса ~40,000, AppliChem, Германия), далее 2 сут животные получали питьевую воду. Животные контрольной группы на протяжении всего эксперимента получали питьевую воду. Мышей выводили из эксперимента на 7-е сут методом цервикальной дислокации. У 8 животных из опытной группы ободочную кишку и брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) фиксировали в 10%-ном буферном нейтральном формалине. У 7 животных из опытной группы ободочную кишку фиксировали в IntactRNA («Евроген», Россия) для определения экспрессии генов. У 5 животных

из опытной группы забирали каловые массы для анализа состава просветной микрофлоры.

Изготавливали гистологические препараты БЛУ, окрашенные гематоксилином и эозином, и провели их морфологическое исследование.

Гистологические срезы дистального отдела ободочной кишки, окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим pH 1,0, проводили ШИК-реакцию (окраска реактивом Шиффа после окисления йодной кислотой) и иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к CD68 (DF7518 Affinity Biosciences, Китай, разведение 1/100) и хромогранину A (CgA) (ab15160, Abcam Inc, Великобритания, разведение 1/200), использовали вторичные антитела с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 (A11008, Invitrogen, США, разведение 1/300). Проводили морфологическое исследование препаратов в программе ImageJ.

Оценка распространенности язвенно-воспалительного процесса. Продольные срезы кишки сканировали по всей длине при увеличении 100. Рассчитывали % длины участков с язвами и воспалительной инфильтрацией от общей длины среза.

Оценка воспалительной инфильтрации. Окрашенные гематоксилином и эозином препараты фотографировали при увеличении 320 в двух полях зрения, рассчитывали число клеток на 1 мм² собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО).

Оценка объемной доли макрофагов. Препараты, окрашенные антителами к CD68, фотографировали при увеличении 200 в двух полях зрения, проводили бинаризацию снимков. Определяли объемную долю макрофагов как отношение площади CD68⁺ клеток к площади слизистой оболочки.

Оценка числа эндокринных клеток. Препараты, окрашенные антителами к CgA, фотографировали при увеличении 100 в двух полях зрения. Подсчитывали число CgA⁺-клеток на 1 мм² слизистой оболочки.

Оценка объемной доли бокаловидных клеток (БК) и содержания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов. Срезы, окрашенные альциановым синим pH 1,0 и с ШИК-реакцией, фотографировали при увеличении 200 в трех полях зрения при одинаковых условиях освещения. Проводили бинаризацию снимков, устанавливая порог так, чтобы выделенными оказывались только БК. Определяли объемную долю БК как отношение площади БК к площади слизистой оболочки. Рассчитывали оптическую плотность БК как десятичный логарифм отношения средней яркости точек фона к средней яркости точек БК. Чем выше оптическая плотность, тем выше содержание высокосульфатированных (альциановый синий) или нейтральных (ШИК-реакция) муцинов в БК.

Оценка уровней экспрессии генов. Определяли уровни экспрессии генов, кодирующих белки эпителиального барьера кишки: муцины *Muc1*, *Muc3*

и клаудины *Cldn2*, *Cldn4*, *Cldn7*, про- и антиапоптозные факторы *Bax* и *Bcl2*. Выделение РНК и последующую обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческих наборов RNA-Extract Plus (bn-rxtr, Bioinnlabs, Россия) и MMLV RT Kit («Евроген», Россия), соответственно. Уровни экспрессии оценивали методом qPCR-RT относительно уровня экспрессии мРНК β -актина *Actb* на приборе DTprime («ДНК-Технология», Россия). Праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) подбирали с помощью онлайн-программы primer-BLAST в соответствии с общепринятыми требованиями, синтезировали в компании «Евроген» (Россия). Реакцию проводили с использованием готовой смеси $5\times$ qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) с олигонуклеотидами в конечных концентрациях 0,2–0,4 мкМ. Последовательности праймеров:

- *Actb* For: CCTGCCACCCAGCACAAT; Rev: GGGCCGGACTCGTCATAC

- *Cldn2* For: TGCGACACACAGCACAGGCATCAC; Rev: TCAGGAACCAGCGGCGAGTAG

- *Cldn4* For: TCGTGGGTGCTCTGGGGATGCT; Rev: GCGGATGACGTTGTGAGCGGTC

- *Cldn7* For: GCCTTGGTAGCATGTTCTCTGGA; Rev: GGTACGCAGCTTTGCTTTCACTG

- *Muc1* For: GGTGACCACTTCTGCCAACT; Rev: TCCTTCTGAGAGCCACCACT

- *Muc3* For: TGTTACGCTTTACTGTGTTTCAA; Rev: TTGCATGTCTCCTCAGGATT

- *Bcl2* For: CATGGACTGGAGAAGGGACT; Rev: ACCCATTTCTTCTGATGC

- *Bax* For: GCTGATGGCAACTTCAACTG; Rev: CCACCCTGGTCTTGGATC

Относительную концентрацию мРНК рассчитывали по формуле: $[A]_0/[B]_0 = E^{\Delta C(T)}$, где $[A]_0$ — начальная концентрация мРНК целевого гена в ПЦР-смеси; $[B]_0$ — начальная концентрация мРНК *Actb* в ПЦР-смеси; E — эффективность реакции (принимается за 1,98), $\Delta C(T)$ — разность пороговых циклов *Actb* и целевого гена.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США). Использовали методы непараметрической статистики в связи с малым размером выборки и отличным от нормального распределением значений параметров (критерий χ^2). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи — Me (25%; 75%). Для сравнения групп использовали U-критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Выполнили метагеномный анализ микрофлоры кишечника. Замороженные образцы каловых масс пяти случайно выбранных мышей из каждой группы были переданы в ООО «Хроматест» (Россия) для выделения ДНК, секвенирования гена 16S рРНК с последующим проведением метагеномной классификации с помощью Kraken 2. Статистическую обработку полученных данных про-

водили с помощью пакета DESeq2 в программной среде R, оценивали изменения состава кишечного микробиома на уровне родов и семейств. Коррекцию уровня значимости с учетом множественного тестирования проводили с использованием подхода Бенджамини-Хохберга (False Discovery Rate, FDR). Статистически значимыми считали изменения с уровнем $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании у животных контрольной группы в дистальном отделе ободочной кишки эпителиальная выстилка была сохранной на всем протяжении слизистой оболочки, крипты были глубокие, их просветы узкие. СПСО и подслизистая основа содержали небольшое количество равномерно распределенных клеточных элементов — фиброцитов, фибробластов, лимфоцитов и единичных гистиоцитов. При колите морфологическая картина ободочной кишки была мозаичной. Наиболее выраженные патологические изменения в ободочной кишке были представлены обширными, распространяющимися до мышечной пластинки язвами. В зонах с сохраненной эпителиальной выстилкой и криптами выявлялись участки с выраженной воспалительной инфильтрацией. В этих участках число БК было резко снижено. Также были участки, не отличающиеся от нормы. Распространенность язвенно-воспалительного процесса варьировала между животными и составляла 34–100% длины среза. Выявленные изменения соответствуют литературным данным по острому ДСН-индуцированному колиту и обострению ЯК у человека [4]. Выраженность изменений соответствовала умеренному течению патологического процесса (рис. 1).

При гистологическом исследовании БЛУ мышцей контрольной группы было выявлено нормальное строение ткани. БЛУ окружены соединительнотканной капсулой, наружная кора образована лимфоидными узелками и межфолликулярной зоной лимфоцитов. В лимфоидных узелках определялись небольшие светлые центры, представленные лимфоцитами и небольшим числом зрелых лимфоцитов, выявлялись единичные митозы и скопления фрагментов ядер. Паракортикальная зона была плотно заселена лимфоцитами. Мозговые тяжи были представлены лимфоцитами, гистиоцитами, единичными плазмócитами, ретикулярными клетками, коллагеновыми и ретикулярными волокнами. Краевой, промежуточные и мозговые синусы были узкими, в них выявлялось небольшое число лимфоцитов и макрофагов в соотношении примерно 1:1. У мышей с острым колитом по сравнению с контрольной группой в лимфоидных узелках выявлялись широкие светлые центры; в мозговых тяжах наблюдалось большое количество плазмócитов; краевой, промежуточные и мозговые синусы

были расширены и заполнены лимфоцитами и макрофагами, макрофаги преобладали. Таким образом, при остром колите в БЛУ наблюдались гиперплазия коркового вещества, плазматизация мозговых тяжей и макрофагальная реакция в синусах (рис. 2А, Е). Полученные нами результаты согласуются с данными литературы по ЯК у человека и ДСН-индуцированному колиту у мышей [7].

При морфометрических исследованиях у мышей с острым колитом изменения в слизистой оболочке ободочной кишки оценивали в зонах без язв, но с выраженными воспалительными изменениями. При колите снижалась объемная плотность БК и содержание в них нейтральных муцинов, при

этом содержание высокосульфатированных муцинов не изменялось (рис. 2Б, В, Ж, З). Возрастало число эндокринных CgA^+ -клеток, увеличивалось содержание клеток в СПСО и объемная доля макрофагов в слизистой оболочке (рис. 2Г, Д, И, К).

Для ЯК характерно снижение числа БК, количества внутриклеточной и внеклеточной слизи, что коррелирует с тяжестью течения заболевания [8]. При активном ЯК показано значительное снижение сульфатирования муцина в БК [4]. При остром ДСН-индуцированном колите выявлено статистически значимое снижение числа ШИК-положительных БК в ободочной кишке у мышей [9], что согласуется с нашими результатами.

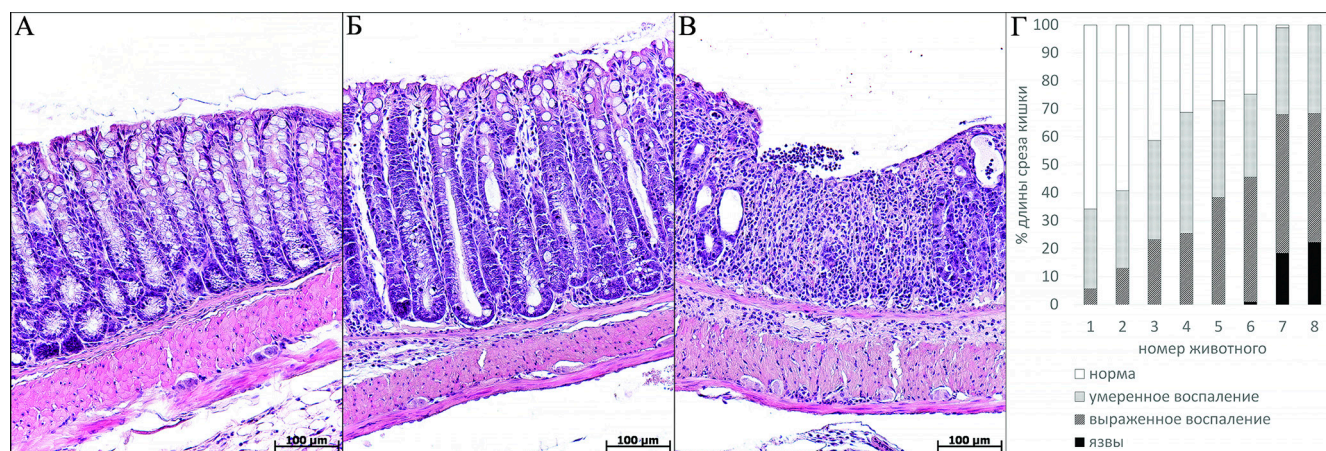


Рис. 1. Дистальный отдел ободочной кишки мышей контрольной группы (А) и животных с острым колитом (Б, В), окраска гематоксилином и эозином. Г – распространенность язвенно-воспалительного процесса в ободочной кишке у мышей с острым колитом.

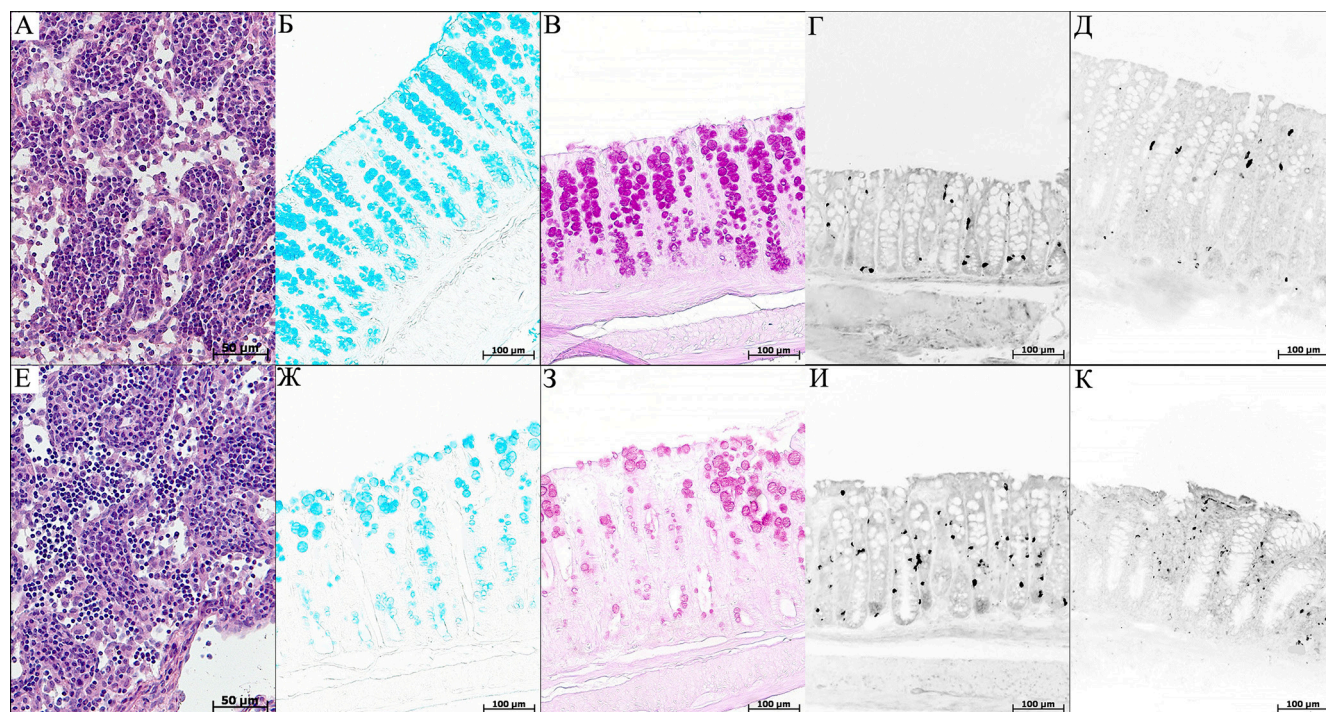


Рис. 2. Брыжеечные лимфатические узлы и дистальный отдел ободочной кишки мышей контрольной группы (А–Д) и животных с острым колитом (Е–К). А, Е – мозговое вещество лимфатических узлов. Окраска гематоксилин и эозин. Б, Ж – высокосульфатированные муцины, окраска альтиановым синим. В, З – нейтральные муцины, ШИК-реакция. Г, И – эндокринные клетки, антитела к хромогранину А. Д, К – макрофаги, антитела к CD68

Эндокринные клетки мы выявляли по гликопротеину СgА, накапливающемуся в секреторных гранулах вместе с гормонами. В толстой кишке у человека наличие СgА показано во всех Ес- и L-клетках и в единичных D-клетках, а у мышей – только в Ес-клетках [10, 11]. Следовательно, число СgА⁺-клеток в толстой кишке мышей отражает количество Ес-клеток. У людей при обострении ЯК число Ес-клеток в толстой кишке снижается, а в период ремиссии и при длительном течении заболевания – увеличивается. Снижение количества Ес-клеток при обострении ЯК, вероятно, связано с их гиперсекрецией. При длительном умеренном течении заболевания повышенная стимуляция секреции серотонина приводит к гиперплазии Ес-клеток. При остром ДСН-индуцированном колите число СgА⁺-клеток возрастает [4], что согласуется с нашими данными.

Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки преимущественно лимфоцитами, нейтрофилами и плазмócитами характерна для ЯК у человека и ДСН-индуцированного колита у мышей. Также при ЯК усиливается миграция моноцитов в область воспаления и выявлена корреляция тяжести течения заболевания с накоплением маркера макрофагов CD68 [12]. В модели ДСН-индуцированного колита также показано увеличение числа CD68⁺ макрофагов в ободочной кишке [4, 13].

При остром колите повышалась экспрессия клаудинов *Cldn4* и *Cldn7*, про- и антиапоптотического факторов *Bax* и *Bcl2*. Экспрессия мРНК муцинов *Muc1*, *Muc3* и клаудина *Cldn2* статистически значимо не изменялась (таблица).

По данным литературы у больных ЯК содержание *MUC1* в толстой кишке возрастает. При тяжелом ЯК выявлено увеличение экспрессии мРНК *MUC1* в зоне крипт-абсцессов [14]. По одним дан-

ным, при ЯК экспрессия мРНК *MUC3* не изменяется [14], по другим – содержание гликопротеина *MUC3* при тяжелом течении заболевания снижается [8]. При остром ДСН-индуцированном колите было показано повышение экспрессии мРНК *Muc1* и *Muc3* [15]. В наших более ранних исследованиях статистически значимого изменения уровня экспрессии мРНК *Muc1* не выявлено, но обнаружено снижение *Muc3* [16].

В ободочной кишке у больных ЯК значительно возрастает содержание белка клаудина 2 [17–20]. Относительно экспрессии мРНК клаудина 2 при ЯК данные противоречивы. Согласно данным Ошима и др. [18] и Рэндалл и др. [21], уровень мРНК *CLDN2* возрастает, согласно Чужич и др. [22] – не изменяется. У животных с ДСН-индуцированным колитом в ободочной кишке возрастает содержание белка клаудина 2 [23–26], а экспрессия его мРНК по разным данным повышается [27], не изменяется [23] или снижается [22]. У мышей с дефицитом клаудина-2 (*Cldn2*^{-/-}) ДСН-индуцированный колит протекает тяжелее [28]. Напротив, у трансгенных мышей с гиперэкспрессией клаудина-2 ДСН-индуцированный колит протекает легче. У таких животных была повышена проницаемость слизистой оболочки, увеличена пролиферативная активность колоноцитов, было больше регуляторных (CD4⁺Foxp3⁺) Т-клеток, выше продукция противовоспалительного TGF-β клетками эпителия толстой кишки [29]. Таким образом, повышение продукции клаудина 2 при колите является адаптивной реакцией. Мы не выявили изменения экспрессии мРНК *Cldn2* в нашем эксперименте, что может быть связано либо с относительно легким течением колита, либо с посттранскрипционной регуляцией синтеза белка.

Таблица

Морфологические и молекулярные изменения в слизистой оболочке ободочной кишки у мышей при остром колите Ме (25–75%)

Показатель		Контроль	Язвенный колит	p
Высокосульфатированные муцины, усл. ед.		1 (0,99–1,02)	0,92 (0,85–1,13)	0,46
Нейтральные муцины, усл. ед.		1 (0,96–1,02)	0,93 (0,91–0,94)	0,027
Объемная доля БК, %		30 (33,2–40,8)	16,3 (14,3–19,7)	0,00078
Эндокринные клетки, кл./мм ²		112 (102–117)	138 (120–189)	0,0063
Клетки в СПСО, кл./мм ²		145 (142–154)	258 (235–262)	0,00078
Объемная доля макрофагов, %		0,62 (0,53–0,63)	0,80 (0,75–0,87)	0,00078
Экспрессия мРНК генов относительно β-актина	<i>Muc1</i>	0,56 (0,51–0,90)	1,19 (0,79–1,51)	0,084
	<i>Muc3</i>	5,52 (4,49–14,35)	31,49 (7,76–34,89)	0,064
	<i>Cldn2</i>	0,81 (0,66–1,11)	1,73 (1,15–3,09)	0,084
	<i>Cldn4</i>	0,51 (0,43–0,62)	3,92 (1,91–4,78)	0,0017
	<i>Cldn7</i>	0,46 (0,38–0,52)	1,79 (1,56–2,35)	0,0017
	<i>Bax</i>	0,15 (0,13–0,29)	1,11 (0,85–8,60)	0,0017
	<i>Bcl2</i>	0,18 (0,16–0,25)	1,27 (0,79–5,33)	0,0017

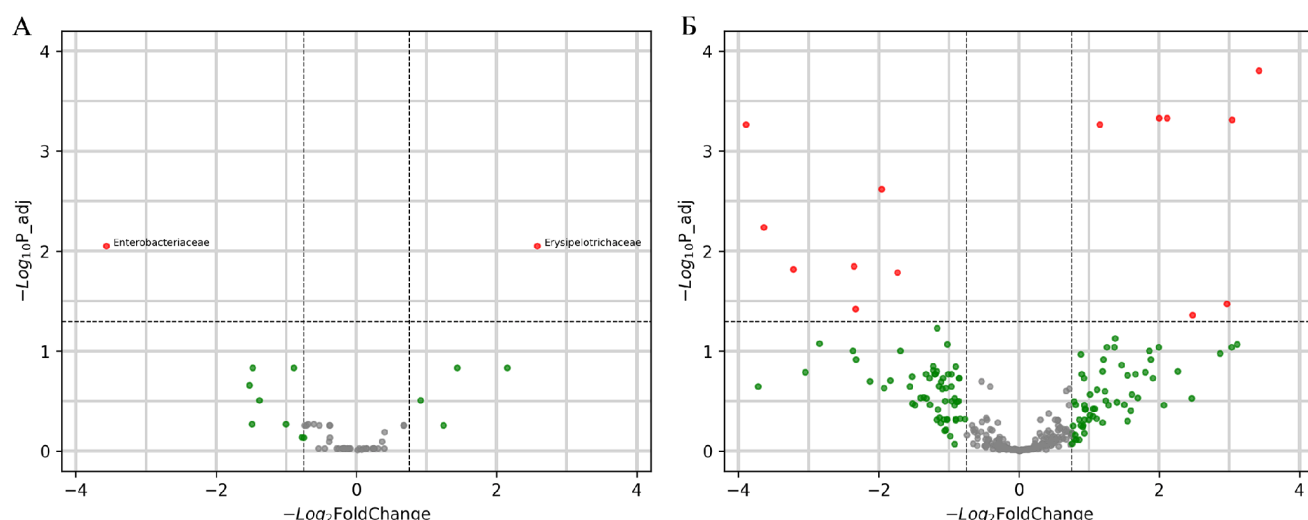


Рис. 3. Изменения состава микрофлоры кишечника мышей при остром колите на уровне семейств (А) и на уровне родов (Б).

В толстой кишке у больных ЖК уровень белка клаудина 4 по одним данным снижается [17, 18], по другим — не изменяется [19], а согласно Веберу и др. [20] — возрастает при средней активности воспаления. Экспрессия мРНК клаудина 4 не изменяется [22, 30]. При экспериментальном ДСН-индуцированном колите содержание белка клаудина 4 снижается [23, 31, 32]. Экспрессия мРНК *Cldn4*, согласно большинству исследований, не изменяется [23, 24, 27, 33], однако Чужич и др. [22] выявили ее повышение при хроническом колите. У мышей с нокаутированным геном клаудина-4 (*Cldn4*^{-/-}) развиваются симптомы, похожие на колит, связанные с повышенной проницаемостью кишечника [23]. Клаудины 2 и 4 являются антагонистами на белковом уровне и конкурируют за место в плотных контактах [34]. Вероятно, наблюдаемое нами повышение экспрессии *Cldn4* является адаптивной реакцией.

При ЖК показано снижение содержания белка и экспрессии мРНК клаудина 7 [18], а также уменьшение числа клаудин 7-положительных клеток [35]. У животных при ДСН-индуцированном колите содержание белка клаудина 7 снижается [26, 35, 36], а экспрессия мРНК не изменяется [33]. У мышей с нокаутом клаудина-7 вскоре после рождения развивается тяжелый спонтанный колит [34], а у мышей с индуцируемым кишечным условным нокаутом гена *Cldn7* тяжелее протекает ДСН-индуцированный колит [37]. Вероятно, наблюдаемое нами повышение экспрессии *Cldn7* также является адаптивной реакцией.

При ЖК у человека и ДСН-индуцированном колите у животных в ободочной кишке возрастает число гибнущих и пролиферирующих клеток, причем эти изменения коррелируют с тяжестью воспалительного процесса [4].

Выявленные морфофункциональные и молекулярно-биологические изменения указывают на повреждение эпителиального барьера ободочной

кишки, повышение его проницаемости и активацию воспалительных реакций в зонах слизистой оболочки без язв.

Анализ с применением поправки Бенджамини—Хохберга показал, что индукция колита ассоциирована со статистически значимыми изменениями в отношении состава представителей семейств *Erysipelotrichaceae* и *Enterobacteriaceae*. При этом увеличение доли микроорганизмов более чем в 1,5 раза наблюдалось для семейства *Erysipelotrichaceae*, в то время как для семейства *Enterobacteriaceae* наблюдалось снижение доли микроорганизмов (рис. 3А).

При анализе родового разнообразия кишечной микрофлоры статистически значимое изменение доли микроорганизмов, вследствие индукции колита наблюдалось для 19 родов: *Butyrivibrio*, *Sedimentibacter*, *Peptostreptococcus*, *Allobaculum*, *Holdemanella*, *Barnesiella*, *Paludibacter*, *Petrimonas*, *Rhodocytophaga*, *Halopolyspora*, *Ruminococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Paraprevotella*, *Bacteroides*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Legionella*, *Succinivibrio*. Статистически значимое увеличение доли микроорганизмов более чем в 1,5 раза наблюдалось для родов *Butyrivibrio*, *Sedimentibacter*, *Peptostreptococcus*, *Allobaculum*, *Holdemanella*, *Barnesiella*, *Paludibacter*, *Petrimonas*, *Rhodocytophaga*, *Halopolyspora*, в то время как для родов *Ruminococcus*, *Nosocomiicoccus*, *Paraprevotella*, *Bacteroides*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Legionella*, *Succinivibrio* наблюдалось статистически значимое снижение доли микроорганизмов (рис. 3Б). Выборки для анализа были небольшие, поэтому полученные результаты следует рассматривать как предварительные.

Большое количество современных исследований подтверждают, что микробиота кишечника влияет на метаболизм организма в целом и, таким образом, участвует в регуляции различных физиологических и патологических процессов, в том чис-

ле воспалительных заболеваний [38–40]. Показано, что бактерии, населяющие толстый кишечник, синтезируют ряд короткоцепочечных жирных кислот, витаминов и незаменимых аминокислот, тем самым поддерживая иммунную микросреду кишечника. При воспалительных заболеваниях кишечника наблюдается снижение разнообразия и нарушение баланса бактерий по сравнению с этими показателями у здоровых людей и лабораторных животных. Так, известно о значительном снижении представленности таксонов *Firmicutes*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidales*, а также *Clostridiales*, продуцирующих бутират, в образцах кала пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника [41, 42]. Так как бутират способствует выработке муцина и антимикробных пептидов, то снижение количества бактерий-продуцентов приводит к снижению барьерной функции слизистой оболочки кишечника и развитию воспаления.

Заключение

Таким образом, острый колит, индуцированный 1%-ным раствором ДСН, у самцов мышей C57BL/6 характеризуется развитием в ободочной

кишке язвенно-воспалительного процесса умеренной тяжести, а в брыжеечных лимфатических узлах — гиперплазии коркового вещества, плазматизации мозговых тяжей и увеличения числа макрофагов в синусах. В ободочной кишке в зонах вне язв выявляется выраженная воспалительная инфильтрация, увеличивается содержание CD68+ макрофагов. Снижается объемная доля БК и содержание в них нейтральных муцинов. Возрастает число эндокринных клеток, продуцирующих серотонин. Возрастает экспрессия компонентов плотных контактов клаудинов 4 и 7, а также про- и антиапоптотических факторов *Vax* и *Bcl2*. Наблюдаются выраженные изменения состава кишечной микрофлоры.

Работа выполнена в рамках государственного задания Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского (№122030200530-6). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены локальным этическим комитетом РНЦХ имени академика Б.В. Петровского (протокол № 7 от 03.12.2021 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маркова А.А., Кашкина Е.И. Современные методы диагностики и оценки тяжести течения неспецифического язвенного колита. *Вестник ТГУ*. 2012;17(3):915–919.
2. Du L., Ha C. Epidemiology and pathogenesis of ulcerative colitis. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2020;49(4):643–654.
3. Bolotova E.V., Yumukyan K.A., Dudnikova A.V. Modern idea of the mechanisms of development and predictors of ulcerative colitis severity. *Doctor. Ru.* 2022;21(2):34–39.
4. Золотова Н.А., Архиева Х.М., Зайратьянц О.В. Эпителиальный барьер толстой кишки в норме и при язвенном колите. *Экспер. клин. гастроэнтерол.* 2019;(2):4–13.
5. Katsandegwaza B., Horsnell W., Smith K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(16):9344.
6. Sann H., Erichsen J.V., Hessmann M., Pahl A., Hoffmeyer A. Efficacy of drugs used in the treatment of IBD and combinations thereof in acute DSS-induced colitis in mice. *Life Sci.* 2013;92(12):708–718.
7. Postovalova E.A., Khochansky D.N., Zolotova N.A., Gao Y., Makarova O.V., Dobrynina M.T. Morphological changes in mesenteric lymph nodes and lymphocyte subpopulation composition in experimental ulcerative colitis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016;160(6):835–839.
8. 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. *Гастроэнтерол.* 2013;47(1):80–84.
9. Issa C.M., Hambly B.D., Wang Y., Maleki S., Wang W., Fei J., Bao S. TRPV2 in the development of experimental colitis. *Scand. J. Immunol.* 2014;80(5):307–312.
10. Portela-Gomes G.M., Stridsberg M. Chromogranin A in the human gastrointestinal tract: an immunocytochemical study with region-specific antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50(11):1487–1492.
11. Engelstoft M.S., Lund M.L., Grunddal K.V., Egerod K.L., Osborne-Lawrence S., Poulsen S.S., Zigman J.M., Schwartz T.W. Research resource: a chromogranin A reporter for serotonin and histamine secreting enteroendocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 2015;29(11):1658–1671.
12. Na Y.R., Stakenborg M., Seok S.H., Matteoli G. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019;16(9):531–543.
13. Jang S., Jang S., Ko J., Bae J.E., Hyung H., Park J.Y., Lim S.G., Park S., Park S., Yi J., Kim S., Kim M.O., Cho D.H., Ryoo Z.Y. HSPA9 reduction exacerbates symptoms and cell death in DSS-induced inflammatory colitis. *Sci. Rep.* 2024;14(1):5908.
14. Longman R.J., Poulson R., Corfield A.P., Warren B.F., Wright N.A., Thomas M.G. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J. Histochem. Cytochem.* 2006;54(12):1335–1348.
15. Hoebler C., Gaudier E., De Coppet P., Rival M., Cherbut C. MUC genes are differently expressed during onset and maintenance of inflammation in dextran sodium sulfate-treated mice. *Dig. Dis. Sci.* 2006;51(2):381–389.
16. Zolotova N.A., Polikarpova A.V., Khochanskii D.N., Makarova O.V., Mikhailova L.P. Expression of mucins and claudins in the colon during acute and chronic experimental colitis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018;165(4):434–437.

17. Das P., Goswami P., Das T.K., Nag T., Sreenivas V., Ahuja V., Panda S.K., Gupta S.D., Makharia G.K. Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective. *Virchows Arch.* 2012;460(3):261–270.
18. Oshima T., Miwa H., Joh T. Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008;23 Suppl. 2:S146–S150.
19. Prasad S., Mingrino R., Kaukinen K., Hayes K.L., Powell R.M., MacDonald T.T., Collins J.E. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab. Invest.* 2005;85(9):1139–1162.
20. Weber C.R., Nalle S.C., Tretiakova M., Rubin D.T., Turner J.R. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab. Invest.* 2008;88(10):1110–1120.
21. Randall K., Henderson N., Reens J., Eckersley S., Nyström A.C., South M.C., Balendran C.A., Böttcher G., Hughes G., Price S.A. Claudin-2 expression levels in ulcerative colitis: development and validation of an in-situ hybridisation assay for therapeutic studies. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162076.
22. Čužić S., Antolić M., Ognjenović A., Stupin-Polančec D., Petrinić Grba A., Hrvačić B., Dominis Kramarić M., Musladin S., Požgaj L., Zlatar I., Polančec D., Aralica G., Banić M., Urek M., Mijandrušić Sinčić B., Čubranić A., Glojnaric I., Bosnar M., Eraković Haber V. Claudins: beyond tight junctions in human IBD and murine models. *Front. Pharmacol.* 2021;12:682614.
23. Liu S., Wang Z., Xiang Q., Wu B., Lv W., Xu S. A comparative study in healthy and diabetic mice followed the exposure of polystyrene microplastics: Differential lipid metabolism and inflammation reaction. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022;244:114031.
24. Al-Failakawi A., Al-Jarallah A., Rao M., Khan I. The role of claudins in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis: the effects of nobiletin. *Biomolecules.* 2024;14(9):1122.
25. Kim H.Y., Jeon H., Bae C.H., Lee Y., Kim H., Kim S. Rumex japonicus Houtt. alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by protecting tight junctions in mice. *Integr. Med. Res.* 2020;9(2):100398.
26. Yuan B., Zhou S., Lu Y., Liu J., Jin X., Wan H., Wang F. 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):734–740.
27. Золотова Н.А., Поликарпова А.В., Хочанский Д.Н., Макарова О.В., Михайлова Л.П. Экспрессия муцинов и клаудинов в ободочной кишке при остром и хроническом экспериментальном колите. *Бюлл. экп. биол. мед.* 2018;165(4):421–424.
28. Nishida M., Yoshida M., Nishiumi S., Furuse M., Azuma T. Claudin-2 regulates colorectal inflammation via myosin light chain kinase-dependent signaling. *Dig. Dis. Sci.* 2013;58(6):1546–1559.
29. Ahmad R., Chaturvedi R., Olivares-Villagómez D., Habib T., Asim M., Shivesh P., Polk D.B., Wilson K.T., Washington M.K., Van Kaer L., Dhawan P., Singh A.B. Targeted colonic claudin-2 expression renders resistance to epithelial injury, induces immune suppression, and protects from colitis. *Mucosal Immunol.* 2014;7(6):1340–1353.
30. Lameris A.L., Huybers S., Kaukinen K., Mäkelä T.H., Bindels R.J., Hoenderop J.G., Nevalainen P.I. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2013;48(1):58–69.
31. Cai L., Li X., Geng C., Lei X., Wang C. Molecular mechanisms of somatostatin-mediated intestinal epithelial barrier function restoration by upregulating claudin-4 in mice with DSS-induced colitis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018;315(4):C527–C536.
32. Mennigen R., Nolte K., Rijcken E., Utech M., Loeffler B., Senninger N., Bruewer M. 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):G1140–G1149.
33. Arinno A., Sukmak P., Kulworasreth P., Sricharunrat T., Vaddhanaphuti C.S., Pongkorpsakol P. Gallic acid serves as an effective therapeutic agent of inflammatory bowel disease: pharmacological impacts on tight junction-dependent intestinal permeability *in vivo* and its related intracellular signaling. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* 2025;8:100223.
34. Capaldo C.T. Claudin barriers on the brink: how conflicting tissue and cellular priorities drive IBD pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(10):8562.
35. Wang K., Ding Y., Xu C., Hao M., Li H., Ding L. Cldn-7 deficiency promotes experimental colitis and associated carcinogenesis by regulating intestinal epithelial integrity. *Oncoimmunology.* 2021;10(1):1923910.
36. Ogata M., Ogita T., Tari H., Arakawa T., Suzuki T. Supplemental psyllium fibre regulates the intestinal barrier and inflammation in normal and colitic mice. *Br. J. Nutr.* 2017;118(9):661–672.
37. Ding Y., Wang K., Xu C., Hao M., Li H., Ding L. Intestinal Claudin-7 deficiency impacts the intestinal microbiota in mice with colitis. *BMC Gastroenterol.* 2022;22(1):24.
38. Dvornikova K.A., Platonova O.N., Bystrova E.Y. Hypoxia and intestinal inflammation: common molecular mechanisms and signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(3):2425.
39. Zong W., Friedman E.S., Allu S.R., Firman J., Tu V., Daniel S.G., Bittinger K., Liu L., Vinogradov S.A., Wu G.D. Disruption of intestinal oxygen balance in acute colitis alters the gut microbiome. *Gut Microbes.* 2024;16(1):2361493.
40. Hong D., Kim H.K., Yang W., Yoon C., Kim M., Yang C.S., Yoon S. Integrative analysis of single-cell RNA-seq and gut microbiome metabarcoding data elucidates macrophage dysfunction in mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Commun. Biol.* 2024;7(1):731.
41. Gevers D., Kugathasan S., Denson L.A., et al. The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe.* 2014;15(3):382–392.
42. Mirsepasi-Lauridsen H.C., Vrankx K., Engberg J., Friis-Møller A., Brynskov J., Nordgaard-Lassen I., Petersen A.M., Krogfelt K.A. Disease-specific enteric microbiome dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Front. Med. (Lausanne).* 2018;5:304.

Поступила в редакцию 29.11.2024

После доработки 26.06.2025

Принята в печать 16.09.2025

RESEARCH ARTICLE

The morphofunctional profile of a mouse model of acute moderate dextran sodium sulfate-induced colitis

N.A. Zolotova¹ , M.V. Kirillova¹ , I.S. Tsvetkov¹ , D.Sh. Dzhililova¹ ,
L.V. Ozeretskaya^{1,*} , M.T. Dobrynina^{1,2} , O.V. Makarova^{1,2} 

¹*Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery,
3 Tsyurupa Str., Moscow, 117418, Russia;*

²*Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia*

**e-mail: lozloz.o@yandex.ru*

Ulcerative colitis is a socially significant disease, but its etiology is unclear. The most widely used experimental model is dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. The aim of the work was to characterize morphofunctional and molecular biological changes in the colon and mesenteric lymph nodes in acute colitis induced by 1% DSS solution in male C57BL/6 mice. Upon induction of colitis, moderate ulcerative inflammatory process developed in the colon, hyperplasia of the cortex, plasmatisation of the medullary cords and macrophage reaction in the sinuses were observed in the mesenteric lymph nodes. Inflammatory infiltration, increased macrophage content, decreased volume fraction of goblet cells and neutral mucin content in them, increased endocrine cell content, increased expression of *Cldn4*, *Cldn7*, *Bax* and *Bcl2* were detected in the colon. Pronounced changes in the composition of intestinal microflora were observed.

Keywords: *ulcerative colitis, experimental colitis, dextran sulfate sodium, microflora, biological model, inflammation*

Funding: This study was performed under the state assignment of Petrovsky National Research Center of Surgery, project no. 122030200530-6.

Сведения об авторах

Золотова Наталья Александровна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: natashazltv@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0119-9889>

Кириллова Мария Валерьевна — мл. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: nmarusyasilina99@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7781-5537>

Цветков Иван Сергеевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: davedm66@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>

Джалилова Джулия Шавкатовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: juliajal93@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Озерецкая Любовь Владимировна — лаб.-иссл. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: lozloz.o@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8646-3952>

Добрынина Мариэтта Тиграновна — канд. биол. наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-128-87-41; e-mail: mariettadobrynina@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0361-1184>

Мakarova Ольга Васильевна — докт. мед. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. иммуноморфологии воспаления НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»; проф. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-128-87-41; e-mail: makarov.olga2013@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>