

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

На правах рукописи

Постовалова Екатерина Андреевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ИММУННОЙ
СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Морфофункциональная характеристика органов иммунной системы в норме и при воспалительных заболеваниях.....	10
1.1.1 Морфофункциональная характеристика центральных органов иммунной системы	10
1.1.2. Морфофункциональная характеристика периферических органов иммунной системы	23
1.1.3. Морфофункциональная характеристика иммунной системы толстой кишки	31
1.2. Язвенный колит	43
1.2.1. Иммунологические механизмы язвенного колита у человека	43
1.2.2. Модель язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия	49
1.3. Вторичный иммунодефицит	51
1.3.1. Общая характеристика	51
1.3.2. Вторичный иммунодефицит при язвенном колите	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	59
2.1. Объект исследования	59
2.2. Дизайн эксперимента.....	59
2.3. Методы исследования.....	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	72
3.1. Морфофункциональная характеристика иммунной системы у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и при остром язвенном колите разной тяжести.....	72
3.1.1. Морфофункциональная характеристика ободочной кишки	72
3.1.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови.	85
3.1.3. Уровень эндотоксина в сыворотке крови.....	89
3.1.4. Морфофункциональная характеристика тимуса	90
3.1.5. Морфофункциональная характеристика селезенки	111

3.1.6. Морфофункциональная характеристика брыжеечных лимфатических узлов	117
3.2. Морфофункциональная характеристика иммунной системы у половозрелых самцов мышей С57В1/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита.....	127
3.2.1. Морфофункциональная характеристика ободочной кишки	127
3.2.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови	135
3.2.3. Уровень эндотоксина в сыворотке крови.....	137
3.2.4. Морфофункциональная характеристика тимуса	139
3.2.5. Морфофункциональная характеристика селезенки	156
3.2.6. Морфофункциональная характеристика брыжеечных лимфатических узлов	161
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	168
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	194
6. ВЫВОДЫ	195
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	196
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	198

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Острые и хронические воспалительные, инфекционные, вирусные и опухолевые заболевания сопровождаются развитием вторичных иммунодефицитных состояний и структурно-функциональных изменений лимфоидных органов: в тимусе – акцидентальной инволюцией, в лимфатических узлах – гиперплазией, атрофией и синусными реакциями, в селезёнке – гиперплазией и атрофией белой пульпы (Mills S.E, 2007).

Акцидентальная инволюция тимуса характеризуется прогрессирующим снижением его массы и изменением функциональной активности (Зайратьянц О.В., 1998; Sasaki S. et. al., 2008; Meunier M. et al., 2013). Выраженность акцидентальной инволюции тимуса зависит от тяжести патологического процесса, а также исходного генофенотипически обусловленного функционального состояния иммунной системы. Морфологические проявления акцидентальной инволюции охарактеризованы в отечественных работах Т.Е. Ивановской и соавт. (1996) и О.В. Зайратьянца (1998). В отличие от отечественной, в зарубежной литературе выделяют гиперплазию тимуса, острую и хроническую инволюцию (Gill J. et al., 2003; Wang D. et al., 2006; Sasaki S. et. al., 2008; Meunier M. et al., 2013).

Морфологические изменения тимуса и периферических лимфоидных органов в норме и при воспалительных заболеваниях исследованы достаточно полно, но ни в одной из работ они не соотнесены между собой и с нарушениями субпопуляционного состава лимфоцитов в них, периферической крови и очаге воспаления. До сих пор не охарактеризованы морфофункциональные изменения тимуса при разных формах вторичных иммунодефицитных состояний. Решение этой задачи у человека затруднено, поэтому проведение этих исследований возможно только на экспериментальном материале.

Одной из моделей воспалительных заболеваний человека является экспериментальный язвенный колит, индуцированный декстрансульфатом натрия (Okayasu I. et al., 1990). Эта модель адекватна язвенному колиту у человека и широко используется для изучения механизмов этого тяжелого заболевания (Perše M., Cerar A., 2012). В ряде работ показано, что в патогенезе язвенного колита важная роль принадлежит $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторным Т-лимфоцитам, которые оказывают цитокин-независимое супрессорное действие (Быковская С.Н., 2013; Powrie F., 2004; Izcue A. et al., 2006; Ando T. et al., 2007; Hakansson A. et al., 2014).

Таким образом, имеющиеся в литературе данные о морфологических изменениях центральных и периферических лимфоидных органов при воспалительных заболеваниях и, в частности, при язвенном колите фрагментарны и не соотнесены с субпопуляционным составом лимфоцитов периферической крови и очага воспаления и формой вторичного иммунодефицитного состояния.

Цель работы. Охарактеризовать морфофункциональные изменения иммунной системы при остром и хроническом язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, у половозрелых самцов мышей линии C57BL/6.

Задачи исследования:

1. На моделях острого и хронического язвенного колита оценить тяжесть системных воспалительных и иммунных реакций по изменению уровня эндотоксина и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови.
2. Изучить морфологические изменения функциональных зон тимуса и тимических телец, определить количество гибнущих клеток, субпопуляционный состав лимфоцитов, нелимфоидных клеток при разной тяжести острого и в разные сроки развития хронического язвенного колита.

3. Охарактеризовать морфофункциональные изменения селезенки при разной тяжести острого и в разные сроки развития хронического язвенного колита.
4. Оценить морфологические изменения и субпопуляционный состав лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов при разной тяжести острого и в разные сроки развития хронического язвенного колита.
5. Определить субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов в суспензии клеток, выделенных из стенки ободочной кишки, при разной тяжести острого и в разные сроки развития хронического язвенного колита.

Методология и методы исследования. Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: оценка клинических проявлений колита, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, морфометрические методы, выделение клеток из тимуса, брыжеечных лимфатических узлов и стенки ободочной кишки, проточная цитофлуориметрия, хромогенный LAL-тест и статистические методы.

Научная новизна и практическая значимость работы.

При экспериментальном остром катарально-язвенном колите развивается транзиторный вторичный иммунодефицит, характеризующийся умеренной острой акцидентальной инволюцией тимуса со снижением в нем числа Т-лимфоцитов за счет их гибели и миграции в очаг воспаления, увеличением содержания в тимусе дендритных клеток, гиперплазией и синусными реакциями лимфатических узлов.

При тяжелом остром фибринозно-язвенном колите выявлен декомпенсированный вторичный иммунодефицит: выраженная острая акцидентальная инволюция тимуса со снижением количества Т- и В-лимфоцитов преимущественно за счет их гибели, гиперплазией эпителиальных клеток мозгового вещества; резкая редукция белой пульпы селезенки; гиперплазия и синусные реакции лимфатических узлов,

нарушения баланса субпопуляций лимфоцитов с повышением количества иммуносупрессорных регуляторных Т-лимфоцитов.

При хроническом язвенном колите в разные сроки его развития выявлен компенсированный вторичный иммунодефицит, в тимусе наблюдается гиперплазия коркового вещества и мозговых эпителиальных клеток; гиперплазия ПАЛМ-зоны селезенки и функциональных зон лимфатических узлов.

Разработанные модели вторичного иммунодефицитного состояния при остром и хроническом язвенном колите – транзиторного, компенсированного и декомпенсированного, целесообразно использовать для изучения иммунных механизмов инфекционно-воспалительных заболеваний у человека и доклинической оценки эффективности иммуотропных лекарственных средств.

Положения, выносимые на защиту:

1. При катарально-язвенном колите развивается транзиторный вторичный иммунодефицит с умеренной острой акцидентальной инволюцией тимуса со снижением в нем содержания Т-лимфоцитов, гиперплазией лимфатических узлов и повышением содержания регуляторных Т- и В-лимфоцитов в ободочной кишке.
2. При тяжелом фибринозно-язвенном колите выявлен декомпенсированный вторичный иммунодефицит с выраженной острой акцидентальной инволюцией тимуса, снижением в нем всех субпопуляций лимфоцитов, за исключением регуляторных Т-лимфоцитов, гиперплазией мозговых эпителиальных клеток, с редукцией белой пульпы селезенки, гиперплазией лимфатических узлов и повышением в них числа регуляторных Т-лимфоцитов.
3. В ранний и поздний сроки хронического язвенного колита наблюдается компенсированный вторичный иммунодефицит, в тимусе развивается гиперплазия коркового вещества и мозговых эпителиальных клеток, в селезенке и лимфатических узлах гиперплазия функциональных зон.

Личный вклад соискателя заключается в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием современных методов исследования, корректным применением статистических методов, критическим анализом результатов исследования и сопоставлении их с актуальными литературными данными.

Апробация результатов исследования. Материалы диссертации доложены на XXI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2014" (Москва, 2014), международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2014), всероссийском форуме имени В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2015), всероссийской научной конференции «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016), IX пленуме правления Российского общества патологоанатомов (Архангельск, 2016), V съезде Российского общества патологоанатомов (Челябинск, 2017), международной научной конференции PhD Scientific Days 2018 (Будапешт, 2018).

Публикации. По результатам работы опубликовано 5 статей, из них 2 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science; 1 – в журнале, индексируемом в Scopus; 1 – в журнале, индексируемом в РИНЦ; 1 статья в зарубежном журнале, индексируемом в Google Scholar; из них 3 статьи, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и 8 публикаций в материалах всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 217 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (184 работы), диссертация содержит 89 рисунков и 24 таблицы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Морфофункциональная характеристика органов иммунной системы в норме и при воспалительных заболеваниях

1.1.1 Морфофункциональная характеристика центральных органов иммунной системы

Органы иммунной системы (лимфоидные) разделяют на первичные (центральные) и вторичные (периферические) (рис. 1). В центральных органах иммунной системы происходит развитие лимфоцитов, в периферических – реализация лимфоцитами своих функций (Хэм А., Кормак Д., 1983; Rosai J., 2004). К центральным органам иммунной системы относят костный мозг и тимус. Костный мозг служит органом гемопоэза и иммуногенеза (Murphy K., 2012).

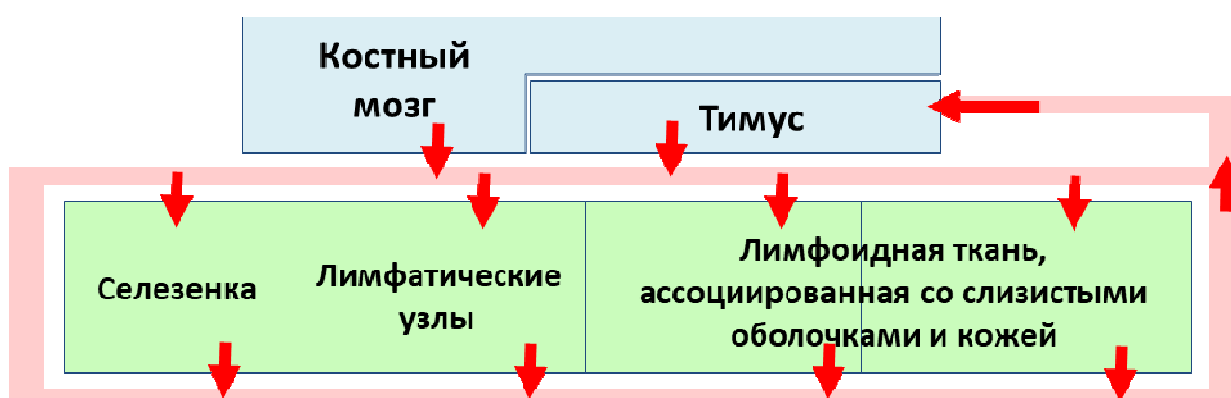


Рис. 1. Структурная организация центральных и периферических лимфоидных органов

Тимус долгое время считали железой детского возраста, поскольку его удаление у взрослых животных не приводило к серьезным последствиям. Тимэктомия у новорожденных мышей приводит к нарушению дифференцировки лимфоцитов и гибели иммунологически беззащитных животных. При пересадке тимуса иммунологические реакции восстанавливались. В настоящее время установлено, что тимус является полифункциональным органом. Он обеспечивает развитие (созревание,

селекцию, дифференцировку) тимусзависимых лимфоцитов (timoцитов), участвует в стимуляции роста организма, регуляции обмена веществ, играет роль в нуклеиновом, белковом, фосфорном обмене, в образовании костей и их минерализации, поддержании мышечного тонуса, оказывает влияние на развитие эндокринных органов, стимулирует образование коллагена, регулирует грануло-, эритропоз и синтез гепарина (Xu X, Ge Q., 2014). Тимус покрыт соединительнотканной капсулой, от которой отходят соединительнотканые перегородки, содержащие сосуды и разделяющие паренхиму тимуса на дольки. Каждая долька состоит из коркового и мозгового вещества (рис. 2).

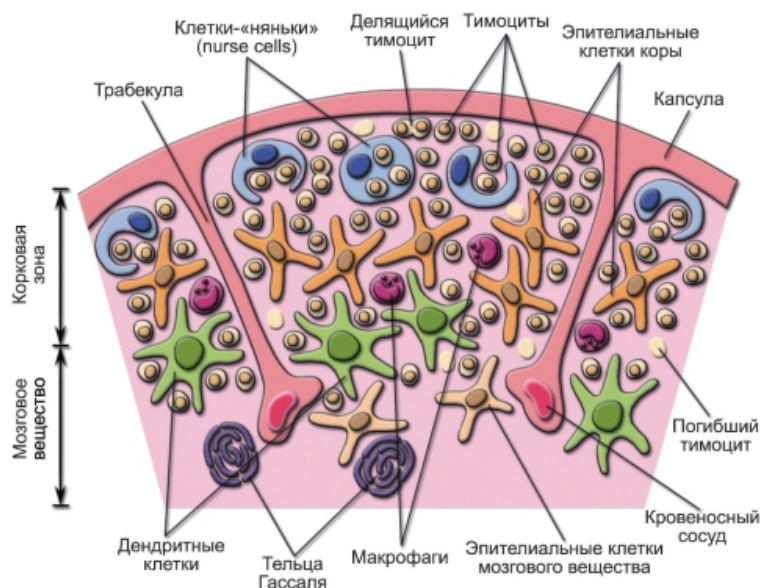


Рис. 2. Структурная организация тимуса

В корковом веществе выделяют наружный, субкапсулярный слой, глубокую кору и кортикомедуллярную зону (или кортикомедуллярное сочленение). Соединительная ткань септ распространяется только до кортикомедуллярной границы долек, мозговая часть тимуса не разделена на дольки. Кортикомедуллярное сочленение соответствует воротам тимуса, в которые входят и выходят кровеносные сосуды и нервы и выходят лимфатические сосуды (Kendall M., 1990). Наиболее важны в функциональном отношении посткапиллярные венулы, через стенку которых

в тимус проникают клетки-предшественники и выходят зрелые Т-лимфоциты (Рабсон А. и соавт., 2006).

Тимус является лимфоэпителиальным органом, который образован соединительнотканной стромой, эпителиальными и лимфоидными клетками. Эпителиальные и большая часть соединительнотканых элементов тимуса имеют местное происхождение. Лимфоциты тимуса (тимоциты), а также макрофаги, дендритные и тучные клетки происходят из клеток-предшественников, мигрирующих в этот орган из костного мозга (Rosai J., 2004).

Доля соединительной ткани в тимусе невелика. Соединительнотканная строма формирует не только капсулу и междольковые перегородки, но и периваскулярные пространства. В последних содержатся фибробласты, соединительнотканые волокна, макрофаги, тучные клетки, В-лимфоциты, нейтрофилы (Rosai J., 2004).

Паренхима тимуса представлена трехмерной сетью эпителиальных клеток, отростки которых связаны между собой десмосомальными контактами, образуя синцитиоподобную структуру. Показано, что инъекция красителя procion yellow (активный золотисто-желтый) в несколько эпителиальных клеток приводит к быстрому окрашиванию всей сети эпителия коры тимуса (Kendall M., 1990). Эпителиальные клетки субкапсулярного, глубокого коркового и мозгового веществ тимуса имеют схожую звездчатую форму, но отличаются по функциональному состоянию и на ультраструктурном уровне – светлые и темные клетки, соответственно, экто- и эндодермального происхождения (Kristin H., 1989). Выделяют секреторные (являются источником тимических гормонов) и поддерживающие эпителиальные клетки тимуса (Abramson J., Anderson G., 2017). Однако все эпителиальные клетки тимуса способны выполнять обе функции, и преобладание той или другой зависит от её микроокружения. Функции тимуса реализуются в форме контактных взаимодействий эпителиальных клеток, в основе которых лежит взаимное распознавание

лигандов и рецепторов дифференцировочных факторов семейства Notch (Shah D.K., Zúñiga-Pflücker J.C., 2014). Помимо этого, межклеточная адгезия, в частности, контакты эпителиальных и лимфоидных клеток тимуса обеспечивается молекулой CD2. У человека она присутствует на поверхности практически всех зрелых Т-лимфоцитов и NK-клеток, а у мышей CD2 экспрессируется также на В-лимфоцитах (Li J. et al., 1998). Контррецептором CD-2 на поверхности различных клеток человека – стромальных, макрофагов, лимфоцитов, клеток эпителия и т.д., служит белок LFA-3 (CD58), заякоренный в мембране с помощью фосфатидил-инозитола (Seed B. et al., 1987). Также на поверхности эпителиальных клеток есть рецепторы β 1-интегрина – ICAM-1 и β 2-интегрина – VCAM-1, взаимодействующие с интегринами β 1 – LFA-1 и β 2 – VLA-4 (Very late antigen-4) и VLA-6 на поверхности тимоцитов (Murphy K., 2012). Прочные контакты между эпителиальными и лимфоидными клетками важны для передачи ростовых и дифференцировочных сигналов, осуществления селекции. Кортикальные эпителиальные клетки отвечают за положительную, а медуллярные – за отрицательную селекцию, за счет экспрессии на их поверхности молекул МНС-I и МНС-II. Прямые доказательства роли стромы тимуса в селекции тимоцитов, распознающих собственные молекулы МНС, получены при работе с облученными мышами, которым с компенсаторной целью вводили клетки костного мозга от генетически идентичных доноров и опустошенную строму тимуса от генетически идентичных или отличающихся доноров. Для осуществления эффективной передачи сигнала в процессе селекции эпителиальные клетки мозгового вещества тимуса несут на своей поверхности костимулирующие молекулы CD40 и CD80 (B7-1), CD86 (B7-2). Последние две служат лигандами для гликопротеина CD28, который экспрессирован на Т-лимфоцитах и плазматических клетках и является членом суперсемейства иммуноглобулинов (Murphy K., 2012).

Среди светлых эпителиальных клеток, расположенных между поверхностными и глубокими слоями коры, выделяют особую группу –

«клетки-няньки», они наблюдаются в тимусе у мышей, крыс, человека, содержат тонофибриллы, по антигенному составу сходны с фагоцитами. Отростки «клеток-нянек» формируют с тимоцитами клеточные комплексы (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000). Показано, что одна «клетка-нянька» может окружать несколько сотен тимоцитов, изолируя их от других клеток. В работах прошлых лет полагали, что подобные взаимодействия необходимы для создания оптимального микроокружения, но после обнаружения апоптоза тимоцитов, принято считать, что «клетки-няньки» участвуют в элиминации тимоцитов (Ludger Klein L. et al., 2014).

В мозговом веществе тимуса расположены особые морфологические структуры, образованные эпителиальными клетками, – тимические тельца, отличающиеся по мембранным маркерам и гуморальным продуктам от других медуллярных клеток. *Тимические тельца у человека и некоторых животных* описаны как многослойные чешуйчатые скопления ретикулоэпителиальных клеток с отложениями кератогиалина в центре, напоминающие срез луковицы. *У мыши тимические тельца* в виде скопления эпителиальных клеток, как правило, без кератогиалина (Linden M. et al., 2012) Клетки тимических телец относятся к светлым, имеющим эктодермальное происхождение (Зайратьянц О.В., 1998). У человека образование тимических телец начинается с укрупнения светлой эпителиальной клетки, за счет накопления в ней тонофиламентов, затем на нее наслаиваются соседние эпителиальные клетки, в цитоплазме которых также увеличивается количество кератина, редуцируются органеллы, это послужило основанием считать тимические тельца участками ороговения эпителиальных клеток. Установлено, что эпителиальные клетки тимических телец секретируют цитокин – тимический стромальный лимфопоэтин (Thymic Stromal Lymphopoietin, TSLP), влияющий на дендритные клетки, базофилы, эозинофилы, тучные клетки, CD4, CD8 (корецепторы, представленные на мембране Т-лимфоцитов), натуральные киллеры, В-лимфоциты, эпителиальные клетки (Ziegler S.F. et al., 2013). Дендритные

клетки, активированные TSLP, играют ключевую роль в процессе дифференцировки регуляторных Т-клеток. Кроме того, они индуцируют дифференцировку аллергического варианта Th2-клеток, блокируют Th1/Th17 иммунный ответ, индуцируя развитие аутоиммунных заболеваний. Тимический стромальный лимфопоэтин регулирует JAK – тирозин-киназы, фосфорилирующие STAT-факторы, и как следствие, активирующие их (Park L.S. et al., 2000). Димеризуясь и проникая в ядро, STAT-факторы сами или с участием других белковых молекул индуцируют транскрипцию генов, ответственных за продукцию TSLP.

Функции эпителиальных клеток тимуса реализуются также через выделяемые ими гуморальные факторы, такие как цитокины и хемокины. В тимусе образуется IL-7, главный лимфопоэтический фактор, необходимый для поддержания гомеостаза популяции Т-лимфоцитов. IL-7 связывается с тирозинкиназами Jak1 и Jak3 своими субъединицами α и $\gamma(c)$ соответственно. В дальнейшей передаче сигнала участвуют факторы STAT5 и STAT1, индуцирующие антиапоптотический фактор Bcl-2. При мутациях генов IL-7 и его рецептора, развитие Т-лимфоцитов блокируется на стадии DN2 (дважды отрицательные CD4-CD8-). К другим функциям IL-7 относят: запуск перестройки гена γ -цепи TCR, усиление пролиферации зрелых Т-клеток и секреции IFN γ Т-лимфоцитами по принципу положительной обратной связи (Bazdar D.A., Sieg S.F., 2007). Провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , продуцируемые в тимусе, выполняют функцию дифференцировочных факторов, оказывая действие в комбинации друг с другом. Хемокины, синтезируемые эпителиальными клетками, определяют направление миграции тимоцитов внутри органа, о чем будет упомянуто ниже.

Наконец, эпителиальные клетки тимуса продуцируют многочисленные нейропептиды и пептидные гормоны. Эпителиальные клетки тимуса, происходящие из нервного гребня (маркер ганглиозид GQ) (Lee Y.H. et al., 2013), секретируют нейромедиаторы: соматостатин, окситоцин, вазопрессин, β -эндорфин, метэнкефалин. К пептидам и белкам, продуцируемым

исключительно в тимусе, относят $\alpha 1$ -, $\alpha 7$ -, $\beta 4$ -тимозины и их предшественник протимозин, тимулин (тимический сывороточный фактор), тимопоэтины, тимусный гуморальный фактор и тимический фактор X (Fenggen Y. et al., 2016). Гормоны тимуса вырабатываются и секретируются субкапсулярными и медуллярными эпителиальными клетками тимуса, причем тимулин, $\alpha 1$ -тимозин и тимопоэтин вырабатываются одними и теми же клетками тимического эпителия (Savino W. et al., 2016).

Тимозины, обнаруженные в эпителии тимуса, влияют на ранние и поздние этапы дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов (Т-хелперов и Т-супрессоров) и дендритных клеток. Тимулин синтезируется исключительно в тимусе и регулирует разные этапы дифференцировки Т-лимфоцитов, а именно индуцирует экспрессию маркеров зрелых Т-лимфоцитов, в частности, цитотоксических Т-лимфоцитов; усиливает экспрессию рецепторов для IL-2 и выработку IL-2 активированными Т-лимфоцитами. Основной путь секреции тимулина – Ca^{2+} -зависимый экзоцитоз, стимулируемый образованием комплекса с ионами Zn^{2+} . Тимопоэтин I влияет на дифференцировку пре-Т-лимфоцитов и нервно-мышечную проводимость, а тимопоэтин II индуцирует экспрессию маркеров зрелых Т-лимфоцитов. Ряд гормонов $\alpha 1$ -тимозин, тимулин и тимопоэтин усиливают активность естественных киллеров, стимулируют эффекты, опосредуемые макрофагами и В-лимфоцитами (Savino W. et al., 2016). К активным пептидам тимуса относят тимусный гуморальный фактор, представляющий собой комплекс пептидов тимуса и широко используемый при лечении опухолей и гепатита В.

В пространствах между эпителиальными клетками находятся клетки лимфоидного ряда на разных стадиях дифференцировки. Тимоциты численно преобладают, составляя до 90% всех клеток тимуса (Зайратьянц О.В., 1998), они являются транзиторной популяцией, так как подавляющее большинство их по мере созревания мигрирует из тимуса.

Незрелые тимоциты $CD4^+CD8^+CD3^-$, доля которых составляет 3-5% от общего числа Т-лимфоцитов, расположены в субкапсулярной зоне тимуса. Перемещение тимоцитов из кортикомедуллярной в субкапсулярную зону осуществляется по градиенту хемокина SDF-1 (CXCL12), на этом этапе дифференцировки на Т-лимфоцитах тимуса начинает экспрессироваться рецептор к этому хемокину – CXCR4. В субкапсулярной зоне тимуса происходит интенсивная пролиферация незрелых тимоцитов. Следующая стадия их развития – дифференцировка дважды отрицательных $CD4^+CD8^+$ клеток. Тимоциты перемещаются вглубь коры, в зону выработки хемокина ТЕСК (CCL17), к которому они экспрессируют рецептор CCR9 (C-C рецептор хемокина). В них происходит перестройка V-генов TCR, экспрессия мембранных рецепторов и формирование первичного (т.е. не прошедшего селекции) антигенраспознающего репертуара. Все этапы развития тимоцитов осуществляются в строго определенных зонах тимуса под влиянием эпителиальных клеток и их продуктов (Murphy K., 2012).

Клетки с мембранным фенотипом $CD4^+CD8^+$ ($CD4$ – одноцепочечная молекула, состоящая из четырех иммуноглобулинподобных доменов, $CD8$ – гетеродимер, каждая цепь которого включает один иммуноглобулинподобный домен и участок, связанный с мембраной) составляют 70–75% от общего числа Т-лимфоцитов, локализуются в коре и её более глубоких слоях. На этой стадии происходят оба этапа селекции – положительная и отрицательная. Положительная селекция осуществляется кортикальными эпителиальными клетками, если TCR на тимоците обладает сродством к молекуле МНС, тимоцит получает «поддерживающий» сигнал. Во всех случаях отбор на специфичность к молекулам МНС-I класса определяет сохранение $CD8$ и потерю $CD4$ корецептора. Напротив, тимоциты, прошедшие селекцию к молекулам МНС-II класса, экспрессируют $CD4$, а синтез рецепторов $CD8$ у них подавляется. В результате формируется вторичный (селекционированный) антигенраспознающий репертуар, обеспечивающий распознавание пептидов в составе молекул МНС, и

усиление экспрессии антиапоптотических факторов, за счет сигналов от эпителиальных клеток. Коррелятивная связь корецепторов со специфичностью Т-рецепторов показана на экспериментальных моделях – трансгенных и мутантных мышах. Так, мутантные мыши, у которых отсутствуют молекулы МНС-II класса, не способны образовывать CD4-лимфоциты. Введение таким мышам трансгена, кодирующего синтез молекул МНС-II класса, полностью восстанавливает формирование CD4-лимфоцитов. Прошедшие положительную селекцию Т-лимфоциты мигрируют в кортикомедуллярную зону, где под действием хемокина CCR7, они проходят отрицательную селекцию, осуществляемую дендритными и эпителиальными клетками. Клетки, обладающие высоким сродством к комплексу МНС, элиминируются. Во время селекции тимоцитов более 90% клеток гибнет в тимусе, в том числе и из-за слабой экспрессии антиапоптотических факторов, и только незначительная их часть, прошедшая отбор, способна к дальнейшему созреванию и миграции (Murphy K., 2012).

В мозговом веществе тимуса сосредоточены зрелые тимоциты, экспрессирующие рецептор CCR7, необходимый для их миграции, и один из двух корецепторов CD4 или CD8. $CD4^+CD8^-$ Т-хелперы, составляют около 10%, из них 2–3% – регуляторные $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоциты (Murphy K., 2012).

Регуляторные Т-лимфоциты экспрессируют транскрипционный фактор FOXP3, благодаря которому они устойчивы к апоптозу во время селекции (Hori S. et al., 2003), в результате выживают даже клетки, распознающие аутологичный пептид с высокой степенью сродства. Известно, что цитокин–независимая супрессорная активность $CD4^+$ регуляторных Т-лимфоцитов связана именно с FOXP3 (Klein L., Kyewski B. et al., 2016). $CD4^+CD25^+$ Т-клетки, экспрессирующие FOXP3, подавляют пролиферацию аутологичных $CD4^+CD25^-$ Т-клеток и предотвращают развитие аутоиммунных заболеваний (DiPaolo R.J. et al., 2005). Мутации гена FOXP3 сопровождаются утратой регуляторными Т-клетками супрессорной активности (Bennett C.L. et al.,

2001). Показано, что при сокультивировании $CD4^+CD25^+$ и $CD4^+CD25^-$ Т-клеток супрессируется активность эффекторных Т-клеток, что характеризуется подавлением пролиферации и продукции цитокинов как Th1 – IFN- γ , IL-2, так и Th2 – IL-4, IL-10; IL-13 (Annunziato F., 2002; Sakaguchi S., 2005). На настоящий момент известны две субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов, естественные (дифференцируются в тимусе под действием тимического стромального лимфопоэтина) и индуцированные (дифференцируются на периферии) (рис. 3). Регуляторные Т-лимфоциты мигрируют в Т-клеточные зоны лимфатических узлов и иногда присутствуют в лимфоидных фолликулах (Yu T.Q. et al., 2007).

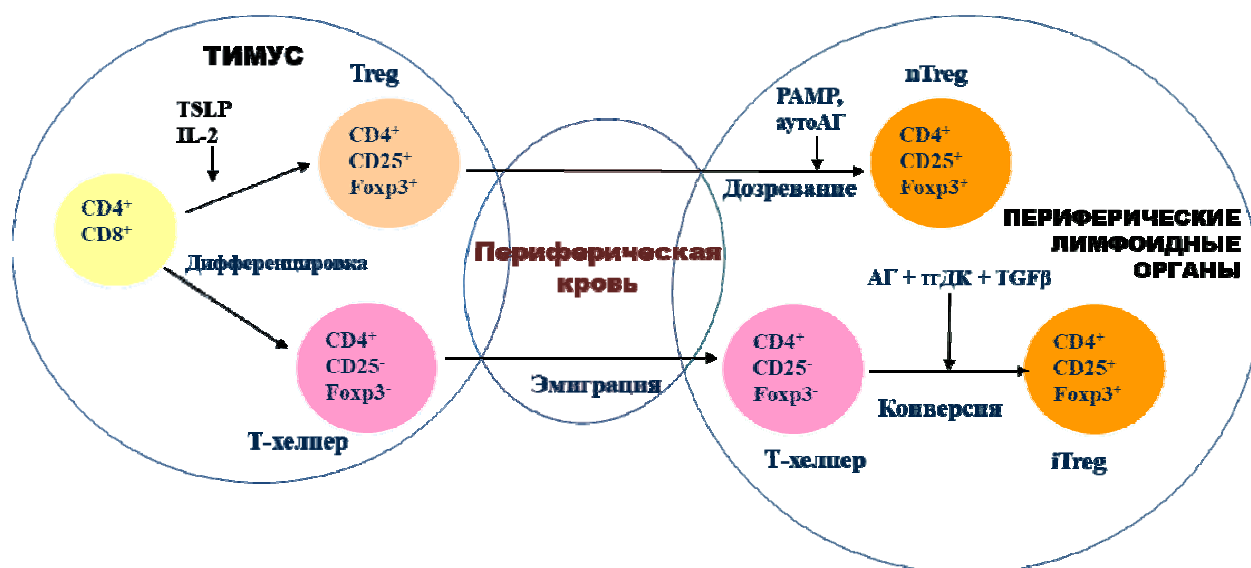


Рис. 3. Дифференцировка натуральных и индуцированных регуляторных Т-лимфоцитов

На долю $CD4^+CD8^+$ – цитотоксических Т-лимфоцитов приходится около 5% лимфоидных клеток тимуса. Для всех зрелых тимоцитов показана экспрессия рецепторов TCR–CD3. Медуллярные тимоциты содержат Т-рецепторные эксцизионные кольца (TRECs), образующиеся в процессе реаранжировки V-генов в результате замыкания в кольцо участков ДНК, «вырезаемых» из зародышевых V-генов. Наличие эксцизионных колец свидетельствует о недавней миграции Т-лимфоцитов из тимуса, через

посткапиллярные вены. Эндотелиальные клетки венул, через которые осуществляется эмиграция, секретируют хемокин ELC (CCL19), распознаваемый рецептором CCR7. Для миграции зрелых Т-лимфоцитов также необходим рецептор для сфингозина, обеспечивающий эмиграцию тимоцитов в ответ на сигнал сфингозин-1-фосфата. Не все тимоциты покидают тимус, некоторые остаются и служат источником продукции цитокинов, необходимых для формирования полноценного микроокружения этого органа (Murphy K., 2012).

Помимо лимфоцитов в эпителиальном каркасе кортикомедуллярной зоны содержатся макрофаги, а в мозговом веществе — еще и дендритные клетки, В-лимфоциты, тучные клетки, миоидные клетки, обеспечивающие специализированные функции органа. Большинство дендритных клеток тимуса дифференцируется в нем из предшественников, общих для них и тимоцитов, но присутствуют и нетимусные дендритные клетки. Миелоидные дендритные клетки участвуют в отрицательной селекции, о чем говорилось выше, а также в формировании аутоотолерантности. Плазмацитоидные дендритные клетки секретируют IFN γ . Миоидные клетки содержат десминовые филаменты, экспрессируют миоглобин, тропонин, распин, синаптофизин. На их поверхности присутствуют рецепторы для ацетилхолина. Миоидные клетки локализуются, главным образом в окружении тимических телец (Беловешкин А.Г., Студеникина Т.М., 2011).

Важной особенностью тимуса является его возрастная инволюция, заключающаяся в уменьшении с возрастом массы и объема паренхимы органа, замещении ее жировой тканью, снижении продукции гормонов (Otto H., 1984). Считается, что объем и масса истинной паренхимы органа увеличивается в первые месяцы после рождения, а затем прогрессивно снижается уже с первого года жизни до 40-летнего возраста, после скорость инволюции замедляется (Зайратьянц О.В., 1998). Показано, что общий объем кровеносных сосудов не изменяется на протяжении жизни и кровоснабжение органа остается стабильным (Шумейко Н.С., 1979).

Патологический стресс, сопровождающий развитие острых и хронических воспалительных процессов с выраженными системными проявлениями, приводит, как известно, к инволюции лимфоидной ткани и иммунодепрессии (Зайратьянц О.В., 1998; Kubera M. et al., 1998; Berthelot J.M. et al., 2010 и др.).

Гипоталамо-гипофизарно-адреналовая ось и симпатическая нервная система являются центральными и периферическими отделами стресс-системы соответственно (Elenkov I.J. et al., 2000). Их активация осуществляется центральной нервной системой в ответ на поступление афферентных стимулов из окружающей среды. Гормоны стресса – глюкокортикоиды и адреналин влияют на многочисленные физиологические процессы, в том числе они модулируют иммунологические реакции через изменение баланса клеточного (Th1) и гуморального (Th2) типа иммунитета. Глюкокортикоиды подавляют клеточное звено иммунитета через систему цитокинов, они супрессируют продукцию клетками животных и человека $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-12 (Elenkov I.J., 2004). Известно, что IL-12 поляризует иммунный ответ по Th1 типу, усиливая продукцию $\text{IFN}\gamma$ и ингибируя образование IL-4. Следовательно, снижая продукцию IL-12 антигенпрезентирующими клетками и экспрессию рецепторов к IL-12 на Т-лимфоцитах и NK клетках, глюкокортикоиды поляризуют иммунный ответ по Th2 типу (Elenkov I.J., 2004). Катехоламины также поляризуют иммунный ответ по Th2 типу, за счет ингибирования синтеза провоспалительных $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-12 и стимуляции синтеза противовоспалительных $\text{TGF}\beta$, IL-10 цитокинов (Batistaki C. et al., 2008).

Таким образом, при стрессе в организме активируются функции желез внутренней секреции и эффекты гормонов реализуются на разных уровнях, начиная от центральных отделов нервной системы и заканчивая клетками-мишенями органов иммунной системы.

Стереотипный ответ тимуса на различные стрессорные воздействия (эмоциональный, болевой, информационный, мобилизационный,

гипоксический стресс) морфологически характеризуется акцидентальной инволюцией (Зайратьянц О.В., 1998) с прогрессирующим снижением массы, объема и функциональной активности тимуса. Акцидентальная инволюция развивается как проявление адаптационного синдрома (Селье Г., 1960). Согласно теории адаптационного синдрома при любом стрессовом состоянии в организме возникает стереотипный трехфазный ответ, направленный на регулирование гомеостаза. Первая фаза обозначается как фаза тревоги, сопровождается альтеративными процессами, вторая – фаза резистентности и третья – фаза истощения (Селье Г., 1960).

Выделяют следующие стадии акцидентальной инволюции (по Зайратьянцу). В I фазу акцидентальной инволюции тимуса происходит усиленная миграция из костного мозга предшественников Т-лимфоцитов и пролиферация лимфобластов в субкапсулярной зоне, что приводит к увеличению массы органа. Началом обширных инволютивных процессов принято считать II фазу, которая характеризуется картиной «звездного неба» в корковом веществе, в результате увеличения в коре количества гибнущих тимоцитов и макрофагов, фагоцитирующих их. В III фазу наблюдается нарастающая гибель тимоцитов коркового вещества. Для этой фазы характерна инверсия слоев тимических долек и инволютивные изменения со стороны тимических телец. Количество их увеличивается, тимические тельца располагаются не только в мозговом веществе, но и в коре. Появляются тимические тельца поздних фаз развития (с кератогиалином, кистоподобные тимические тельца). Формирование тимических телец, очевидно, является физиологическим процессом завершения функционирования эпителия тимуса. В IV фазе продолжающийся процесс гибели тимоцитов приводит к опустошению не только коркового, но и мозгового вещества. Тимические дольки принимают вид однородных образований, состоящих из ретикулоэпителиальных клеток. Сохраняются лишь кортизон-чувствительные лимфоциты. В V фазе корковое и мозговое вещество фиброзируется. От тимических долек остаются узкие тяжи клеточных

скоплений с включенными в них тимическими тельцами, иногда частично или полностью обызвествленными. Капсула и крупные сосуды склерозированы. Среди стромы часто выявляются островки жировой ткани. В зарубежной литературе описаны гиперплазия тимуса, острая и хроническая инволюции (Mizuno Y., 1976; Kato Y. et al., 1995; Douek D.C. et. al., 1998; Gill J. et al., 2003; Wang D. et al., 2006; Sasaki S. et. al., 2008; Meunier M. et al., 2013).

Следует заметить, что акцидентальная инволюция тимуса – это сложный и еще не в полной мере изученный процесс. Степень акцидентальной инволюции тимуса зависит от тяжести и локализации патологического процесса, а также исходного генофенотипически обусловленного функционального состояния иммунной системы. Кроме того, морфологические изменения не соотнесены с субпопуляционным составом лимфоцитов и нелимфоидных клеток тимуса.

1.1.2. Морфофункциональная характеристика периферических органов иммунной системы

Периферический отдел иммунной системы включает специализированные лимфоидные органы, такие как лимфатические узлы, которые собирают лимфу из различных органов и тканей; селезенку, под контролем которой находятся гематогенные пути распределения чужеродных агентов; лимфоидные структуры барьерных тканей – слизистых оболочек и кожи, через которые в организм проникает основная масса патогенов. Периферические (вторичные) лимфоидные органы в основном формируются в эмбриогенезе, тогда как лимфоидные образования слизистых оболочек могут появляться в постнатальном периоде, в частности в кишечнике, под влиянием микрофлоры (Ярилин А.А., 2010).

Морфофункциональная характеристика лимфатических узлов

Все лимфатические узлы располагаются по ходу лимфатических сосудов. Они дренируют лимфу, поступающую из различных регионов тела. Лимфатические узлы имеют бобовидную форму, образуют группы или цепочки. К выпуклой поверхности подходят приносящие лимфатические сосуды, на вогнутой стороне в области ворот входят артерии и нервы и выходят выносящие лимфатические сосуды и вены (рис. 4). Соответственно лимфоток направлен из краевого в промежуточный и затем в мозговые синусы. Лимфатический узел покрыт соединительнотканной капсулой, от которой внутрь отходят тонкие трабекулы. Строма образована сетью ретикулярных клеток, коллагеновых, ретикулярных волокон, макрофагами, антиген-презентирующими клетками, лимфоцитами. Паренхима лимфатического узла состоит из коркового и мозгового вещества. Корковое вещество состоит из наружной коры, включающей лимфоидные фолликулы (В-зависимую зону), межфолликулярные скопления, и располагающейся под ней Т-зависимой паракортикальной зоны (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000; Rosai J., 2004).

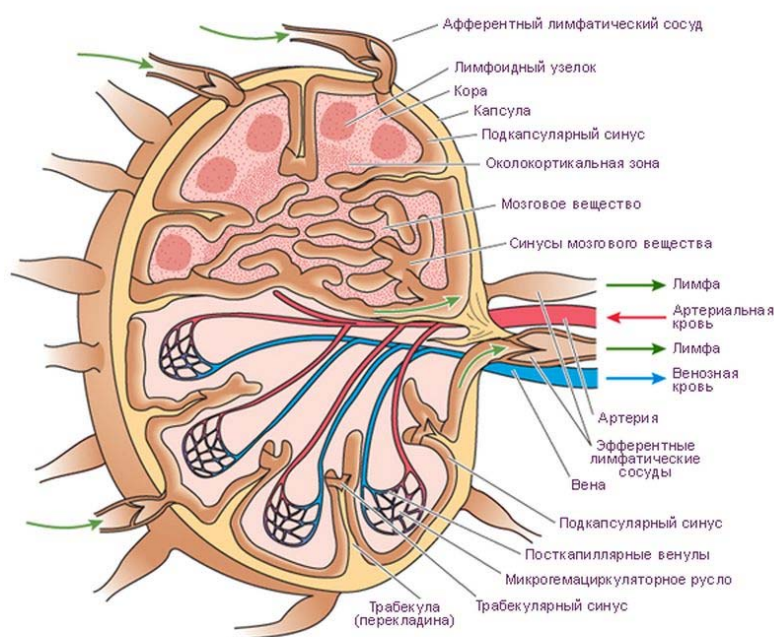


Рис. 4. Структурная организация лимфатического узла

Между капсулой и наружной корой располагается краевой лимфатический синус, являющийся первым фильтрационным барьером для лимфы. Краевой синус выстлан плоскими клетками, лишенными базальной мембраны, по мнению одних исследователей эндотелиальными, других – уплощенными ретикулярными клетками. В просвете синуса располагаются ретикулярные клетки и волокна, макрофаги, лимфоциты и плазматические клетки (Delves P.J., Roitt I.M., 2000).

В наружной коре лимфатических узлов в отсутствие антигенных воздействий лимфоидные фолликулы – первичные, представлены однородным скоплением В-лимфоцитов рециркулирующего пула, ретикулярными клетками, фолликулярными дендритными клетками (имеют мезенхимальное происхождение), небольшим количеством макрофагов и Т-лимфоцитов (Liu Y.J. et al., 1991). При иммунном ответе, под влиянием антигенной стимуляции, формируются герминативные центры, в которых при участии фолликулярных дендритных клеток происходит пролиферация, дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки и В-лимфоциты памяти (Liu Y.J. et al., 1991). Пролиферация в герминативных центрах всегда свидетельствует о реализации реакций гуморального иммунитета, сопровождающихся продукцией антител (Вылков И.Н., 1980). В-клетки, не способные взаимодействовать с фолликулярными и дендритными клетками, подвергаются апоптозу и захватываются макрофагами. В-лимфоциты памяти, незрелые плазматические клетки – рециркулирующие, они мигрируют из герминативного (вторичного) центра в зону короны на периферии фолликула. Благодаря контактам фолликулярных дендритных клеток с В-лимфоцитами поддерживается способность первых к выработке хемокинов и факторов выживания В-лимфоцитов.

Пространство между фолликулами и вне паракортикальных зон – межфолликулярная зона, представлено Т-, В-лимфоцитами и макрофагами, взаимодействующими между собой.

Паракортикальная зона или глубокая кора – Т-зависимая зона лимфатического узла, в которой реализуются реакции Т-клеточного звена иммунного ответа. Паракортикальная зона образована ретикулярной тканью и мигрирующими в неё Т-лимфоцитами, дендритными клетками (происходят из костного мозга), здесь также встречаются плазматические клетки (Delves P.J., Roitt I.M., 2000). Хемокины CCL19 и CCL21, секретируемые клетками стромы, привлекают в паракортикальную зону Т-лимфоциты, экспрессирующие на своей поверхности рецептор CCR7. В отсутствие тимуса паракортикальная зона не формируется (Ярилин А.А., 2010). Жизнеспособность мигрировавших из тимуса Т-лимфоцитов опосредована IL-7. Дендритные клетки паракортикальной зоны называют интердигитальными (межпальцевыми) клетками, они имеют цитоплазматические отростки. TCR Т-лимфоцитов распознают на поверхности интердигитальных дендритных клеток молекулы МНС, несущие аутологичные пептиды, что повышает выживаемость наивных Т-лимфоцитов, или чужеродные пептиды, что способствует активации Т-лимфоцитов. В паракортикальной зоне между трабекулами и лимфоидными структурами располагаются промежуточные лимфатические синусы и посткапиллярные венулы, через которые в ткань лимфатического узла из кровотока мигрируют лимфоциты. В процессе миграции высокий эндотелий посткапиллярных венул взаимодействует с хоминг-рецепторами Т- и В-лимфоцитов.

Мозговое вещество лимфатических узлов располагается в зоне ворот и представлено Т- и В-лимфоцитами, соединительнотканными трабекулами, мозговыми лимфатическими синусами, артериями и венами (Rosai J., 2004). Из мозговых синусов, являющихся продолжением промежуточных, лимфа оттекает по эфферентным сосудам в грудной и правый лимфатический протоки. Мозговое вещество, как и наружная кора, являются В-зоной, ассоциированной с гуморальным иммунным ответом (Stein H. et al., 1989).

Лимфоциты пребывают в лимфатических узлах временно, они постоянно рециркулируют. Формирование Т- и В-зон лимфатических узлов определяется взаимодействием лимфоидных и стромальных клеток под влиянием лимфотоксина β – мембранного цитокина семейства TNF и его рецепторов. У мышей, дефектных по генам лимфотоксинов или их рецепторов, не развиваются фолликулярные дендритные клетки, не формируются лимфоидные фолликулы, в ряде случаев не образуются лимфатические узлы (Ярилин А.А., 2010).

Структура и функции *лимфатических узлов у мыши и человека* сходны. Однако лимфатические узлы у молодых мышей не имеют развитых герминативных центров, в то время как у человека они хорошо различимы в любом возрасте. Лимфатические узлы мыши по сравнению с узлами человека малы (1-4 мм), поэтому при их гистологическом исследовании показатели структурно-функциональных зон сильно варьируют в зависимости от плоскости сечения (Linden M. et al., 2012).

Воспаление лимфатических узлов – лимфаденит, наблюдающееся при острых и хронических воспалительных процессах, возникает при неконтролируемом поступлении в них инородных частиц, продуктов тканевого распада или микрофлоры. В зависимости от возбудителя и характера развивающегося воспаления выделяют простой, или катаральный, гнойный, геморрагический, гиперпластический лимфаденит. По длительности течения заболевания различают острый и хронический лимфаденит. Микроскопически начальная стадия воспалительного процесса сопровождается расширением синусов за счет аккумуляции нейтрофилов, макрофагов и отека. При хроническом течении заболевания наблюдаются фиброз, воспалительная инфильтрация макрофагами и нейтрофилами, фолликулярная гиперплазия, характеризующаяся увеличением диаметра лимфоидных фолликулов, расширением светлых центров в них, а также увеличением количества плазматических клеток и макрофагов (Rosai J., 2004).

Морфофункциональная характеристика селезенки

Селезенка самый крупный периферический орган иммунной системы. Её лимфатическая система принципиально отличается от лимфатических узлов многообразием выполняемых ею функций. Селезенка находится в тесной связи с кроветворением, участвует в удалении разрушающихся эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, депонирует кровь и тромбоциты, регулирует объем циркулирующей крови (Барта И., 1976). Иммунологическая функция селезенки заключается в детекции и процессинге антигенов, миграции, дифференцировке и пролиферации лимфоцитов, а также продукции ими антител (Rosai J., 2004). В ней больше, чем в других органах, вырабатывается плазматическими клетками иммуноглобулинов М и G (Барта И., 1976). При спленэктомии содержание плазмоцитов резко снижается в слизистых оболочках барьерных органов, что в некоторых случаях приводит к возникновению сепсиса (Trigg M.E., 1979). В конце 70-х годов прошлого века установлено, что в селезенке среди лимфоцитов определяется наибольшее количество Т-супрессоров (Trigg M.E., 1979). Таким образом, селезенка участвует в формировании как гуморального, так и клеточного иммунитета.

Многообразным функциям селезенки соответствует ее сложная морфологическая организация (рис. 5). Селезенка покрыта фиброзной капсулой, содержащей гладкомышечные клетки, от которой отходят трабекулы (анастомозирующие друг с другом) несущие артерии (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000). Приток лимфы через афферентные сосуды отсутствует. Через ворота из органа выходят вены (Барта И., 1976). Паренхима органа образована белой и красной пульпой.

Основу селезенки составляет красная пульпа у человека до 75% от объема органа, обеспечивающая депонирование зрелых форменных элементов крови, элиминирование старых и поврежденных эритроцитов и тромбоцитов, фагоцитоз инородных частиц, окончательное созревание

лимфоидных клеток, превращение моноцитов в макрофаги (Rosai J., 2004). Красную пульпу делят на синусоиды (тонкостенные анастомозирующие сосуды диаметром 12-50 мкм, выстланные эндотелиальными клетками веретеновидной формы) и губчатые образования, состоящие из макрофагов, мегакариоцитов, лимфоцитов, плазматических клеток и NK-клеток. В красной пульпе среди Т- и В-лимфоцитов преобладают эффекторные Т-лимфоциты и В-клетки памяти (Ueno H., Banchereau J., Vinuesa C.G., 2015).

Белая пульпа выполняет функции вторичного лимфоидного органа – улавливание из крови антигенов, взаимодействие лимфоцитов с антигенами, антиген-презентирующими клетками и друг с другом, а также начальный этап антиген-зависимой пролиферации и дифференцировки (Rosai J., 2004). Ткань белой пульпы состоит из Т- и В-лимфоцитов и образована лимфоидными узелками и периартериальными лимфоидными муфтами (ПАЛМ-зона), окружающими все пульпарные артерии. Клеточные элементы стромы белой пульпы представлены ретикулярными клетками, лейкоцитами, макрофагами (Krieken J.H., Velde J., 1986).



Рис. 5 Структурная организация селезенки

Периартериальные лимфоидные муфты (Т-зависимая зона), concentрически окружающие пульпарные артерии, являются аналогами

паракортикальной зоны лимфатических узлов (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000). Клеточный состав лимфоидной ткани селезенки человека исследован Е.Ф. Амбарцумян (1991). Согласно данным автора, наиболее распространенными клетками белой пульпы являются малые и средние лимфоциты, с возрастом наблюдается увеличение процентного содержания малых и уменьшение числа средних лимфоцитов. Наиболее стабильными по числу клеточных элементов белой пульпы являются ретикулоциты, макрофаги, лимфобласты (Сапин М.Р., Никитюк Д.Б., 2000).

Лимфатические фолликулы (В-зависимые зоны) располагаются по периферии ПАЛМ-зоны и они идентичны аналогичным структурам в наружной коре лимфатических узлов и других образований периферической лимфоидной ткани (Rosai J., 2004).

Периферический отдел белой пульпы, граничащий с красной пульпой, занят маргинальной зоной, куда открываются капилляры, отходящие от центральной артериолы. В ней содержатся В-лимфоциты, в основном В-клетки маргинальной зоны – MZB (Marginal zone B cells), а также ретикулярные клетки и макрофаги. Маргинальная зона служит местом поступления в белую пульпу Т- и В-лимфоцитов и антигенов, которые затем захватываются макрофагами (Papenfuss T.L., Cesta M.F., 2017).

I. Barta (1976) отмечает, что *селезенка человека и животных* имеет существенные отличия, поэтому сведения о функциях селезенки животных нельзя экстраполировать на человека. Так кроветворение в селезенке человека, в условиях патологии, – экстрамедуллярное, у половозрелых мышей в красной пульпе микроскопически видимы очаги кроветворения. В белой пульпе в периартериальных лимфоидных муфтах преобладают CD4⁺ Т-лимфоциты, связанные с дендритными клетками, а в лимфоидных фолликулах, как в первичных, так и во вторичных – В-лимфоциты. Структура лимфоидных фолликулов у этих обоих видов млекопитающих аналогична. Маргинальная зона лимфоидных фолликулов селезенки мыши

отличается от таковой у человека тем, что у человека она шире, а у мыши еще содержит маргинальные синусы (Linden M. et al., 2012).

Реактивные изменения селезенки у человека сопровождаются многими инфекционными и вирусными заболеваниями, протекающими с системными проявлениями воспаления – сепсис, пневмония, перитонит и другие. В первые часы после начала воспалительного заболевания масса селезенки уменьшается, как предполагают из-за выброса депонированной в ней крови, наблюдается повышение активности кислой фосфатазы в макрофагах красной пульпы и увеличение числа мегакариоцитов. Затем выявляется гиперплазия белой пульпы. Реактивная фолликулярная гиперплазия – увеличение размеров лимфоидных фолликулов и их герминативных центров. Морфологически подобные реактивные изменения ассоциированы с пролиферацией лимфобластов и дифференцировкой плазматических клеток, а также с воспалительной инфильтрацией красной пульпы нейтрофилами (Rosai J., 2004).

1.1.3. Морфофункциональная характеристика иммунной системы толстой кишки

Иммунная система толстой кишки является одним из компартментов лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT – Mucosa Associated Lymphoid Tissue). Компартменты MALT относительно автономны (Faria A.M., Weiner H.L., 1999) и включают лимфоэпителиальное глоточное кольцо Пирогова-Вальдейера; лимфоидную ткань, ассоциированную с кишечником (GALT – Gut-Associated Lymphoid Tissue); с бронхами (BALT – Bronchus-Associated Lymphoid Tissue); носом (NALT – Nasal-Associated Lymphoid Tissue); глазами (CALT – Conjunctival-Associated Lymphoid Tissue); выводные протоки молочных, слюнных желез; желчевыводящие пути; мочеполовую систему (O-MALT – Organized Mucosa-Associated Lymphatic Tissue) (Liang H. et al., 2012). К основным функциям иммунной системы слизистых оболочек пищеварительной системы относят

индукцию толерантности к комменсальной микрофлоре и пищевым антигенам; а также иммунный ответ на эти антигены (Powrie F., 2004). В постнатальном периоде взаимодействие комменсальной микрофлоры с иммунной системой барьерных органов и другими антигенами во многом определяет её развитие (Wannemuehler M.J. et al. 1982).

По сравнению с другими барьерными органами в толстой кишке присутствует наибольшее количество микроорганизмов и пищевых антигенов, к которым в физиологических условиях иммунная система толерантна (Kruglov A.A. et al., 2013). Иммунная система толстой кишки представлена разными структурными компартментами: межэпителиальными лимфоцитами, локализованными в эпителиальном пласте, диффузно рассеянными лимфоцитами и макрофагами в собственной пластинке слизистой оболочки, солитарными и агрегированными лимфоидными узелками и брыжеечными лимфатическими узлами (Izcue A. et al. 2006).

Эпителиальный барьер толстой кишки представлен слизью, эпителиальными клетками и межэпителиальными лимфоцитами. Эпителий слизистой оболочки толстой кишки однослойный призматический, в его состав входят каемчатые эпителиоциты; бокаловидные экзокриноциты; эндокриноциты (преимущественно ЕС- клетки, секретирующие субстанцию Р), клетки Панета у человека (у мыши они отсутствуют); М-клетки – захват и презентация антигенов, каемчатые всасывающие колоноциты и камбиальные недифференцированные клетки. Эпителиальные клетки полностью обновляются за 5-7 суток (Trasher J.D., Greulich R.C., 1966).

В отсутствие патогенов эпителиальный слой толстой кишки является избирательно проницаемым барьером. Важнейший элемент эпителиального барьера – плотные контакты (Tight/occluding junctions), которые в виде пояса полностью окружают апикальную часть каждой клетки. Интегральными мембранными белками плотных контактов являются окклюдины, клаудины (Furuse M. 2010). В цитоплазме эпителиальных клеток, в зоне плотных контактов обнаруживаются белки, ассоциированные с цитоскелетом, это

зингулин, 7Н6 антиген, PAR3/PAR6 (суперсемейство интегральных мембранных рецепторов, сопряженных с G-белками), необходимые для установления полярности клеток и эпителиального морфогенеза (Matter K., Balda M.S., 2014). Наиболее изучен белок цитоплазматической пластинки – ZO-1, который имеет несколько доменов белок-белкового взаимодействия, каждый из которых связан системой плотных контактов, так PDZ-домены необходимы для связи с клаудинами и адаптерными белками ZO-2 и ZO-3, GUK-домен (Guanylate Kinase Homology) для взаимодействия с окклюдинами, а SH3-домен — с сигнальными белками (Furuse M. 2010). Функционирование плотных контактов регулируется белками Ras – малыми ГТФазами, участвующими в передаче сигнала (Matter K., Balda M.S., 2014).

Эндотелиальные клетки сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки экспрессируют МНС II и, соответственно, поглощают, процессируют в эндосомальном компартменте растворимые антигены, а затем представляют их Т-лимфоцитам собственной пластинки слизистой оболочки и межэпителиальным лимфоцитам (Haraldsen G. et. al., 1998).

Межэпителиальные лимфоциты располагаются ближе к базальной мембране, в основном представлены $TCR\gamma\delta$ Т-клетками (60%). Межэпителиальные лимфоциты – активированные, не рециркулирующие клетки, экспрессирующие цитотоксические молекулы и продуцирующие цитокины $IFN\gamma$, IL-2, IL-4, IL-17, CD103 (αE интегрин, взаимодействует с Е-кадгерином на эпителиальных клетках), CD8 $\alpha\alpha$ (лиганд для CD8 $\alpha\alpha$, TLA (Thymus Leukemia Antigen) – неклассическая МНСI молекула экспрессируемая эпителиальными клетками). Межэпителиальные лимфоциты развиваются в тимусе из клеток предшественников, отрицательных по трем маркерам $CD4^-CD8\alpha\beta^-CD8\alpha\alpha^-$, которые по мере созревания становятся дважды положительными $CD4^+CD8\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$ лимфоцитами, которые, в свою очередь, дифференцируются в индуцированные, а из субпопуляции $CD4^+CD8\alpha\beta^+CD8\alpha\alpha^+$ – натуральные межэпителиальные лимфоциты (Leishman A.J. et al., 2002).

Таким образом, среди популяций межэпителиальных лимфоцитов выделяют натуральные и индуцированные (Cheroutre H. et al., 2012). Натуральные лимфоциты активируются в тимусе в присутствии аутоантигенов. Эта субпопуляция выявляется в слизистой оболочке кишки у новорожденных и их количество снижается с возрастом. Иммунофенотипически натуральные лимфоциты представлены $TCR\alpha\beta^+$ или $TCR\gamma\delta^+$, как $CD8\alpha\alpha^+$, так и $CD8\alpha\alpha^-$, но они не экспрессируют CD4 или $CD8\alpha\beta$ и LFA1 (интегрин $\alpha L\beta 2$; англ. Lymphocyte Function-Associated Antigen 1), CD2 (Т-клеточный поверхностный антиген T11/Leu-5, LFA-2, рецептор к LFA-3), CD5 (рецептор, экспрессирован на поверхности Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов подгруппы В-1а), CD90 (антиген тимоцитов, маркер для стволовых клеток и для растущих аксонов зрелых нейронов) (Gangadharan D. et al., 2006; Jensen K.D., et al. 2008). Индуцированные межэпителиальные лимфоциты – Т лимфоциты, активированные в процессе развития в тимусе в ответ на периферические антигены (Carpenter A.C., Bosselut R. 2010). Они отсутствуют при рождении, показано повышение их количества с возрастом. Индуцированные межэпителиальные лимфоциты представлены $TCR\alpha\beta^+$, как $CD8\alpha\alpha^+$ так и $CD8\alpha\alpha^-$, экспрессируют CD4 или $CD8\alpha\beta$, а также экспрессируют LFA1, CD2, CD5, CD90 (Gangadharan D. et al., 2006; Jensen K.D., et al. 2008).

Межэпителиальные лимфоциты обеспечивают целостность барьерного эпителиального слоя, секретируя такие факторы, как $TGF\beta 1$, $TGF\beta 3$, ростовые факторы кератиноцитов. Межэпителиальные лимфоциты при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях участвуют в разрушении эпителиального барьера (Cheroutre H. et al., 2012).

Т-лимфоциты $CD4\alpha\beta$ собственной пластинки слизистой оболочки способны распознавать антигены в комплексе с молекулами МНС-II. Молекулы МНС-II, локализованные на базальной поверхности энтероцитов, представляют антиген $CD4^+CD2^+$ Т-клеткам, расположенным в собственной пластинке слизистой оболочки. $CD8^+$ Т-лимфоциты распознают антиген на

поверхности энтероцитов в комплексе с молекулами МНС-I. На энтероцитах экспрессируются трансмембранные молекулы: Toll-подобные рецепторы (TLR – Toll-Like Receptor). TLR распознают и связывают определенные паттерны бактериальных антигенов (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP). Распознавание внутрицитоплазматическими рецепторами TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 лигандов происходит в эндосоме в комплексе с адаптерным белком MyD88 (Ortega-Cava C.F. et al., 2003). TLR3 – сигнальный рецептор для вирусной РНК, инициирующий каскад внутриклеточных реакций, ведущих к активации транскрипционных факторов IRF3 и NF- κ B (Руш К., Петере У., 2003). TLR7, TLR8, TLR9 распознают нуклеиновые кислоты вирусов. TLR5 локализуется на базолатеральной мембране эпителиальных клеток и служит рецептором для IL-1, IL-14 и флагеллинов энтероинвазивных бактерий как грамположительных, так и грамотрицательных.

В процессе развития иммунного и воспалительного ответа реализуются два пути активации, через TLR и нуклеотид-связывающий домен олигомеризации – NOD. Эти рецепторы играют важную роль в реакциях врождённого иммунитета, активируя сигнальный путь, связанный с транскрипционным фактором NF- κ B. Активация NF- κ B через промежуточный каскад реакций увеличивает экспрессию генов провоспалительных цитокинов TNF α , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 (Lund D. et al., 2007).

Клетки эпителия желудочно-кишечного тракта секретируют антимикробные пептиды, являющиеся неспецифическими факторами гуморальной иммунной защиты. Антимикробные пептиды различны по структуре и в функциональном отношении некоторые из них проявляют себя в качестве протеолитических ферментов, лизируя клетки, другие нарушают структуру мембран. У человека преобладающими классами подобных неспецифических факторов гуморальной иммунной защиты являются кателицидины – LL-37/hCAP-18, они локализуются в верхней части крипт

толстой кишки, и α - и β дефенсины. Дефенсины – катионные, богатые аргинином пептиды, их молекулярная масса варьирует от 1 до 5 кДа. Дефенсины имеют третичную структуру, содержат 6 цистеиновых остатков из 3-х внутримолекулярных дисульфидных мостиков (Буторова Л.И., Калинин А.В. и др., 2004).

Антимикробные пептиды контролируют в кишечнике процессы прикрепления и дальнейшего проникновения бактерий. β дефенсины представлены во всех отделах желудочно-кишечного тракта. β дефенсины регулируют хемотаксис Т-клеток, дендритных клеток, нейтрофилов, стимулируют продукцию IL-8; вызывают дегрануляцию тучных клеток; принимают участие в адаптивной фазе иммунного ответа; препятствуют распространению инфекции посредством торможения фибринолиза у человека. В клетках Панета, локализующихся на дне крипт, располагаются α дефенсины. Экспрессия дефенсинов HD-5, HD-6 и hBD-2 усиливается при любых воспалительных и инфекционных процессах в кишечнике, дефенсин hBD-1 – основной фактор защиты кишечного эпителия, этот пептид экспрессируется постоянно и препятствует прикреплению бактерий (Буторова Л.И., Калинин А.В. и др., 2004).

Другой эффекторной зоной иммунной системы желудочно-кишечного тракта является собственная пластинка слизистой оболочки, клеточные элементы которой представлены лимфоцитами, плазматическими клетками, макрофагами, тучными клетками, эозинофилами, фиброцитами, фибробластами и миофибробластами (Хэм А., Кормак Д., 1983). Фибробласты продуцируют все компоненты межклеточного вещества, также известна их способность к синтезу биологически активных веществ, таких как TGF β , VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), FGF2 (фактор роста фибробластов), регулирующих дифференцировку и пролиферацию эпителиальных клеток. В собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе располагаются одиночные и агрегированные лимфоидные узелки. Лимфоциты собственной пластинки слизистой оболочки представлены Т-

лимфоцитами, экспрессирующими $CD3\alpha\beta^+$, $CD3\gamma\delta^+$, антиген-распознающие рецепторы $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^-CD8^+$, $CD3^+CD4^+CD8^+$. Эти субпопуляции ответственны за синтез IgA плазматическими клетками, цитокинов макрофагами, $IFN\gamma$ NK-клетками и дендритными клетками (Halstensen T.S. et al., 1990). Дендритные клетки собственной пластинки слизистой оболочки толстой кишки представлены следующими популяциями: $CX3CR1^+CD11b^+$, $CD103^+CD11b^+$, $CD103^-CD11b^+$. Дендритные клетки, экспрессирующие $CX3CR1^+CD11b^+$, не обладают мобильностью, их основная функция заключается в детекции антигенов. Дендритные клетки $CD103^+CD11b^+$ при инфекциях или нарушении состава кишечной микрофлоры, вызванной, например, антибиотиками после захвата антигена из собственной пластинки слизистой оболочки толстой кишки способны к CCR7 зависимой миграции в брыжеечные лимфатические узлы для презентации антигена Т-лимфоцитам. Дендритные клетки, экспрессирующие $CD103^-CD11b^+$ в физиологических условиях, не мигрируют в лимфатические узлы.

Систему мононуклеарных фагоцитов образуют тканевые макрофаги и их предшественники – моноциты, промоноциты и монобласты. Макрофаги слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта представляют в сумме наибольший пул тканевых макрофагов в организме (Wendelsdorf K. et al., 2010). Для поддержания гомеостаза слизистой оболочки кишки, резидентные кишечные макрофаги экспрессируют TLR 3-9, но не экспрессируют CD14 (корцептор липополисахарида), рецепторы к IgA (CD89) и IgG (CD16, CD32 и CD64). Примечательно, что кишечные макрофаги также не продуцируют провоспалительные цитокины в ответ на TLR лиганды, вероятно, $TGF\beta$ ингибирует активность сигнального белка NF- κ B через Smad рецепторы и экспрессию I κ B α (Nuclear factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor Alpha). Таким образом, резидентные макрофаги слизистой оболочки предупреждают развитие воспаления и, располагаясь в непосредственной близости от микрофлоры кишечника, выполняют

фагоцитарную и антигенпредставляющую функции. В случае нарушения целостности эпителия (во время кишечной инфекции или воспаления), моноциты крови также мигрируют в собственную пластинку слизистой оболочки, где дифференцируются в макрофаги, способные фагоцитировать микроорганизмы. Следовательно, резидентные кишечные макрофаги, в случае инвазии и развивающегося воспалительного процесса, получают "помощь" от циркулирующих моноцитов (Wendelsdorf K. et al., 2010).

Все тканевые макрофаги дифференцируются из стволовых клеток костного мозга через строго регулируемый каскад событий дифференцировки. В костном мозге сочетание цитокинов, которые включают IL-1, IL-3 и IL-6, стимулирует асимметричное деление стволовых клеток. Первая, образующаяся из недифференцированной гемопоэтической стволовой клетки клетка-предшественник, представляет собой колониобразующую единицу, которая может дать начало образованию гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов. IL-3 и GM-CSF индуцирует пролиферацию как предшественников гранулоцитов, так и предшественников моноцитов, тогда как IL-1, IL-3, и M-CSF индуцируют пролиферацию и дифференцировку предшественников моноцитов. Продолжающееся воздействие на предшественники M-CSF, вместе с GM-CSF и IL-3, вызывает дальнейшую дифференцировку в монобласты, промоноциты, и, наконец, в моноциты. В дополнение к цитокинам и факторам роста, факторы транскрипции, такие как PU.1 (фактор транскрипции с доменом типа "цинковые пальцы") и AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1 (острая миелоидная лейкемия 1)), участвуют в дифференцировке макрофагов, контролируя развитие клеток миелоидного ряда (Nagamura-Inoue T. et al., 2001). PU.1 особенно важен, потому что регулирует экспрессию рецептора M-CSF, который является критическим для M-CSF-зависимой дифференцировки. Транскрипционные факторы GATA-2, SCL и c-Myb регулируют выживаемость миелоидных клеток (Voso M.T. et al., 1994).

Покинув костный мозг, моноциты циркулируют в крови в течение нескольких дней, прежде чем мигрировать в ткани (Wendelsdorf K. et al., 2010), в том числе в слизистые оболочки. Циркулирующие моноциты, как правило, иммунофенотипически $CD14^{+}$, и они экспрессируют поверхностные молекулы, такие как Fc-рецепторы, рецепторы хемокинов, молекулы адгезии и TLRs, которые способствуют распознаванию и связываться с PAMP в очагах инфекции и/или воспаления. После миграции в ткани, в моноцитах изменяется содержание лизосомальных и гидролитических ферментов, количество и размер митохондрий, потребность в энергии. Выделяют две субпопуляции макрофагов M1 и M2, эти популяции, как правило, связывают, с Th1/Th2 иммунным ответом, заключающемся, главным образом, в высвобождении цитокинов, хемокинов и ферментов. Макрофаги слизистых оболочек человека не подразделяют на субпопуляции (Wendelsdorf K. et al., 2010).

Главным отличительным признаком лимфоидных узелков, связанных со слизистыми оболочками, является синтез В-лимфоцитами секреторного IgA. Димерная молекула sIgA состоит из мономеров IgA, являющихся по структуре гомологами IgG, соединенных J-цепью (Joining chain) (мол. масса 15000). Функция J-цепи заключается в стабилизации сульфгидрильных групп Fc-фрагмента в процессе синтеза иммуноглобулина, что способствует образованию перекрестных связей между субъединицами и формированию сложных структур. Каждая молекула IgA состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, соединяющихся между собой дисульфидными связями. Структурной особенностью молекулы sIgA является наличие в составе молекулы секреторного компонента (Macpherson A.J. et al., 2004). Секреторным компонентом называется фрагмент иммуноглобулинового рецептора (синтезированного в эпителиальных клетках), образовавшийся в процессе миграции IgA в просвет кишечника.

В-клетки также играют важную роль в иммунитете слизистых оболочек. В собственной пластинке слизистых оболочек выявляется большое

число В1-лимфоцитов (Murakami M., Honjo T., 1995), отличающихся от В-лимфоцитов отсутствием экспрессии Т-лимфоцитарного маркера CD5. Дендритные клетки презентуют пищевые антигены В1-клеткам, в результате чего они начинают продуцировать IgA (Macpherson A.J. et al., 2004). У новорожденных IgA-продуцирующие В1-лимфоциты преобладают, достигая максимума к первому году жизни (Brandtzaeg P., 2003). В присутствии IL10, TGF β часть наивных Т-клеток в процессе дифференцировки приобретает фенотип регуляторных Th3-клеток. При повторном контакте с пищевым антигеном эти регуляторные Т-клетки сами продуцируют IL10, TGF β , которые способствуют переключению в В1-клетках синтеза IgM на IgA (Ando T. et al., 2007). Иными словами, появлению IgA⁺В1-клеток в лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника младенца, способствуют иммунорегуляторные цитокины: IL10, TGF β , вырабатываемые регуляторными Т-клетками и колонизирующей ее комменсальной микрофлорой (Ando T. et al., 2007).

Детекцию антигенов в кишечнике осуществляют эпителиальные клетки – М клетки, маркер UEAR1 (*Ulex europaeus*) (Ярилин А.А., 2010), они располагаются в эпителии, ассоциированном с изолированными и агрегированными лимфоидными фолликулами, именно он отвечает за селективность распознавания антигенов. Эпителий, ассоциированный с фолликулами, отличается от эпителиального пласта и других зон кишки тем, что в нем снижена продукция слизи и активность ферментов, разрушающих бактерии.

В индукции иммунного ответа ключевую роль играют лимфоидные фолликулы; эпителиальные М-клетки; антигенпрезентирующие клетки, такие как дендритные клетки CD11c⁺; В и Т-лимфоциты ROR γ t⁺; Lymphoid tissue inducer cells – LTi клетки (Newberry R.D., Lorenz R.G., 2005).

Существует несколько путей захвата антигенов клетками иммунной системы из просвета кишечника, связанных с лимфоидными структурами кишечника. Например, М-клетки специализируются на макромолекулярном

транспорте путем пиноцитоза антигенов из полости органа в лимфоидные структуры, где они встречаются с антигенпрезентирующими клетками (Neutra M.R. et al., 2001). Механизм транспорта остается неизученным, однако известно, что он не имеет отношения к МНС-зависимому процессингу антигенов. Другой путь опосредован дендритными клетками собственной пластинки слизистой оболочки CX3CR1⁺, отростки дендритных клеток располагаются между эпителиоцитами и могут улавливать антигены, находящиеся в просвете кишечника (Rescigno M., 2001). Дендритные клетки, после контакта с антигеном, мигрируют в лимфатические узлы. Так как лимфа из кишечника оттекает по лимфатическим сосудам строго в брыжеечные лимфатические узлы, антигенспецифичный ответ является регионарным (Macpherson A.J., Uhr T., 2004). Подобно эпителиоцитам, клетки изолированных и агрегированных лимфоидных фолликулов могут распознавать патогены непосредственно через TLR и NOD (Abreu M.T. et al., 2005).

Эпителиальные клетки отделены от комменсальной микрофлоры слизью (MyD88 – сигнальный путь производства слизи эпителиальными клетками). В микробиоценозе желудочно-кишечного тракта представлены постоянно обитающие виды бактерий – облигатная микрофлора; сопутствующие, добавочные бактерии – факультативная микрофлора и случайные виды (транзиторная, аллохтонная, остаточная микрофлора) (Бондаренко В.М., 2007). Микробный «пейзаж» слизистой оболочки тонкой и толстой кишки составляют 15-20 ассоциаций бактерий, среди них выделяют доминирующие, субдоминирующие и минорные группы. Количество комменсальных микроорганизмов в кишечнике увеличивается по мере продвижения к его дистальному отделу, так толстая кишка имеет более высокую антигенную «загруженность», чем тонкая кишка. Наиболее высокая концентрация бактерий определяется в слепой кишке (Бондаренко В.М., 2007).

Функции нормальной микрофлоры: 1) колонизационная резистентность организма, заключающаяся в продукции органических кислот, перекиси водорода, мурамидазы, бактерицинов, микроцинов и других антагонистически активных веществ; 2) иммуномодулирующий эффект, а именно усиление фагоцитарной активности макрофагов, моноцитов и гранулоцитов; стимуляция пролиферации плазматических клеток; увеличение синтеза IgA, интерферона, цитокинов и усиление клеточных иммунных механизмов защиты; 3) участие в пищеварении – переваривание ксилана, пектина, микрополисахаридов, гликопротеинов, расщепление азотсодержащих соединений; 4) ферментативная функция: гидролиз клетчатки, продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов, крахмала, деконъюгация желчных кислот; 5) синтетическая функция: витамины К, В12, В9 (фолиевая кислота), В2 (рибофлавин), В5 (пантотеновая кислота), витамин С, аминокислоты, летучие жирные кислоты, гормоны, антибиотические вещества, биоактивные амины и другие биологически активные вещества; 6) трофическая: обновление кишечного эпителия; 7) детоксикационная: защита от токсического воздействия экзогенных и эндогенных субстратов или метаболитов, инаktivация энтерокиназы, щелочной фосфатазы; влияние на метаболизм азот- и углеродсодержащих соединений, мочевины, гистамина, билирубина, холестерина, ксенобиотиков; 8) регуляция моторики желудочно-кишечного тракта: образование летучих жирных кислот, изменение pH; 9) антианемическая: улучшает всасывание железа; 10) антирахитическая: улучшает всасывание кальция, витамина D (Бондаренко В.М., 2007).

Секреторный иммуноглобулин А, микрофлора и ее метаболиты, а также слизь формируют биопленку. Биопленка защищает кишечник от повреждающего действия токсинов, физических и химических факторов, адгезии патогенных микроорганизмов.

Ключевую роль в поддержании иммунного гомеостаза толстой кишки играет популяция CD4⁺ регуляторных Т-лимфоцитов. Это было показано на

пациентах с первичными иммунодефицитами: иммунной дисрегуляцией, полиэндокринопатией, энтеропатией, X-сцепленной иммунной дисрегуляцией (IPEX) и с нарушениями транскрипционного фактора FOXP3 (Bennett C.L. et al., 2001). Эти пациенты страдают полиорганными иммунными расстройствами, включая тяжелые поражения кишечника, которые часто являются основной причиной для первоначального обращения в клинику. В большинстве случаев презентация антигена в кишечнике приводит к сохранению толерантности или к невоспалительному ответу на антиген. Однако, нарушение механизмов иммунной регуляции в кишечнике может привести к кишечным заболеваниям. Например, потеря толерантности к клейковине (глютену), пищевому антигену, причина целиакии, и бактериальные антигены, как полагают, вызывают воспалительные заболевания кишечника (Bouma G., Strober W., 2003).

Таким образом, на сегодняшний день вопрос о том, как поддерживается баланс между иммунитетом и толерантностью в кишечнике остается нерешенным.

1.2. Язвенный колит

1.2.1. Иммунологические механизмы язвенного колита у человека

Болезнь Крона, язвенный колит и другие болезни кишечника неизвестной этиологии по клиническим проявлениям, механизмам их развития и подходам к лечению объединены в группу воспалительных заболеваний кишечника (Белоусова Е.А., 2002). В клинической картине язвенного колита доминируют следующие симптомы: выделение крови с каловыми массами, боли в животе, нарушение моторно-эвакуаторной функции толстой кишки. При ухудшении состояния появляются симптомы интоксикации: лихорадка, анемия, слабость, прогрессирующее снижение массы тела (Васильев А. А., 1987). Эти симптомы могут сопутствовать различным вирусным, инфекционным (сальмонеллез) и неинфекционным

(аппендицит, энтерит, радиационный колит) заболеваниям кишечника. Относительно причин развития язвенного колита выдвигались гипотезы о роли многих факторов, например, табачного дыма, оральных контрацептивов, зубных паст, но их влияние так и не было подтверждено (Капулер Л.Л., 2008). Воспалительные заболевания кишечника регистрируются по всему миру, по статистическим данным наиболее низкая распространенность этих заболеваний наблюдается в африканских и азиатских странах. В России частота язвенного колита составляет 20 случаев на 100.000 населения, болезни Крона - 3,5 на 100.000. При воспалительных заболеваниях кишечника повышается риск развития колоректальных новообразований, их частота составляет 0,4-0,8% случаев (Белоусова Е.А., 2002).

Первое описание язвенного колита у человека относится к пятидесятым годам XIX века, однако этиология заболевания до сих пор остается неизвестной, и, следовательно, эффективные способы лечения практически отсутствуют (Theede K. et al., 2013). По литературным данным доминирующей является точка зрения о связи язвенного колита с генетически детерминированными нарушениями барьерной функции кишечника. О влиянии генетических факторов можно судить, анализируя расовые, этнические и семейные группы, подверженные заболеванию. На настоящий момент выявлены несколько генов, определяющих предрасположенность к развитию заболевания. У больных воспалительными заболеваниями кишечника чаще определяются аллели DRB1 и DQ5, ген, кодирующий субъединицы IL23R, гены множественной лекарственной устойчивости, гены TLR, а также гены, кодирующие IL12B, STAT3 и NK2 homeobox 3 – NKX2-3 (Cho J.H., 2008). По данным А.Г. Якубовской с соавт. (2013) частота генотипов и аллелей для вариантов генов NOD2/CARD15 (Arg702Trp, Gly908Arg, Leu3020insC) и TNF- α (-238G/A и -308G/A) у больных язвенным колитом достоверно не отличается от популяционных данных условно здоровых индивидов. Однако в своей работе авторы

показали, что раннее развитие и более частые обострения язвенного колита (в 1,63 раза) встречаются у носителей аллеля -308A гена TNF- α (Якубовская А.Г. и др., 2013).

В развитии заболевания основную роль играют иммунный ответ на антигены микробного происхождения и снижение толерантности к микрофлоре желудочно-кишечного тракта (Smith P., 2012). Контроль воспалительного процесса в толстой кишке, наряду с другими факторами, осуществляют регуляторные Т-лимфоциты (Hori S. et. al., 2003), которые оказывают цитокин-независимое супрессорное действие. В исследованиях *ex vivo* показано, что индуцированные TGF β FOXP3 регуляторные Т-лимфоциты способны подавлять развитие экспериментального колита, вызванного адаптивным переносом CD4⁺CD62L⁺ Т-лимфоцитов. Регуляторные Т-лимфоциты подавляют пролиферацию CD4⁺CD25⁻ эффекторных Т-лимфоцитов и таким образом предотвращают развитие аутоиммунных процессов (Powrie F., 2004; DiPaolo R.J. et. al., 2005). В норме численность популяций регуляторных и эффекторных Т-лимфоцитов сбалансирована, а при острых и хронических воспалительных заболеваниях отмечаются нарушения этого равновесия, при этом снижение численности популяций регуляторных Т-лимфоцитов приводит к прогрессированию воспалительных и аутоиммунных реакций.

Язвенный колит ассоциирован с преобладанием клеточного типа иммунного ответа, при котором иммунные воспалительные реакции инициируются антигенпрезентирующими клетками – дендритными клетками и макрофагами, экспрессирующими IL-12 после их антигенной стимуляции. IL-12 стимулирует дифференцировку наивных CD4⁺ лимфоцитов в Т-хелперы 1 типа (Th1) и NK-клетки, которые синтезируют IFN- γ . Последний путем положительной обратной связи стимулирует новые дендритные клетки и макрофаги, что приводит к еще большей продукции IL-12 (Múzes G. et al., 2012). В настоящее время интерес исследователей направлен на выяснение роли цитокинов и иммунорегуляторных молекул в механизмах контроля

иммунного ответа. Так язвенный колит опосредован повышением уровня таких провоспалительных маркеров, как MPO (миелопероксидаза), IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF α , NF- κ B и циклооксигеназа-2 – COX-2 (Trivedi P.P., Jena G.B., 2012). IL-6, как известно, индуцирует сигнал STAT3, и это также приводит к повышению экспрессии IL-17 (Mudter J., Neurath M.F. 2007).

Обсуждается роль дефектов врожденного иммунитета (Gerseemann M. et al., 2012), в результате которых острый воспалительный процесс хронизируется. При язвенном колите в слизистой оболочке увеличивается абсолютное количество макрофагов, дендритных клеток и NK клеток (Chen C., 1998). Инициация развития язвенного колита может быть связана с инфекционными агентами, стрессом и факторами среды (Ткачев А.В. и др., 2012).

В доступной литературе также представлены данные об аутоиммунном компоненте язвенного колита. При хроническом язвенном колите у 20-85% пациентов выявляются антитела к цитоплазме нейтрофилов Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies – ANCA, у 5-15% – к клеткам *Saccharomyces cerevisiae* Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies – ASCA (Cioffi M. et al., 2015; Ахриева Х.М. и др., 2017). У больных также обнаруживается высокий титр антиэндотелиальных и антиэпителиальных антител (Ткачев А.В. и др., 2012).

Эффекторные механизмы язвенного колита реализуются окислительным стрессом, воспалительными реакциями, которые приводят к фиброзу (Trivedi P.P., Jena G.B., 2012). Окислительный стресс изменяет уровень экспрессии редокс-чувствительного фактора транскрипции – Nrf2. Nrf2 нокаутные-мыши высоко чувствительны к индукции язвенного колита декстрансульфатом натрия и колоректального рака, связанного с колитом. Эти данные указывают на защитную роль Nrf2 при колите и раке (Khor T.O. et al., 2008).

Важную роль в развитии воспалительного процесса играет микрофлора, которая вследствие увеличения проницаемости слизистой оболочки транслоцируется в кишечную стенку, лимфатические узлы и

другие органы (Trivedi P.P., Jena G.B., 2012). Увеличение транслокации бактерий связано также с повышением уровня липополисахаридов, являющихся классическими провоспалительными эндотоксинами и, которые через TLR4 и NFkB повышают продукцию провоспалительных цитокинов (Trivedi P.P., Jena G.B., 2012).

На морфологическом уровне воспалительные изменения при язвенном колите как у человека, так и в эксперименте выявляются, главным образом, в слизистой оболочке и подслизистой основе. При обострении язвенного колита определяются эрозии и язвы неправильной формы, развиваются крипт-абсцессы. Изъязвления могут затрагивать только слизистую оболочку кишки или проникать в мышечную и серозную оболочки при панколите. В слизистой оболочке ободочной кишки наблюдаются отек и воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов. Морфологическими проявлениями хронического течения заболевания являются фиброз, дисплазия эпителия, ремоделирование слизистой оболочки с образованием ворсинчатой поверхности, деформацией крипт и расширением просветов между ними. В воспалительном инфильтрате определяются макрофаги, единичные нейтрофилы, гранулоциты, НК-клетки, плазматические клетки, преобладают IgG- продуцирующие клетки, а также супрессорные и/или цитотоксические Т-лимфоциты (Капуллер Л.Л., 2008; Золотова Н.А. и др., 2014 Ахриева Х.М. и др., 2017).

Региональные особенности воспаления в толстой кишке при язвенном колите

Язвенный колит поражает главным образом толстую кишку, причем воспалительный процесс распространяется от прямой кишки в проксимальном направлении (Белоусова Е.А., 2002; Ахриева Х.М. и др., 2017).

В ободочной кишке у человека выделяют следующие отделы: восходящий (располагается в правом отделе брюшной полости), поперечный (начинается чуть ниже правого подреберья, и направляется в поперечном

направлении до левой стороны живота), нисходящий (в левом отделе брюшной полости) и сигмовидный (спускается в полость таза). Отделы ободочной кишки имеют различные источники эмбрионального происхождения и кровоснабжения.

В эмбриональном развитии первичная кишка представлена головной и туловищной частями. Головная кишка, в свою очередь, делится на ротовую часть и глоточную кишку, туловищная на переднюю, среднюю и заднюю кишки. Восходящая и поперечная ободочная кишка формируются из средней части туловищной кишки; нисходящая и сигмовидная ободочные кишки – задней кишки. Кровоснабжение восходящего отдела ободочной кишки осуществляется подвздошно-ободочно-кишечной и средней ободочно-кишечной артериями. Поперечный отдел ободочной кишки питают средняя ободочно-кишечная и нижняя брыжеечная артерии. Нижняя брыжеечная, левая ободочно-кишечная артерии питают нисходящую ободочную кишку. Сигмовидно-кишечные и верхняя прямокишечная артерии направляются к сигмовидной ободочной кишке (Rosai J., 2004).

Glebov O.K. с соавт. (2003) показали, что восходящий и нисходящий отделы ободочной кишки человека соответствуют медиальному и дистальному отделам ободочной кишки мыши и экспрессия генов в них в постнатальном периоде различается. Используя метод cDNA microarray, авторы проанализировали более 1000 генов, экспрессирующихся в эпителиальных клетках слизистой оболочки восходящего и нисходящего отделов ободочной кишки у плода и взрослого человека. Нисходящий и восходящий отделы ободочной кишки отличаются по экспрессии 214 генов, из которых различия в 87 генах были выявлены у плода. При язвенном колите у человека поражается преимущественно нисходящий отдел ободочной кишки, в то время как рак толстой кишки чаще возникает в восходящей ободочной кишке (Glebov O.K. et al., 2003).

Различия в частоте развития воспалительных процессов и колоректального рака, возможно, опосредованы особенностями

микробиоценоза и иммуномодулирующим действием микрофлоры, экспрессией некоторых антигенов, метаболизма глюкозы, полиаминов и масляной кислоты и концентрации желчных кислот (Glebov O.K. et al., 2003).

Нисходящая кишка является наиболее колонизированным отделом ободочной кишки, её функции заключаются во всасывании воды и электролитов из содержимого просвета, а также депонировании остатков переваренной пищи. Glebov O.K. с соавт. (2003) считают, что более частое возникновение колоректального рака в восходящем отделе ободочной кишки связано с присутствием в ней проканцерогенных факторов, а также с особенностями регенераторных процессов.

1.2.2. Модель язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия

В экспериментальных исследованиях наиболее часто используют так называемые «химические» модели воспалительных заболеваний кишечника. При оральном или ректальном введении специфических химических агентов возникает воспалительный процесс в кишечнике по клиническим и морфологическим проявлениям сходный с язвенным колитом или болезнью Крона. Такими агентами являются, например, декстрансульфат натрия (dextran sodium sulfate, DSS, ДСН), TNBS (2,4,6-trinitrobenze sulfonic acid), оксозалон.

Модель колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, была предложена I. Okayasu в 1990 году. Она широко применяется на грызунах для исследования патогенеза воспалительных заболеваний кишечника и доклинической оценки эффективности лекарственных препаратов, и воспроизводится в 100% случаев. Эта модель позволяет получить разную тяжесть острого и хронический язвенный колит, а у мышей C57Bl/6 – колоректальный рак (Melgar S. et al., 2005).

Используемый для индукции экспериментального язвенного колита декстрансульфат натрия относят к декстранам $((C_6H_{10}O_5)_n)$, которые

являются бактериальными полисахаридами. Декстраны состоят из остатков α -D-глюкопиранозы и представляют собой разветвленные цепи различной молекулярной массы. Они широко используются в промышленности в качестве сорбентов, в научно-техническом производстве для производства сефадексов, а также в медицине – они являются основой для плазмозаменителей противошокового и гемодинамического действия. Декстрансульфат натрия (ДСН) – это сульфатированная модификация декстрана с противоионом Na^+ .

Несмотря на популярность данной модели в экспериментальных исследованиях, механизм действия декстрансульфат натрия недостаточно изучен. На основании литературных данных, развитие язвенного колита можно представить следующим образом. ДСН изменяет физико-химические свойства слизи и «выносит» её, таким образом, поверхность эпителиальных клеток становится доступной для прямого контакта с ДСН и микрофлорой (Smith P., 2012). ДСН за счет присутствующих в его составе сульфогрупп формирует электростатические связи с жирными кислотами, что облегчает его проникновение в цитоплазму эпителиальных клеток (Laroui H. et al., 2012), где он оказывает цитотоксическое действие на колоноциты, приводя к повреждению целостности эпителия и увеличению проницаемости эпителиального барьера для микрофлоры и макромолекул (Ni J. et al., 1996). Эти изменения сочетаются с нарушением структуры плотных контактов: в них снижается содержание окклюдина, белка ZO-1, клаудинов -1,-3,-4,-5 (Mennigen R. et al., 2009). Также показано, что при язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, у мышей в эпителиальной выстилке ободочной кишки повышаются уровни апоптоза и митотической активности (Mennigen R. et al., 2009). Повышение проницаемости эпителиального барьера слизистой оболочки толстой кишки приводит к запуску сигнальных провоспалительных каскадов, повышению продукции и секреции цитокинов (Laroui H. et al., 2012). В результате нарушения эпителиального и слизистого барьера толстой кишки происходит агрегация

микрофлоры непосредственно на поверхности эпителиальных клеток и дальнейшая транслокация микроорганизмов и их антигенов в собственную пластинку слизистой оболочки (Smith P. et al., 2012). Микробные антигены активируют также иммунокомпетентные дендритные клетки, что приводит к индукции выраженного поликлонального Т-клеточного ответа, который в недостаточной мере контролируется противовоспалительными цитокинами и Т-регуляторными лимфоцитами (Smith P. et al., 2012). Кроме того на ранних стадиях развития колита показана способность декстрансульфата натрия активировать макрофаги, в результате чего повышается продукция ими провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α (Kawada M. et al., 2007).

Колит, индуцированный приемом декстрансульфата натрия, характеризуется обширным повреждением слизистой оболочки толстой кишки с деструктивными изменениями колоноцитов и десквамацией эпителия, воспалительной инфильтрацией в собственной пластинке слизистой оболочки различной выраженности, вплоть до полного исчезновения крипт, в участках, где эпителиальная выстилка сохранена, отмечается гипертрофия бокаловидных клеток. В подслизистом слое наблюдается обширный отек и полнокровие кровеносных и лимфатических сосудов (Золотова Н.А. и др., 2014).

1.3. Вторичный иммунодефицит

1.3.1. Общая характеристика

Патологический стресс, острые и хронические воспалительные заболевания с выраженными системными проявлениями приводят к инволюции лимфоидной ткани (Зайратьянц О.В., 1998; Kubera M. et al., 1998; Berthelot J.M. et al., 2010 и др.). На фоне инволюции лимфоидной ткани в позднем постнатальном периоде может развиваться вторичный иммунодефицит, при котором нарушения функционирования иммунной

системы напрямую не являются результатом генетического дефекта (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Лусс Л.В., 2015; Vaillant A.J., Qurie A., 2018).

В настоящее время вторичные иммунодефициты классифицируют по форме, этиологии и патогенезу. Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин (1999) выделяют три формы вторичных иммунодефицитов: приобретенную, развивающаяся при поражении человека соответствующим вирусом, например ВИЧ; индуцированную, развивающуюся вторично по отношению к основному заболеванию; спонтанную, когда явная причина, вызвавшая нарушение в функционировании иммунной системы отсутствует (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999). Индуцированный вторичный иммунодефицит, как правило, является транзиторным (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999), т.е. при устранении вызвавшей его причины наступает полное восстановление функционирования иммунной системы. При развитии хронического, рецидивирующего инфекционно-воспалительного процесса вторичный иммунодефицит приобретает форму компенсированного. Следует иметь в виду, что транзиторные изменения иммунного статуса возможны у практически здоровых индивидов, и данном случае нет необходимости в постановке диагноза вторичного иммунодефицита и проведении иммуномодулирующей терапии (Лусс Л.В., 2015).

Е.С. Белоусов (1992) также выделяет три формы вторичных иммунодефицитов: компенсированный, которому сопутствуют часто возникающие острые инфекционные заболевания; субкомпенсированный с развитием хронических воспалительных инфекционных заболеваний; декомпенсированный – генерализация инфекций, вызванных условно-патогенной флорой (Райкис Б.Н. и соавт., 2002). В зависимости от этиологических факторов вторичные иммунодефициты классифицируются на вызванные ионизирующей радиацией, ВИЧ-инфекцией, нарушением питания, хирургическими операциями, болезнями обмена, злокачественными опухолями, ожогами, хроническим течением заболеваний, стрессами, возрастом, инфекционными заболеваниями, лекарственными препаратами.

По патогенезу вторичные иммунодефициты разделяют на дефекты системы тромбоцитов, дефекты системы комплемента, дефициты макрофагов и гранулоцитов, В-клеточные, Т-клеточные и комбинированные (Райкис Б.Н. и соавт., 2002). Однако, в настоящее время ни одна из существующих классификаций не унифицирована.

К общим признакам вторичного иммунодефицита относят наличие острого и хронического воспалительного процесса любой локализации, и клинически он проявляется бактериальными, вирусными и другими инфекциями, частыми обострениями хронических воспалительных процессов, синдромом хронической усталости, субфебрильной температурой тела в течение длительного периода, лимфаденопатией, миалгиями, артралгией без признаков системного воспалительного процесса (Понякина Н.Д., Лебедев К.А., 2003; Сетдикова Н.Х. и соавт., 2006; Симонова А. В., Лебедева И.С., 2012).

Вторичные иммунодефициты затрагивают изменения клеточного, гуморального и фагоцитарного звеньев иммунной системы. В западных странах для оценки вторичного иммунодефицитного состояния относительно широко используют тесты, условно разделенные Р.В. Петровым и соавторами (1984), на тесты первого и второго уровней. Тесты первого уровня принято считать ориентировочными, необходимыми для выявления грубых дефектов иммунной системы, тесты второго уровня являются функциональными и направлены на поиск конкретного дефекта иммунной системы (Сетдикова Н.Х. и соавт., 2006).

К тестам первого уровня относят оценку фагоцитоза – абсолютное число нейтрофилов и моноцитов, интенсивность поглощения микробов нейтрофилами и моноцитами, способность фагоцитов убивать микробы; В-системы иммунитета – определение уровня иммуноглобулинов, относительного содержания и абсолютного количества В-лимфоцитов в периферической крови. В клинике широко применяют тесты первого уровня, направленные на оценку Т-клеточного звена иммунной системы. К ним

относится определение общего числа лимфоцитов, абсолютного количества и относительного содержания $CD3^+$ Т-лимфоцитов, пролиферативного ответа на действие основных Т-митогенов (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999). Основным лабораторным показателем, позволяющим определить количественную характеристику лимфоцитов является иммунофенотипирование субпопуляций лимфоцитов: $CD19^+$, $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^-HLA-DR^+$, $CD3^+HLA-DR^+$, $CD3^-CD16/56^+$, $CD4^+CD25^+$.

В тестах второго уровня для оценки фагоцитоза измеряют интенсивность хемотаксиса фагоцитов, экспрессию молекул адгезии на поверхности нейтрофилов; для оценки В-системы – определение субклассов иммуноглобулинов, специфических антител к белковым полисахаридным антигенам, способность лимфоцитов к пролиферативному ответу на В- и Т-митогены; для оценки Т-клеточного звена иммунитета измеряют продукцию цитокинов, активационных молекул ($CD25$, $HLA-DR$) на поверхности Т-лимфоцитов, молекул адгезии, пролиферативный ответ на специфические антигены, аллергические реакции с помощью кожных тестов на микробные антигены. Наиболее часто используемым в клинической практике для диагностики Т-клеточный вторичных иммунодефицитов является применение кожных тестов ввиду их простоты и информативности (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999). Для выявления лиц с иммунодефицитами отечественными авторами Р.В. Петровым и Б.В. Пинегиным была предложена количественная оценка по определению Т-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК), В-лимфоцитов, адсорбирующих эритроциты мыши (М-РОК), а также анализ IgM и IgG . В настоящее время в клинической иммунологии для постановки диагноза вторичного иммунодефицита используют главным образом общедоступные и информативные методы – определение гемограммы и уровня сывороточных иммуноглобулинов (Лусс Л.В., 2015).

В ряде работ авторы предлагают рассматривать хронические, рецидивирующие воспалительные заболевания как проявления вторичного иммунодефицита, вне зависимости от обнаружения поломок иммунной системы с помощью количественных и функциональных тестов, описанных ранее (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Понякина Н.Д., Лебедев К.А., 2003; Сетдикова Н.Х. и соавт., 2006; Новиков Д.К. и соавт., 2011; Симонова А. В., Лебедева И.С., 2012). По данным ВОЗ одной из причин хронической обструктивной болезни легких следует считать развитие у больного вторичного иммунодефицита, ведущего к снижению сопротивляемости организма к инфекционным агентам (Решетникова Л.К. и соавт., 2014). Л.К. Решетниковой и соавт. (2014) показано, что хроническая обструктивная болезнь легких, ассоциированная с дисбактериозом кишечника, протекает на фоне более значительного снижения функциональных показателей иммунной системы (Круглякова Л.В. и соавт., 2013). Д.К. Новиков с соавт. (2011) выдвинул теорию, что любой инфекционный процесс – это прежде всего иммунодефицитная болезнь у индивида, т.е. восприимчивость макроорганизма и недостаточность функционирования его иммунной системы. Кроме того, в отечественных работах при перитоните описана связь вторичного иммунодефицита с бактериальной инфекцией (Стяжкина С.Н. и соавт., 2015).

Таким образом, остается открытым вопрос, является ли вторичный иммунодефицит первичными или он развивается вторично по отношению к основному заболеванию.

В тоже время в доступной литературе Л.В. Лусс (2015) отмечает проблему гипердиагностики вторичного иммунодефицита у людей с рецидивирующими инфекциями из-за неадекватного лечения основного заболевания и некорректной оценки иммунного статуса.

Следует отметить, что все авторы сходятся во мнении, что вторичный иммунодефицит у человека может развиваться на фоне любой патологии. Д.К.

Новиков с соавт. (2011) указывают на связь инфекций, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами с иммунодефицитом, так как только при его наличии возможна их экспансия. Нормальная работа иммунной системы подразумевает нейтрализацию патогенов до появления клинических симптомов воспаления и генерализованной иммунной реакции, как это происходит после вакцинации. Поэтому даже при персистенции многих условно-патогенных микроорганизмов не всегда развивается инфекционный процесс (Новиков Д.К. и соавт., 2011). Авторы выделяют относительный и абсолютный иммунодефицит, при относительном иммунодефиците на инфекционные агенты вызывают острую воспалительную реакцию и иммунный ответ, после которого при адекватном лечении происходит выздоровление и возникает адаптивный иммунитет, но относительный иммунодефицит может стать абсолютным с тяжелым исходом (Новиков Д.К. и соавт., 2011).

1.3.2. Вторичный иммунодефицит при язвенном колите

Язвенный колит у человека с одной стороны является хроническим воспалительным заболеванием, а с другой стороны в его индукции важную роль играют в том числе взаимодействие клеток иммунной системы с условно патогенной флорой, что позволяет рассматривать это заболевание с позиции вторичного иммунодефицита. Кроме того, для лечения язвенного колита используют антибактериальные и иммуносупрессорные препараты, которые также приводят к развитию вторичных иммунодефицитов (Vaillant A.J., Qurie A., 2018)

В доступной литературе представлены единичные работы, посвященные изучению органов иммунной системы при этом заболевании, и они ограничиваются исследованиями на макроуровне и оценки некоторых субпопуляций лимфоцитов. S. Sasaki с соавт. (2008) на половозрелых мышах линии C57Bl/6 при остром язвенном колите, индуцированном 4,5%

декстрансульфатом натрия, выявили прогрессирующую потерю массы тимуса и снижение числа $CD4^+CD8^+$ тимоцитов (Sasaki S. Et al., 2008).

Кроме того, в литературе встречаются сведения о роли тимуса в патогенезе язвенного колита. Коллектив авторов во главе с Y. Mizuno в 1976 году исследовали патологические изменения тимуса у пациентов с язвенным колитом. Авторами было показано, что у 18 пациентов с язвенным колитом тимус был крупнее, чем у 104 пациентов с аутоиммунными заболеваниями., а частота образования тимусных лимфоидных фолликулов в соединительнотканых перегородках долек при язвенном колите была аналогична таковым при аутоиммунных заболеваниях (Mizuno Y., 1976). M. Tsuchiya (1984) показал, что тимэктомия у больных язвенным колитом увеличивает процент ремиссии, по сравнению с пациентами, получавшими противовоспалительное лечение и глюкокортикоидные препараты, но эти исследования вскоре были прекращены.

Литературные данные об изменениях селезенки при язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, также немногочисленны. S. Sasaki с соавт. (2008) показали, что масса селезенки у них увеличивается. A. Nakansson с соавт. (2014) при иммунофенотипическом анализе основных субпопуляций лимфоцитов выявили статистически значимое увеличение количества $CD4^+CD25^+CTLA-4^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов и $CD4^+CD49^+$ NK клеток.

В брыжеечных лимфатических узлах у мышей с язвенным колитом, индуцированным декстрансульфатом натрия, A. Nakansson с соавт. (2014) выявили статистически значимое увеличение количества $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, $CD4^+CD25^+CTLA-4^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов, $CD11b^+CD11c^+$ фагоцитов и $CD11c^+$ дендритных клеток.

Таким образом, при острых и хронических воспалительных процессах, включая язвенный колит, опухолях, инфекционных и вирусных заболеваниях, а также стрессе иммунная система претерпевает структурные и

функциональные изменения. Изучение морфофункциональных изменений в органах иммунной системы у человека затруднено, а в связи с широкой распространенностью и увеличением частоты развития функциональных нарушений иммунной системы на фоне воспалительных заболеваний и недостаточной изученностью механизмов их развития, проблема является актуальной. Имеющиеся в литературе данные о морфофункциональных изменениях органов иммунной системы фрагментарны и они не соотнесены с формами вторичного иммунодефицита. Кроме того, в литературе отсутствуют данные о морфофункциональных изменениях тимуса во взаимосвязи с субпопуляционным составом лимфоцитов периферической крови и нарушениями во вторичных лимфоидных органах во взаимосвязи с очагом воспаления при экспериментальном остром язвенном колите разной тяжести и в разные сроки развития хронического язвенного колита. Решению этих вопросов и посвящена настоящая работа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования

Работа выполнена на 240 половозрелых самцах мышей линии C57Bl/6, полученных из питомника филиал "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Возраст животных составил 8-9 недель, масса тела 18-25 г. При поступлении в виварий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «НИИ морфологии человека» экспериментальные животные были помещены на двухнедельный карантин. Животных содержали при естественном освещении, температуре 20-22°C и относительной влажности воздуха 60-70% по 10 голов в клетке. Мыши имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОСС RU.Н081.В00113, ГОСТ Р50258-92). При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение исследования получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ НИИМЧ (протокол № 15 от 16.12.2014). Все эксперименты были выполнены в осенне-зимний период.

2.2. Дизайн эксперимента

С целью изучения морфофункциональных изменений иммунной системы при экспериментальном язвенном колите были выделены 5 экспериментальных групп: контрольная ($n = 65$); острый язвенный колит, индуцированный 1% раствором ДСН ($n = 49$), острый язвенный колит, индуцированный 5% раствором ДСН ($n = 46$); хронический язвенный колит 28-е сутки ($n = 38$); хронический язвенный колит 56-е сутки ($n = 42$) (таблица 1, рис. 6, 7).

Острый язвенный колит разной тяжести моделировали заменой питьевой воды на 1% или 5% водный раствор ДСН (Dextran sulfate sodium salt $M_r \sim 40,000$, BioChemica, Германия). ДСН растворяли в кипяченой воде, каждое животное потребляло от 4,2 до 5,1 мл/сутки. В течение 5 суток мыши получали раствор ДСН, после раствор ДСН заменяли на питьевую воду, группы выводили из эксперимента на 7-е сутки. Контрольная группа в этой серии экспериментов состояла из 22 мышей-самцов линии C57Bl/6, получавших питьевую воду (рис. 6).

Экспериментальные группы животных с хроническим язвенным колитом состояли из 23 и 37 самцов мышей линии C57Bl/6. Животные с хроническим колитом (28-е сутки) получали 1% водный раствор ДСН в течение первых 5 суток эксперимента. Последующие 23 суток мыши получали питьевую воду. Животных выводили из эксперимента на 28-е сутки (рис. 2). Мыши с хроническим колитом (56-е сутки) получали 1% водный раствор ДСН в течение первых пяти суток эксперимента и повторно раствор 1% ДСН на 11 – 15-е и 21 – 26-е сутки. Последующие 30 суток мыши получали питьевую воду. Животных выводили из эксперимента на 56-е сутки. Контрольные группы состояли из 43 мышей-самцов линии C57Bl/6, которые в течение 28 и 56 суток получали питьевую воду (рис. 7).

В ходе эксперимента у мышей всех опытных групп оценивали характер стула, подвижность и состояние шерстного покрова. Животных контрольных и опытных групп выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира и проводили забор органов иммунной системы (тимуса, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов), ободочной кишки и периферической крови из шейных вен.

Таблица 1

Число животных в контрольной и экспериментальных группах

Методы исследования		Контрольная группа (7-е, 28-е, 56-е сут)	Острый язвенный колит		Хронический язвенный колит	
			1% ДСН	5% ДСН	28-е сут	56-е сут
Гистологическое, гистохимическое, иммуногистохимическое исследование ободочной кишки, тимуса, селезенки, БЛУ*		20	22	21	22	16
LAL тест (сыворотка крови)		15	5	5	5	5
Проточная цитофлуориметрия	Иммунофенотипический анализ лимфоцитов и макрофагов в периферической крови и суспензии клеток, полученных с помощью гомогенизатора Поттера (тимус, БЛУ)	15	14	12	6	11
	Анализ клеток, полученных методом ферментативной дезагрегации (тимус, ободочная кишка)	15	8	8	5	10

* БЛУ – брыжеечные лимфатические узлы

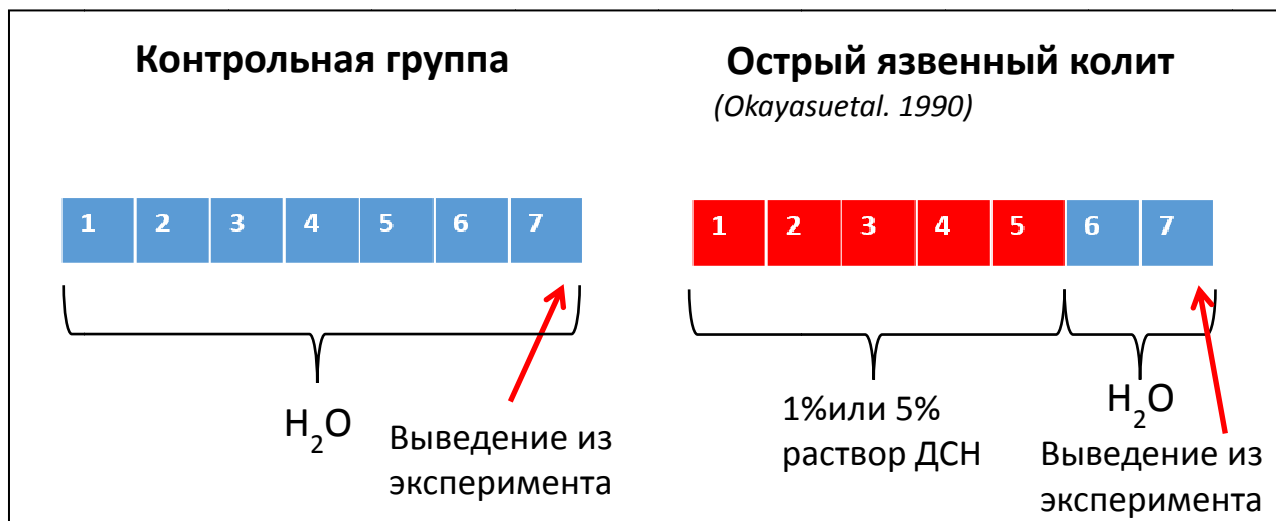


Рис. 6. Схема моделирования острого язвенного колита разной тяжести

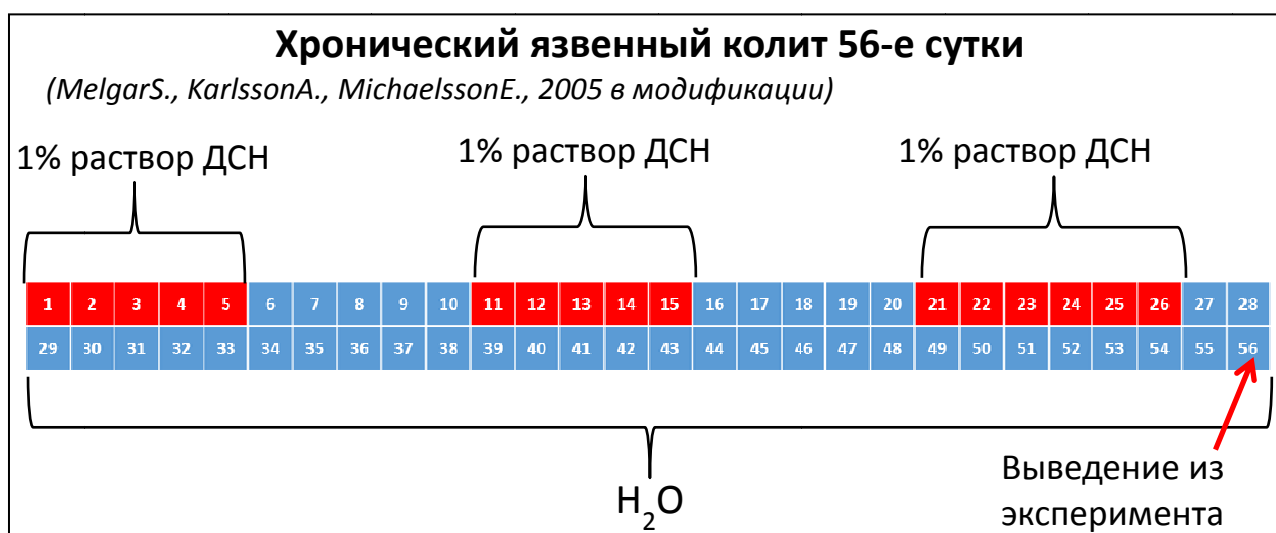
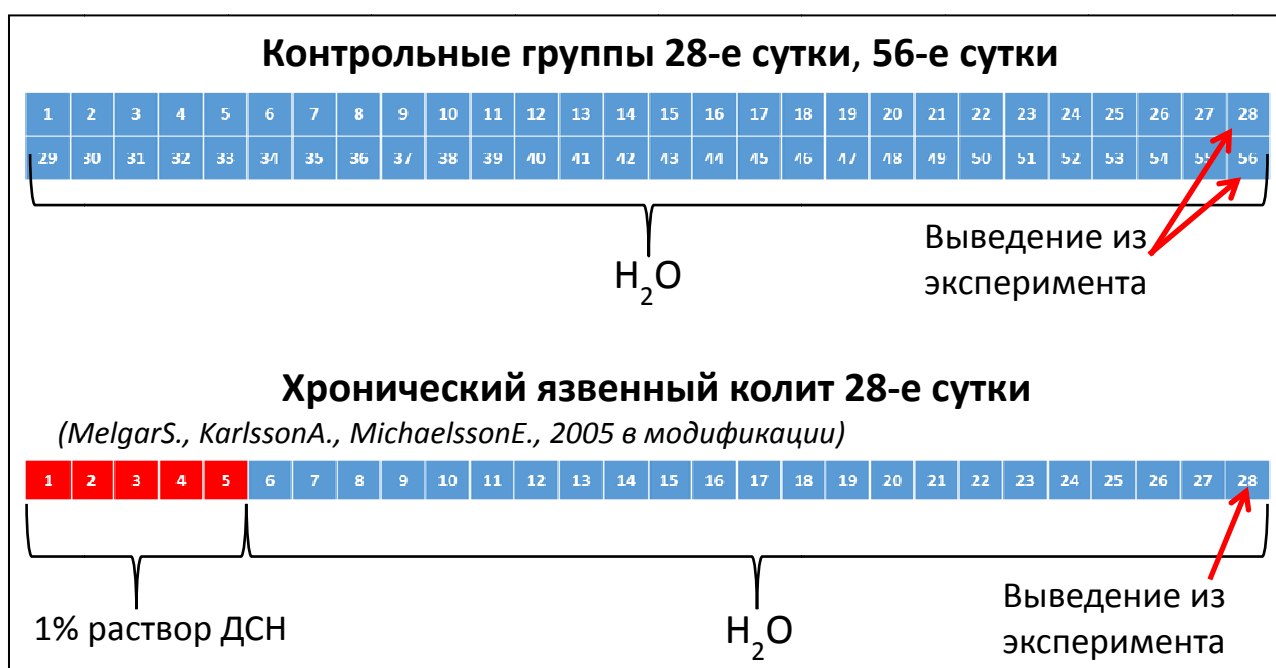


Рис. 7. Схема моделирования хронического язвенного колита

2.3. Методы исследования

Гистологическое исследование

У мышей контрольной и опытных групп извлекали тимус, селезенку, брыжеечные лимфатические узлы и дистальный отдел ободочной кишки. Ободочную кишку разрезали по брыжейке, промывали фосфатно-солевым буфером (Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, Helicon, Россия), расправляли на миллипоровом фильтре. Тимус, селезенку, брыжеечные лимфатические узлы, а также дистальный отдел ободочной кишки фиксировали в течение суток в индивидуальных кассетах в жидкости Буэна. Материал проводили по спиртам восходящей концентрации и ксилолам в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США). Обезвоженные образцы заливали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм на микротоме модели Microm HM340E (Thermo Scientific, США), монтировали их на предметные стекла, депарафинировали, полученные препараты использовали для гистологического, гистохимического и иммуногистохимического исследования.

Для морфологического описания срезы тимуса, селезенки, брыжеечных лимфатических узлов и ободочной кишки мышей контрольной и опытных групп окрашивали гематоксилином Майера и эозином (Меркулов Г.А., 1961).

Гистохимическое исследование

Для выявления метахроматически окрашенного ДСН в брыжеечных лимфатических узлах использовали окраску по методу Ниссля (Меркулов Г.А., 1961). Для выявления фиброзных изменений в стенке ободочной кишки применяли окраску по трехцветному методу Массона в соответствии с рекомендациями производителя (набор SigmaDiagnostics, TrichromeStain (Masson), Sigma-Aldrich, США). Для выявления разной степени зрелости

фибрина в гистологических срезах ободочной кишки использовали трехцветную окраску MSB (Martius/Scarlet/Blue, BioVitrum, Россия).

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое исследование проводили с использованием иммунопероксидазного метода. Эпителиальные клетки в мозговом веществе тимуса выявляли с помощью антител к цитокератину 19 (Rabbit monoclonal [EP1580Y] Anti-Cytokeratin 19 antibody, Abcam, Великобритания), в разведении 1:200; Goat F(ab')₂ Anti-Rabbit IgG (Fab')₂ (HRP), Abcam (Великобритания) в разведении 1:400.

Гистологические срезы на стеклах Super Frost Plus депарафинизировали в трех сменах ксилола и спиртах нисходящей концентрации. Для демаскировки антигенов препараты кипятили 20 мин в цитратном буфере с 0,05% Tween20, pH=6.0. Охлаждали до комнатной температуры, отмывали в 2-х сменах PBS (pH 7.4, 0.01M, Helicon, Россия). Эндогенную пероксидазу инактивировали 3% раствором перекиси водорода в течение 10 минут, отмывали в 2-х сменах PBS. Неспецифическую реакцию блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (20 мин). Первые антитела Rabbit monoclonal [EP1580Y] Anti-Cytokeratin 19 antibody (Abcam, Великобритания) разводили в буфере Antibody Diluent (S0809, Dako, Дания) 1:200 и наносили на срезы, помещенные во влажную камеру, затем инкубировали в течение ночи при температуре +4°C и отмывали в 3-х сменах PBS. Вторые антитела Goat F(ab')₂ Anti-Rabbit IgG (Fab')₂, связанные с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания), разводили в буфере Antibody Diluent (S0809, Dako, Дания) 1:400 и инкубировали на срезах в течение часа при комнатной температуре во влажной камере. Отмывали в 3-х сменах PBS. Связывание антител выявляли по реакции пероксидазы хрена с 3,3'-диаминобензидином с помощью набора N-Histofine DAB-2V (Nichirei Bioscience Inc., Япония) согласно инструкции производителя. Докрашивали гематоксилином Майера, обезвоживали и заключали в канадский бальзам.

Хромогенный LAL тест для определения уровня эндотоксина

Кровь забирали из шейных вен, центрифугировали при 200 g в течение 20 минут, отбирали сыворотку, замораживали ее при температуре – 70 °С и хранили в течение месяца. В сыворотке крови с помощью коммерческого набора «Nycult Biotech» (Нидерланды) оценивали уровень эндотоксина по способности лизата амебоцитов мечехвоста специфически реагировать с липополисахаридом грамотрицательных бактерий на микропланшетном ИФА ридере (Anthos Labtec, Австрия).

Выделение клеток из тимуса, брыжеечных лимфатических узлов и стенки ободочной кишки

Для иммунофенотипического исследования получали суспензии лимфоцитов тимуса и брыжеечных лимфатических узлов с помощью гомогенизатора Поттера в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco, Великобритания). Эпителиальные и дендритные клетки тимуса выделяли методом ферментативной дезагрегации по Y. Xing, K.A. Hogquist (2014). Фрагменты тимуса инкубировали в трех сменах культуральной среды RPMI 1640 (Gibco, Великобритания), содержащей коллагеназу Д, выделенную из *Clostridium histolyticum* (Roche, Швейцария), диспазу 2, полученную из *Bacillus polymyxa* (Roche, Швейцария), ДНКазу 1 (Thermo Scientific, США), затем суспензию клеток для нейтрализации действия ферментов переносили в буфер, состоящий из культуральной среды RPMI 1640 (Gibco, Великобритания), бычьего сывороточного альбумина (Sigma Aldrich, США) и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота, Sigma Aldrich, США). Выделение суспензии клеток из ободочной кишки проводили по B. Weigmann и соавт. (2007). Фрагменты дистального отдела ободочной кишки инкубировали в растворе культуральной среды 199 с солями Хэнкса, глутамином (ПанЭко, Россия), ЭДТА и DTT (Dithiothreitol, Sigma Aldrich, США), затем в культуральной среде 199 с солями Хэнкса, глутамином

(ПанЭко, Россия), содержащей коллагеназу Д (Roche, Швейцария), выделенную из *Clostridium histolyticum*, диспазу 2 (Roche, Швейцария), полученную из *Bacillus polymyxa*, ДНКазу 1 (Thermo Scientific, США).

Проточная цитофлуориметрия

Субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов периферической крови, тимуса, брыжеечных лимфатических узлов, стенки ободочной кишки, а также эпителиальных и дендритных клеток тимуса определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Абсолютное количество лейкоцитов и лимфоцитов в крови подсчитывали с помощью гематологического анализатора Celltac alpha MEK-6400 (Nihon Kohden, США), абсолютное количество клеток в суспензиях клеток, выделенных из тимуса, брыжеечных лимфатических узлов, ободочной кишки подсчитывали в камере Горяева. В качестве антикоагулянта при заборе цельной крови использовали ЭДТА (5 мг/мл). Применяли антитела CD3e-FITC, CD4-PE-Cy5, CD8a-PE-Cy7, CD19-PE, F4/80-PE, CD11cPE, CD45-FITC, CD205-PE, CD326 (EpcAM)-PE-Cy7 (eBioscience, США), UEA1-FITC (Vector Laboratories, США) (таблица 2, рис.8, 9) в соответствии с рекомендациями производителей, в пробирку со 100 мкл клеточной суспензии или цельной крови вносили антитела (0,5-2,5 мкл) и инкубировали при комнатной температуре в темноте 30 минут. Лизис эритроцитов в образцах цельной крови проводили с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution (Beckman Coulter, США) в течение 10 минут в темноте при комнатной температуре. Клетки отмывали в 1 мл PBS. Осадок разводили в 500 мкл PBS. Выявление субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов проводили согласно протоколу с помощью набора Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3 (eBioscience, США), с использованием Flow Cytometry Staining Buffer для отмывки от антител, а также после инкубации с раствором для фиксации и пермеабиллизации. Для определения апоптоза в тимусе применяли Annexin V-FITC kit (Beckman Coulter, Франция).

Таблица 2

Список использованных антител и выявляемых с их помощью типов клеток

Антитела	Система визуализации	Назначение
CD3+CD4+	FITC, PE-Cy5	Т хелперы
CD3+CD8+	FITC, PE-Cy7	Цитотоксические Т-лимфоциты
CD3-CD19+	FITC, PE	В-лимфоциты
CD4+CD25+Foxp3+	FITC, PE, PE-Cy5	Регуляторные Т-лимфоциты
CD4+CD25+IgG2a+	FITC, PE, PE-Cy5	Изотипический контроль для Foxp3+
F4/80+	PE	Макрофаги
CD4-CD8-CD11c+CD45+	PE-Cy5, PE-Cy7, PE, FITC	Дендритные клетки
CD205-CD326+UEA1+	PE, PE-Cy7, FITC	Эпителиальные клетки мозгового вещества тимуса
CD205+CD326+UEA1-	PE, PE-Cy7, FITC	Эпителиальные клетки коркового вещества тимуса
Аннексин V+PI-	FITC, PI	Клетки гибнущие по механизму апоптоза

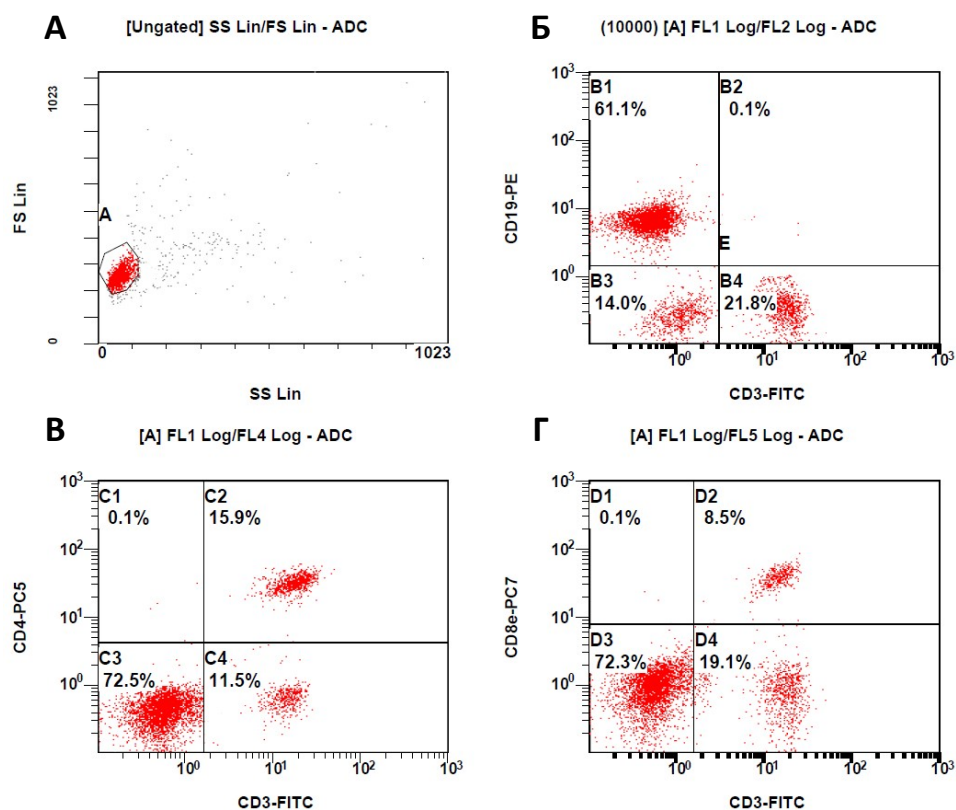


Рис.8. Двумерные поточечные графики. Анализ субпопуляций лимфоцитов с иммунофенотипом $CD3^{-}CD19^{+}$ (Б), $CD3^{+}CD4^{+}$ (В), $CD3^{+}CD8^{+}$ (Г)

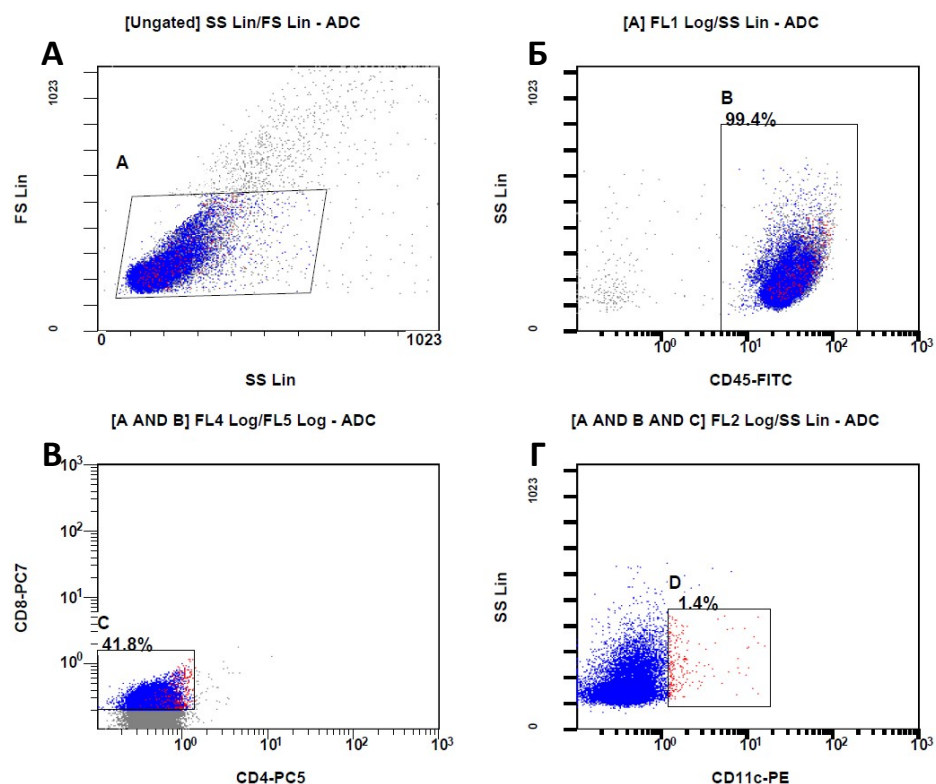


Рис.9. Двумерные поточечные графики. Анализ субпопуляции дендритных клеток с иммунофенотипом $CD45^{+}CD4^{-}CD8^{-}CD11c^{+}$

Методы получения, обработки и анализа изображений

Для фотосъемки микропрепаратов использовали цифровую камеру Axioscam HRc на микроскопе Axioplan 2, Carl Zeiss (Германия) с программным обеспечением Zeiss Axiovision. Анализ полученных в формате TIFF изображений проводили в программе ImageJ (NIH) 1.51h в варианте Fiji.

Подготовка изображений перед морфометрическим исследованием заключалась в удалении шумов с помощью нелинейного медианного фильтра, нелинейного фильтра Кувахары и функции Remove Outliers, контрастность повышали с помощью кривых яркости и фильтра «Unsharp Mask». На микрофотоснимках препаратов, с иммуногистохимической реакцией с антителами к цитокератину-19, проводили выделение каналов 3,3'-диаминобензидина и гематоксилина с использованием функции «Color deconvolution» и стандартных векторов «H+DAB». Пороговую сегментацию осуществляли с применением алгоритмов «Auto Threshold» и «Auto local threshold» (рис. 10). Применяли анализ частиц «Analyze particles». Оценивали абсолютную площадь тимических телец, состоящих из цитокератин19-положительных эпителиальных клеток.

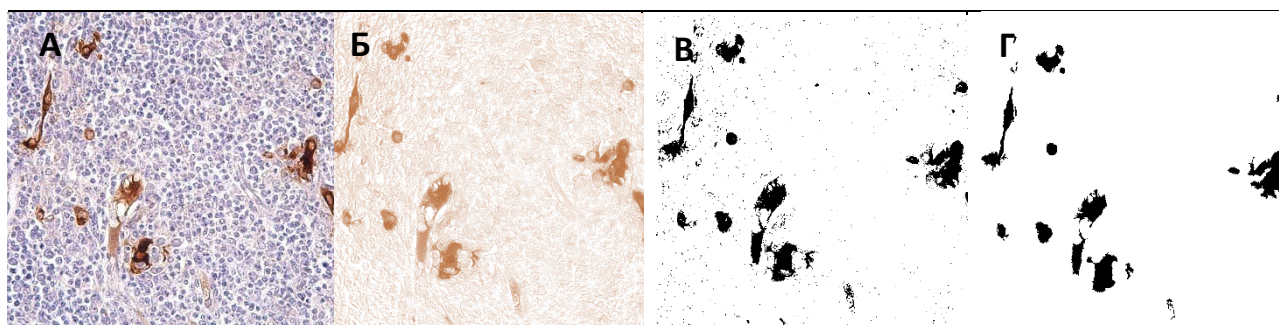


Рис.10. Подготовка к морфометрическому исследованию изображений, полученных при иммуногистохимическом окрашивании гистологических срезов тимуса антителами к цитокератину-19 и докрашенных гематоксилином и эозином (А); Б – выделение каналов 3,3'-диаминобензидина с использованием функции «Color deconvolution» и стандартных векторов «H+DAB»; В, Г – пороговая сегментацию с помощью алгоритмов «Auto Threshold» и «Auto local threshold».

Морфометрическое исследование

На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезах оценивали объемную плотность структурно-функциональных зон тимуса, селезенки методом точечного счета под световым микроскопом Leica DM2000 (Германия) при увеличении 200. Этот метод заключается в наложении на срез окулярной сетки Автандилова Г.Г. (1973), содержащей 100 тест-точек. Точки находятся в вершинах равносторонних треугольников, т.е. равноудалены. Проводили подсчет количества точек, попадающих на ту или иную структурно-функциональную зону органа, в 7-и полях зрения. В гистологических срезах тимуса подсчитывали количество тимических телец, состоящих из 3-5, 5 и более эпителиальных клеток, с отложениями кератогиалина и тимические тельца в виде кистоподобных полостей.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., США), руководствуясь методическим пособием по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований (Мастицкий С. Э., 2009) и статьей А.М. Гржибовского, С.В. Иванова и М.А. Горбатовой «Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: параметрические и непараметрические критерии» (2016). Так как экспериментальные группы были небольшими, 5-14 животных в группе, и исследуемые параметры, как правило, по результатам теста χ^2 были распределены ненормально, использовали методы непараметрической статистики. Вычисляли медиану и интерквартильный размах (Med (25%-75%)), 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 $p < 0,05$. Для построения иллюстраций использовали пакеты STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., США) и Microsoft Office 2016 (Microsoft, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Морфофункциональная характеристика иммунной системы у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и при остром язвенном колите разной тяжести

3.1.1. Морфофункциональная характеристика ободочной кишки

Морфологическая характеристика ободочной кишки

При морфологическом исследовании в стенке ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы слизистая оболочка состояла из эпителия, собственной пластинки слизистой оболочки, мышечной пластинки и подслизистой основы (рис. 11 А, Б). Покровный эпителий был сохранен на всем протяжении продольного среза ободочной кишки и состоял из каемчатых колоноцитов и преимущественно овальной формы бокаловидных клеток. В эпителиальном пласте выявлялись единичные в поле зрения (при увеличении 400) межэпителиальные лимфоциты (рис. 11 Б). Крипты были узкие, глубокие, дно крипт прилегало к мышечной пластинке. Собственная пластинка слизистой оболочки ободочной кишки была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с диффузно рассеянными клеточными элементами: лимфоцитами, макрофагами и единичными плазмócитами (рис. 11 Б). В ней выявлялись лимфоэпителиальные фолликулы, покрытые кубическим эпителием. Мышечная пластинка образована 2-3 слоями гладкомышечных клеток с гомогенной равномерно окрашенной эозинофильной цитоплазмой. В соединительной ткани подслизистой основы выявлялись диффузно рассеянные немногочисленные лимфоциты (рис. 11 В), сосуды микроциркуляторного русла (венулы, артериолы, капилляры), лимфатические сосуды со щелевидными просветами. В подслизистой основе компартмент лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой, был представлен единичными и агрегированными лимфоидными узелками с

герминативными центрами, очаговыми скоплениями и диффузно-рассеянными лимфоцитами и единичными плазмócитами. Мышечная оболочка состояла из циркулярного и продольного слоев гладкомышечных клеток.

На 3-и и 5-ые сутки у мышей C57Bl/6, получавших вместо питьевой воды 1% раствор ДСН, была диарея. У всех мышей, получавших 5% раствор ДСН, в кашицеобразном кале черно-коричневого цвета выявлялась кровь.

При морфологическом исследовании у мышей C57Bl/6, которые вместо воды в течение 5 суток получали 1% раствор ДСН и были выведены из эксперимента на 7-е сутки, в ободочной кишке выявлена картина умеренного острого катарально-язвенного колита, проявления которого в разных зонах стенки ободочной кишки варьировали от минимально до максимально выраженных.

В зонах ободочной кишки с минимально выраженными патоморфологическими изменениями эпителиальная выстилка сохранена на всем протяжении продольного среза ободочной кишки и представлена колоноцитами и бокаловидными клетками, преимущественно округлой формы. В эпителиальном слое выявлялись единичные в поле зрения (при увеличении 400) межэпителиальные лимфоциты. Поверхность эпителия была очагово покрыта слоем слизи, в котором выявлялись лейкоциты и десквамированный эпителий. Просветы части крипт расширены, расстояние между криптами увеличено, часто дно крипт не достигало мышечной пластинки. Базальный отдел собственной пластинки слизистой оболочки расширен, отечный, в нем выявлялись клетки воспалительного инфильтрата — лимфоциты, нейтрофилы, макрофаги, единичные плазмócиты. На светоптическом уровне мышечная пластинка не изменена. Подслизистый слой был расширен, наблюдался его отек, диффузная и очаговая воспалительная инфильтрация лимфоцитами, гистиоцитами и единичными нейтрофилами. Лимфатические сосуды расширены, сосуды микроциркуляторного русла неравномерно полнокровны. В мышечной

оболочке ободочной кишки отличий, по сравнению с контролем, не выявлено.

В зонах ободочной кишки с максимально выраженными альтеративными и воспалительными изменениями (рис. 12) были выявлены язвы (рис. 12 А). Дно язв заполнено массивными скоплениями лейкоцитов и небольшими отложениями эозинофильных масс фибрина у 2-х животных из 14. Собственная пластинка слизистой оболочки в этих зонах была замещена грануляционной тканью с большим количеством тонкостенных сосудов и выраженной воспалительной инфильтрацией макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами (рис. 12 Б). По краям язв выявлялись регенераторные изменения: эпителий крипт высокий, цилиндрический, с гиперхромными ядрами, в этих зонах было много митотически делящихся клеток, а бокаловидные клетки отсутствовали. В зонах ободочной кишки с сохраненной структурой крипт определялись единичные в препарате крипт-абсцессы – скопление нейтрофилов в просвете крипты (рис. 12 В). Мышечная пластинка, образованная 2-3 продольно ориентированными гладкомышечными клетками, при микроскопическом исследовании она была не изменена по сравнению с контролем. Подслизистый слой, прилежащий к дну язв, резко расширен, в нем выраженный отек, воспалительная инфильтрация из макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов, неравномерное полнокровие кровеносных сосудов и стазы в капиллярах. Лимфатические сосуды расширены, в их просвете единичные лимфоциты, а иногда и их скопления. По ходу соединительной ткани, окружающей сосуды, проходящие через циркулярный мышечный слой, наблюдалась слабо выраженная инфильтрация лимфоцитами и макрофагами. На всем протяжении циркулярного и продольного гладкомышечных слоев отмечалось чередование зон со светлыми и темными лейомиоцитами.

При остром язвенном колите, вызванном 5% раствором ДСН, в дистальном отделе ободочной кишки у всех мышей выявлена картина фибринозно-язвенного колита (рис. 13). На большей части поверхности

слизистая оболочка изъязвлена (рис. 13 А). На поверхности язв определялись очаговые наложения масс фибрина и скопления лейкоцитов (рис. 14). Крипты в этих зонах отсутствовали, собственная пластинка слизистой оболочки была замещена грануляционной тканью с большим количеством тонкостенных сосудов, в части которых выявлялись лейкостазы, фибрин и фибриноидный некроз стенки (рис. 13 А, Б). Отмечалась выраженная воспалительная инфильтрация макрофагами, лимфоцитами, нейтрофилами (рис. 13 Б). В отдельных участках наблюдалась эпителизация язв. В небольших зонах ободочной кишки с сохраненной структурой крипт выявлялись крипт-абсцессы. Лейомиоциты мышечной пластинки были очагово некротизированы. Подслизистый слой резко расширен, в нем определялся выраженный отек, воспалительная инфильтрация из макрофагов, лимфоцитов, нейтрофилов (рис. 13 В), неравномерное полнокровие кровеносных сосудов, стазы и сладжи. Лимфатические сосуды резко расширены. На всем протяжении циркулярного и продольного слоев мышечной оболочки отмечалось чередование зон со светлыми и темными миоцитами.

По данным количественной оценки распространенность язвенного процесса в ободочной кишке при колите, индуцированном 5% ДСН, по сравнению с 1%, была в 6 раз выше (табл. 3, рис. 15).

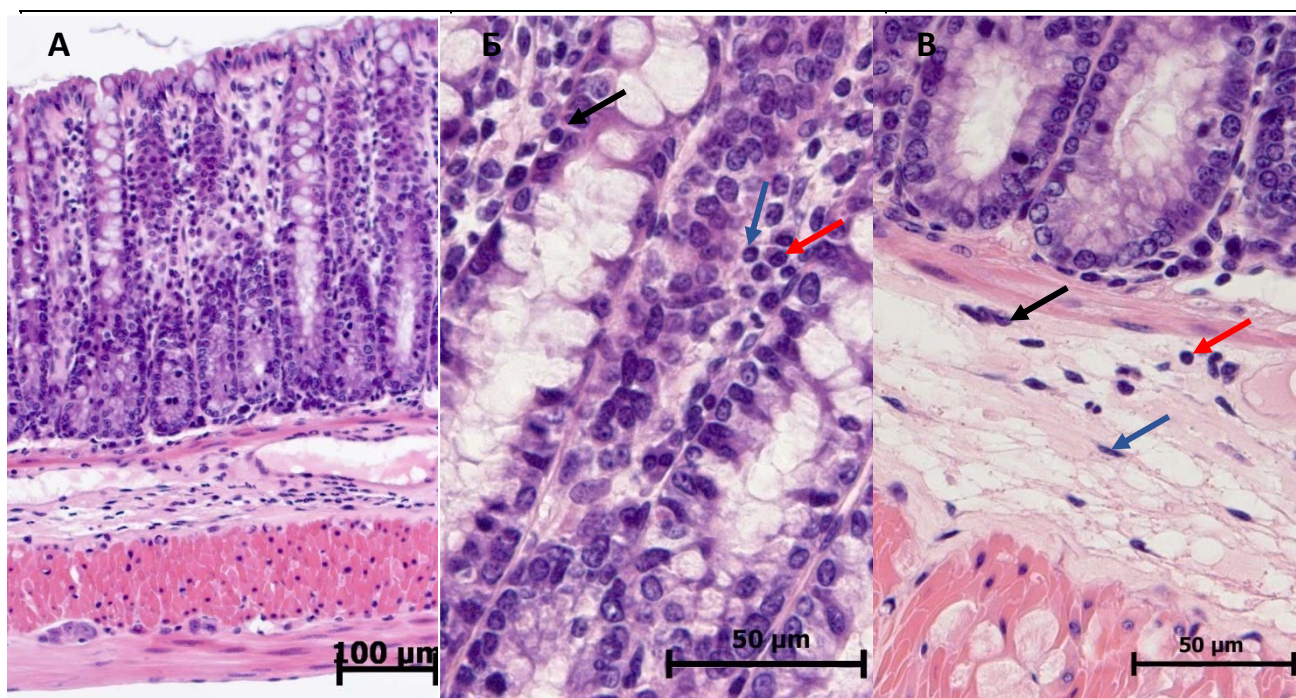


Рис. 11. Морфологическая характеристика ободочной кишки половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы. А – эпителиальная выстилка не нарушена, просветы крипт узкие, много бокаловидных клеток, в соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки небольшое количество клеток, в её базальных отделах лимфатические сосуды со щелевидным просветом, в подслизистом слое кровеносные и лимфатические сосуды, небольшое количество клеток; Б – единичные межэпителиальные лимфоциты (черная стрелка), клеточные элементы собственной пластинки слизистой оболочки, выявляются лимфоциты (синяя стрелка), единичные плазмциты (красная стрелка); В – среди клеточных элементов подслизистой основы – фибробласты (черная стрелка), фиброциты (синяя стрелка), единичные лимфоциты (красная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

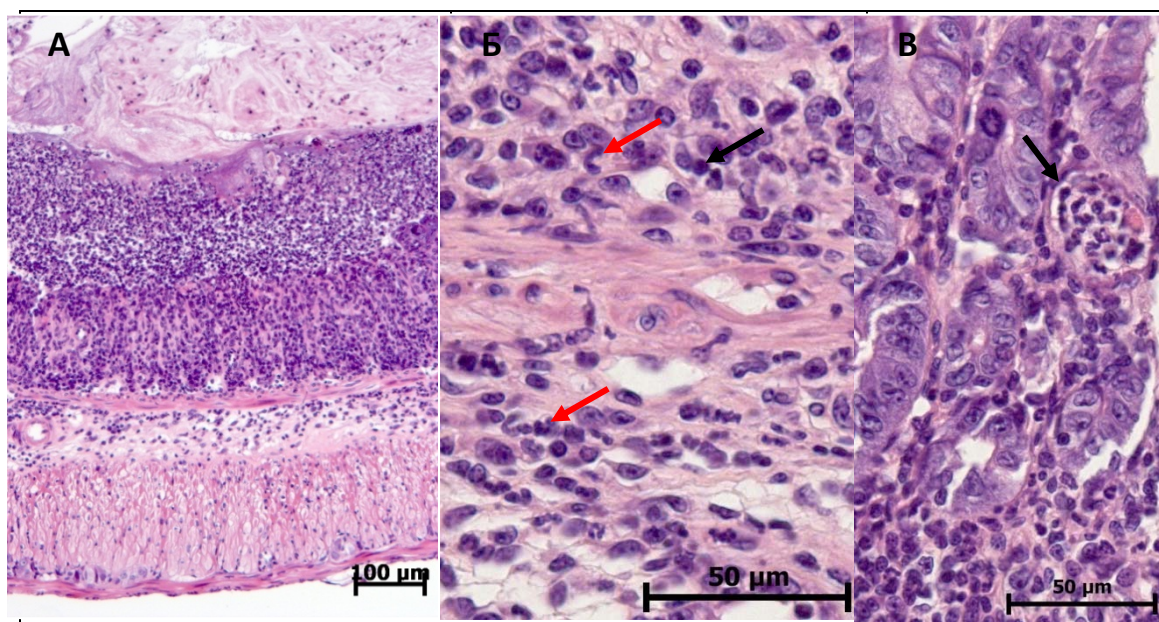


Рис. 12. Морфологическая характеристика ободочной кишки половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с катарально-язвенным колитом. А-В – участок с максимально выраженными патоморфологическими изменениями. А – дно язвы. В пристеночной зоне просвета кишки слизь со скоплениями нейтрофилов и эритроцитов. Дно язвы представлено грануляционной тканью с выраженной воспалительной инфильтрацией. Мышечная пластинка сохранена, подслизистый слой расширен, инфильтрирован. В мышечной оболочке миоциты со светлой и темной цитоплазмой. Б – воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы, выявляются лимфоциты (черная стрелка), нейтрофилы (красная стрелка). В – крипт-абсцесс (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

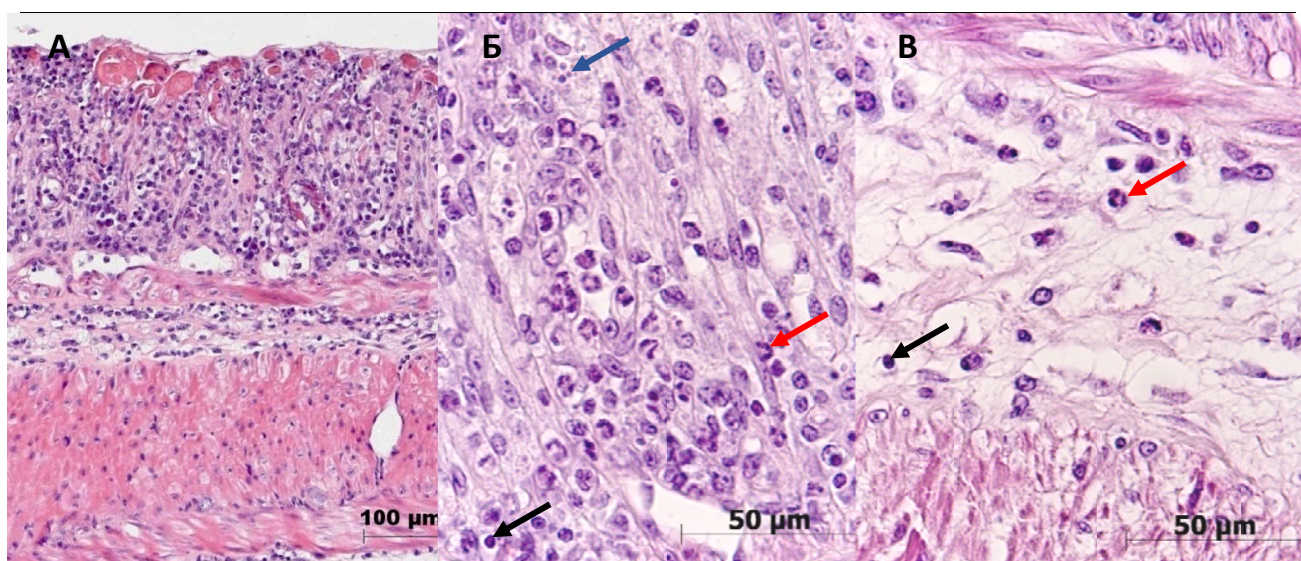


Рис. 13. Морфологическая характеристика ободочной кишки половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с фибринозно-язвенным колитом. А – дно язвы. Дно язвы представлено грануляционной тканью с выраженной воспалительной инфильтрацией, на поверхности язвы отложения масс фибрина. Мышечная пластинка сохранена, подслизистый слой расширен, инфильтрирован. В мышечной оболочке миоциты со светлой и темной цитоплазмой. Б – воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки, выявляются фрагменты ядер (синяя стрелка), лимфоциты (черная стрелка), нейтрофилы (красная стрелка). В – воспалительная инфильтрация подслизистой основы, определяются лимфоциты (черная стрелка), нейтрофилы (красная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

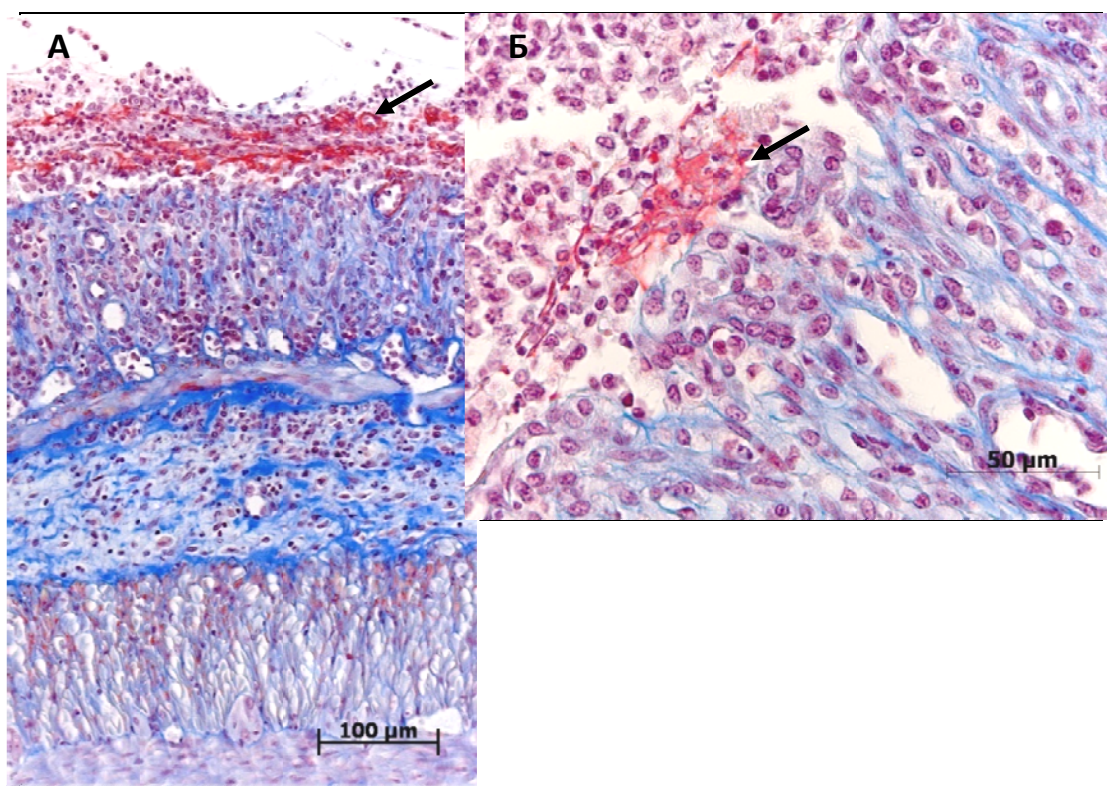


Рис. 14. Морфологическая характеристика ободочной кишки половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с фибринозно-язвенным колитом. На поверхности язвы (А, Б) и в сосудах собственной пластинки слизистой оболочки (А) отложения масс фибрина (черная стрелка). Окраска MSB на фибрин

Относительные показатели длины язв при остром язвенном колите у половозрелых самцов мышей C57Bl/6

Показатели \ Группы	Острый язвенный колит		<i>P</i>
	1% ДСН	5% ДСН	
Длина язв, %	11.04 (10.63; 13.60)	65.31 (52.46; 73.44)	0.0001

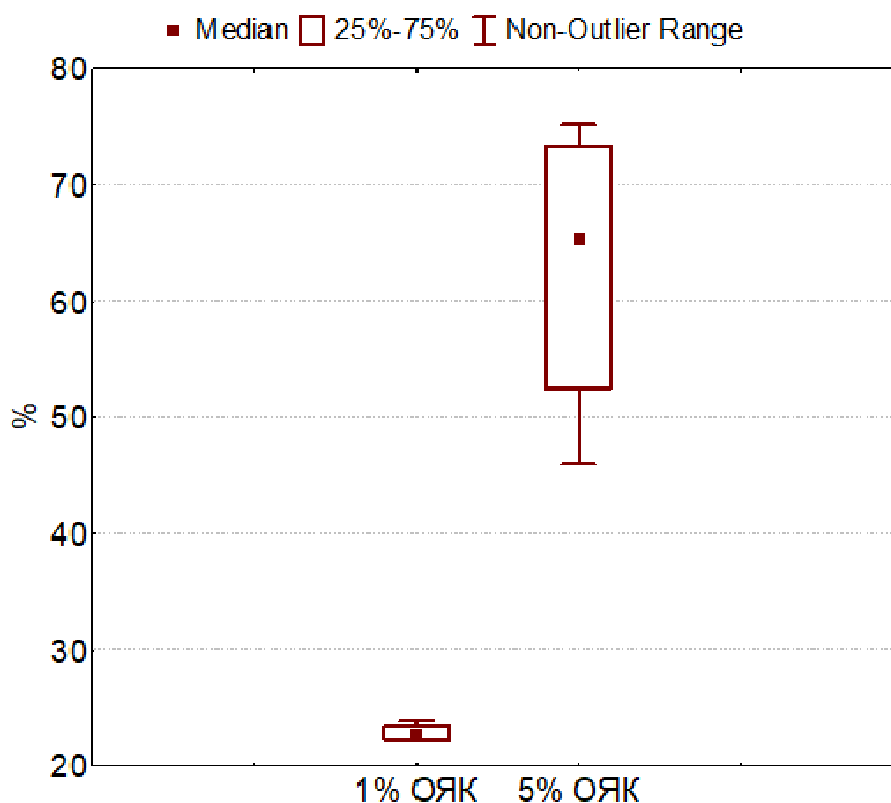


Рис. 15. Относительная длина язв в ободочной кишке у животных с острым язвенным колитом разной тяжести

Таким образом, при морфологическом исследовании в стенке ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы патологических изменений не обнаружено. При остром язвенном колите, индуцированном 1% водным раствором ДСН, выявлен умеренный катарально-язвенный, а при потреблении животными 5% раствора ДСН — тяжелый фибринозно-язвенный колит. По данным количественной оценки на гистологических срезах относительная длина язв в ободочной кишке при

фибринозно-язвенном колите, по сравнению с катарально-язвенным, была в 6 раз выше.

Субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов в суспензии клеток ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6

В суспензии клеток ободочной кишки при остром катарально-язвенном колите по сравнению с контролем увеличивалось относительное содержание $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 4, рис. 19).

При остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с контролем в ободочной кишке было выше содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов, $F4/80^+$ макрофагов, но ниже содержание $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 4, рис. 16-18, 20).

При остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с катарально-язвенным повышалось содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, но снижалось – $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т- и $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 4, рис. 16, 17, 19).

Таким образом, изменения субпопуляционного состава лимфоцитов и макрофагов в стенке ободочной кишки при катарально- и фибринозно-язвенном колите были разнонаправленные и более выраженные при фибринозно-язвенном колите. Количество регуляторных Т-лимфоцитов повышалось при катарально-язвенном колите, а при фибринозно-язвенном показатели их содержания не отличались от контрольной группы. Содержание макрофагов увеличивалось при фибринозно-язвенном колите.

Таблица 4

Субпопуляционный состав лимфоцитов и содержание макрофагов в стенке ободочной кишки половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Ме (25%-75%))

Показатели в % Группы	Контрольная	Острый язвенный колит		P
		1% ДСН	5% ДСН	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	2.9 (1.6; 3.5)	3.6 (3.4; 4.1)	8.1 (6.9; 8.8)	$P_{к-1\%ОЯК}=1,0$ $P_{к-5\%ОЯК}=0,003$ $P_{1-5\%ОЯК}=0,05$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	1.6 (1.0; 2.0)	1.0 (1.0; 1.1)	0.2 (0.2; 0.6)	$P_{к-1\%ОЯК}=0,11$ $P_{к-5\%ОЯК}=0,03$ $P_{1-5\%ОЯК}=0,05$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	1.4 (0.4; 1.8)	11.0 (10.4; 11.5)	30.0 (18.2; 35.6)	$P_{к-1\%ОЯК}=0,001$ $P_{к-5\%ОЯК}=0,001$ $P_{1-5\%ОЯК}=0,48$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	15.4 (14.5; 29.3)	69.0 (66.7; 70.5)	25.3 (15.7; 27.8)	$P_{к-1\%ОЯК}=0,01$ $P_{к-5\%ОЯК}=0,17$ $P_{1-5\%ОЯК}=0,02$
F4/80 ⁺ макрофаги	0.6 (0.6; 1.8)	3.3 (3.2; 3.4)	24.4 (14.9; 28.6)	$P_{к-1\%ОЯК}=0,66$ $P_{к-5\%ОЯК}=0,006$ $P_{1-5\%ОЯК}=0,10$

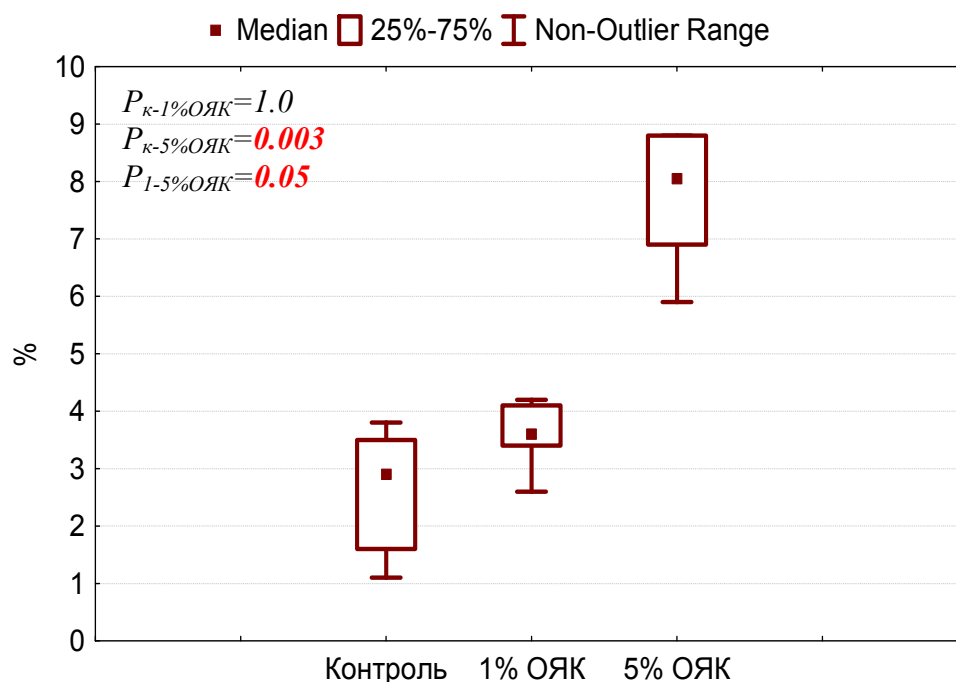


Рис. 16. Относительное содержание CD3⁺CD4⁺Т-хелперов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

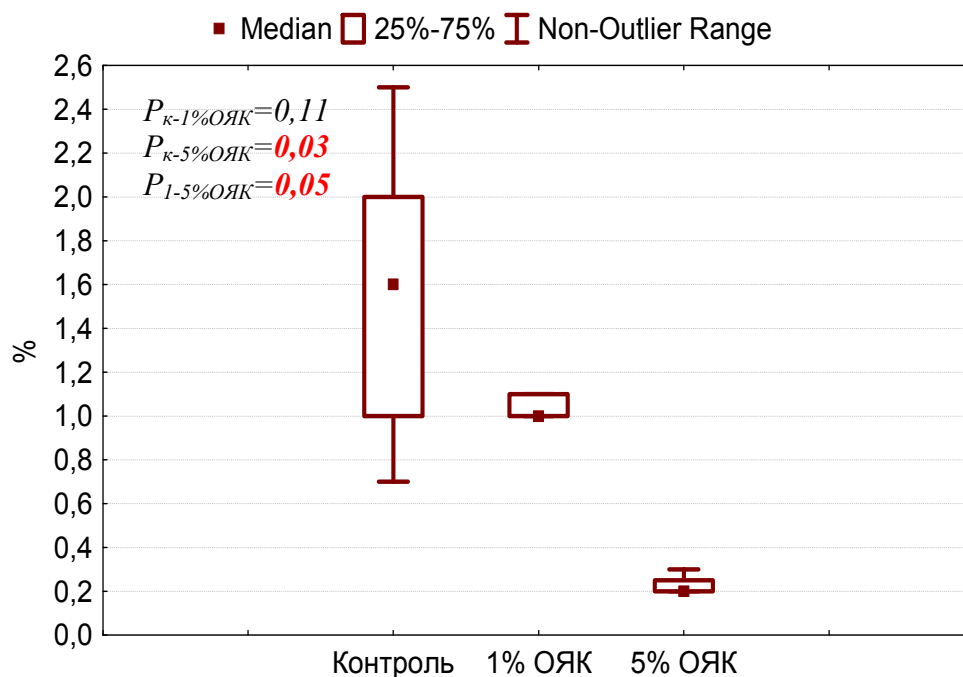


Рис. 17. Относительное содержание $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

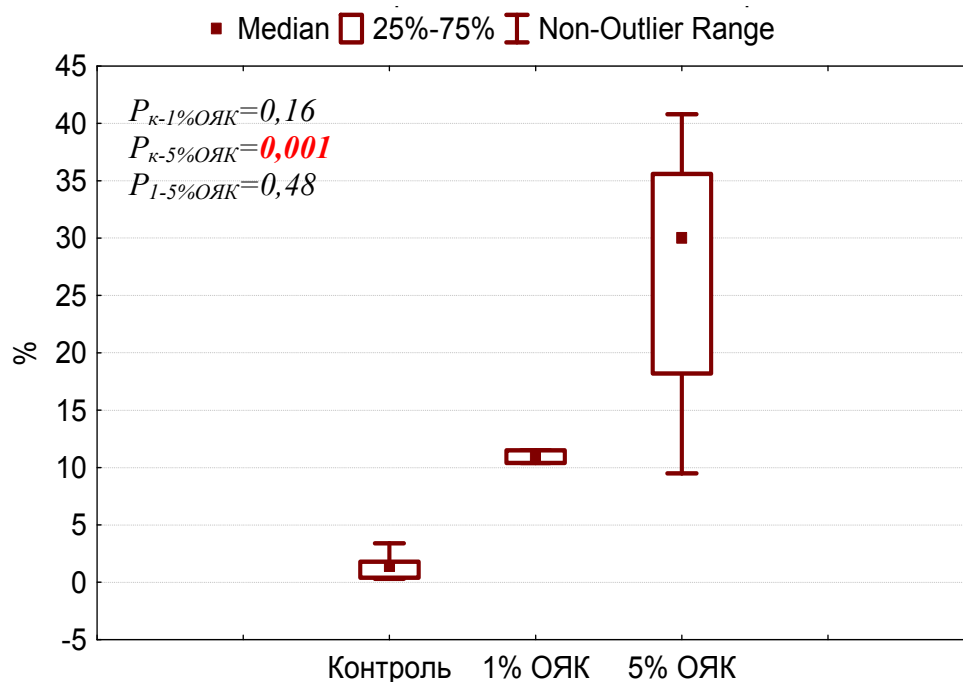


Рис. 18. Относительное содержание $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

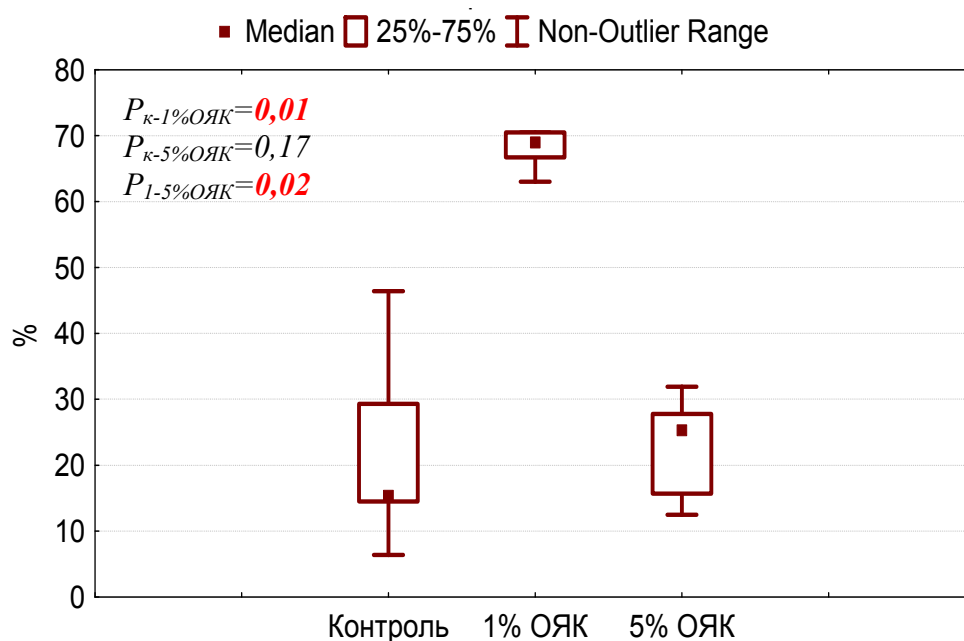


Рис. 19. Относительное содержание $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

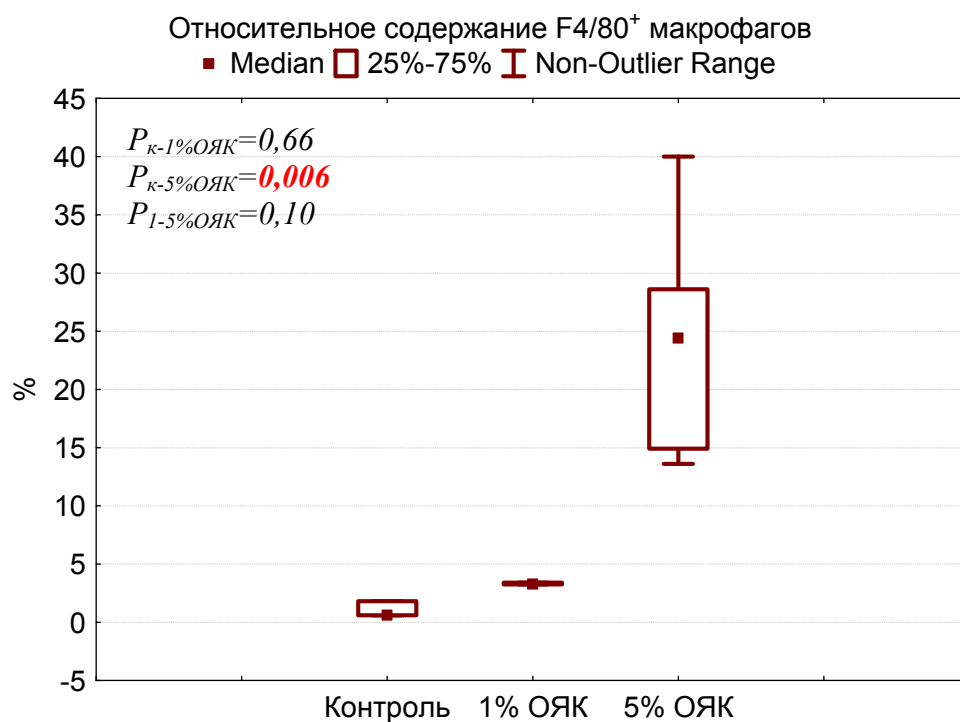


Рис. 20. Относительное содержание $F4/80^+$ макрофагов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

3.1.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови

По сравнению с контролем в периферической крови у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым катарально-язвенным, индуцированным 1% раствором ДСН, и фибринозно-язвенным (5% ДСН) колитом статистически значимо уменьшалось абсолютное количество лимфоцитов (в 1,2 и 2,3 раза соответственно), $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов (1,1 и 1,7 раз), $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т- (1,2 и 1,8 раз) и $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (в 2,2 и 2,5 раза) (табл. 5, рис. 21, 22, 24).

При фибринозно-язвенном колите, по сравнению с контролем, статистически значимо снижалось абсолютное количество лейкоцитов в 1,9 и $CD3^-CD19^+$ В-лимфоцитов в 2,6 раз (табл. 5, рис. 23).

По данным оценки субпопуляций лимфоцитов при нарастании выраженности патологического процесса при остром язвенном колите абсолютное количество $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов и $CD3^-CD19^+$ В-лимфоцитов уменьшалось, в 1,6 и 2,3 раза, соответственно, и в 1,2 раз увеличивалось количество $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 5, рис. 21, 23, 24).

Таблица 5

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Острый язвенный колит		P
			1% ДСН	5% ДСН	
Лейкоциты	10 ⁶ /мл	9.4 (8.80; 9.60)	8.1 (6.90; 8.30)	5.0 (3.7; 12.45)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.05$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.01$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.26$
Лимфоциты	10 ⁶ /мл	7.5 (7.07; 8.1)	6.4 (6.3; 6.6)	3.3 (2.5; 7.53)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.03$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.003$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.15$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	% от лф*	14.8 (14.14; 16.0)	15.4 (12.7; 17.1)	16.4 (7.3; 21.3)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.42$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0006$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.003$
	10 ⁶ /мл	1.17 (1.14; 1.23)	1.09 (0.8; 1.13)	0.67 (0.29; 0.81)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.03$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.002$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	% от лф	12.86 (11.2; 14.6)	12.5 (7.1; 12.9)	13.40 (5.20; 16.6)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.44$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.28$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.36$
	10 ⁶ /мл	1.01 (0.91; 1.17)	0.83 (0.22; 0.91)	0.55 (0.21; 0.71)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.01$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.04$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.38$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	% от лф	65.8 (57.9; 66.8)	62.6 (57.2; 62.9)	46.95 (27.4; 61.9)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.04$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.48$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.07$
	10 ⁶ /мл	4.49 (3.04; 5.35)	4.0 (3.77; 4.08)	1.75 (0.93; 2.51)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.06$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.0001$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	% от Тх [#]	2.8 (2.4; 3.6)	1.4 (1.2; 1.6)	7.15 (6.5; 8.5)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.0002$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.0001$
	10 ³ /мл	33.57 (25.66; 46.82)	15.24 (4.42; 15.26)	13.27 (10.71; 22.54)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.0001$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0004$ $P_{l-5\%ОЯК}=0.02$

Условные обозначения: * Лф – лимфоциты; [#]Тх – Т-хелперы

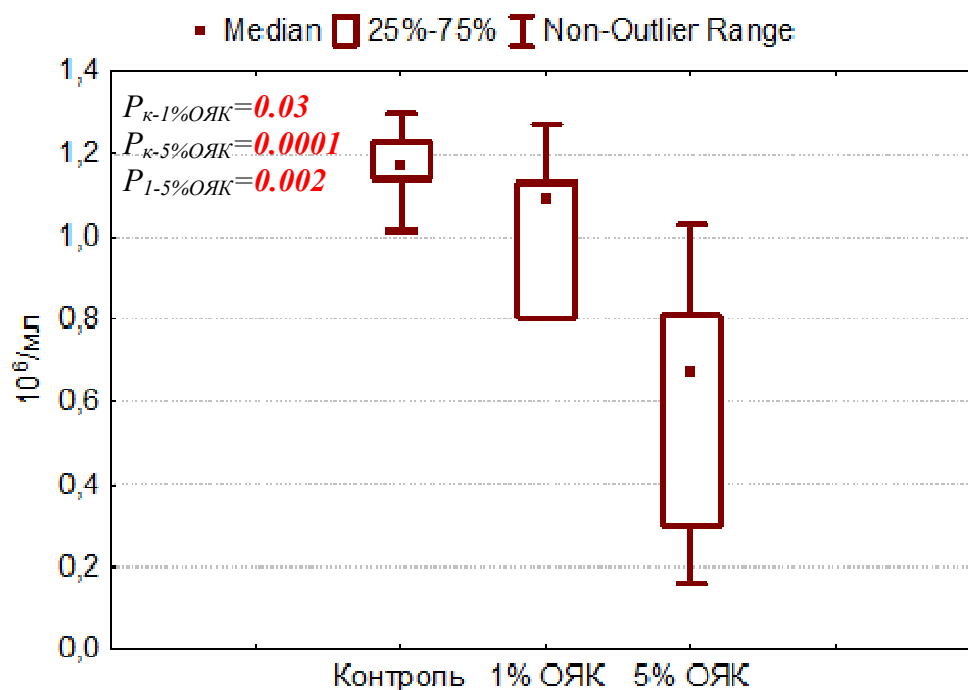


Рис. 21. Абсолютное количество $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов в периферической крови у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

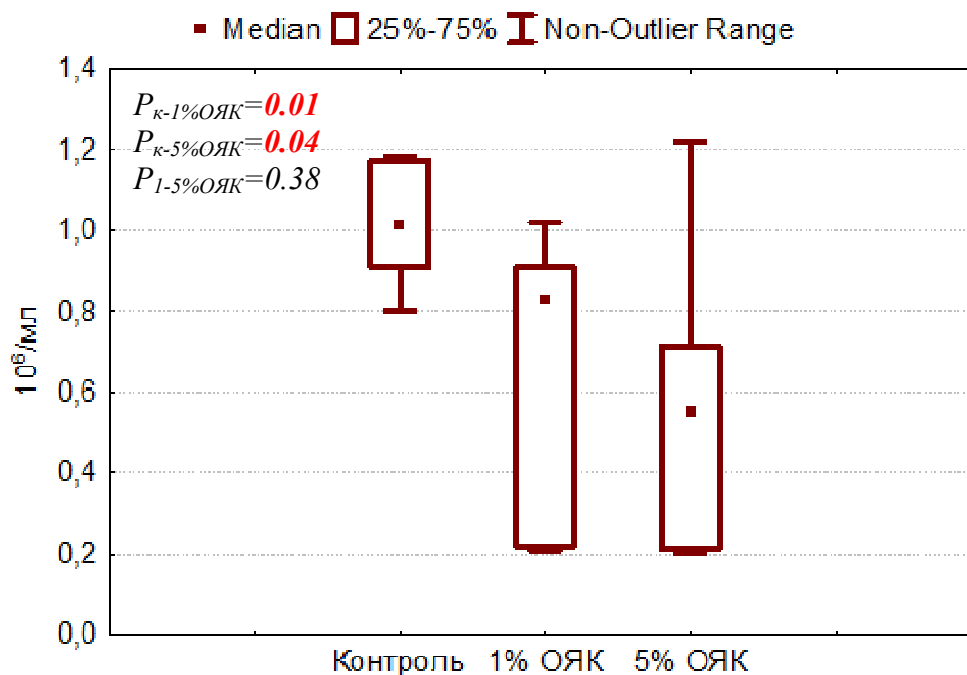


Рис. 22. Абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

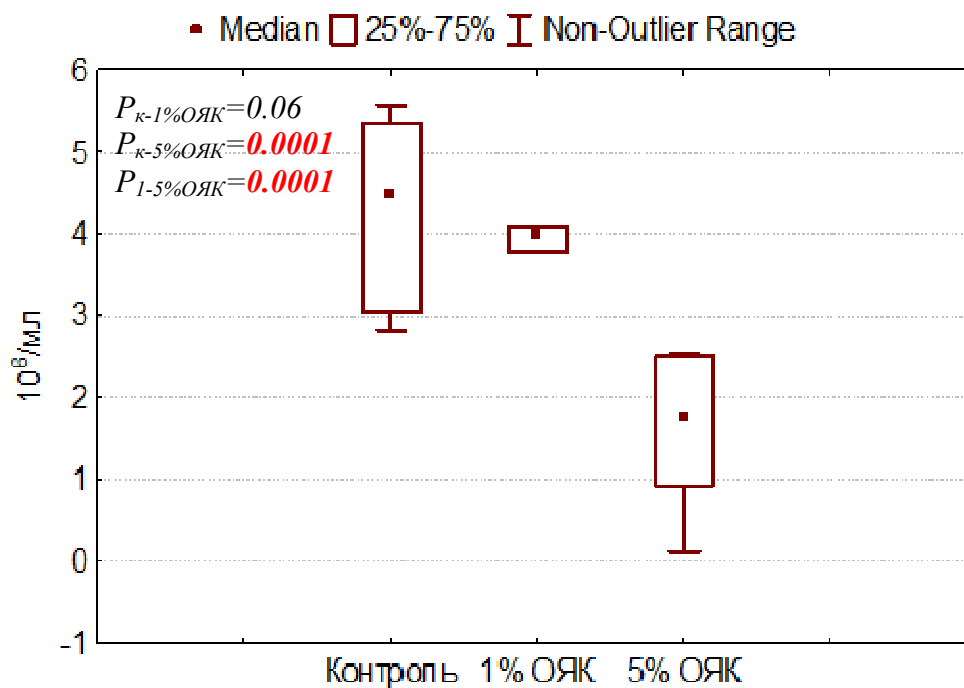


Рис. 23. Абсолютное количество CD3⁺CD19⁺В-лимфоцитов в периферической крови у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

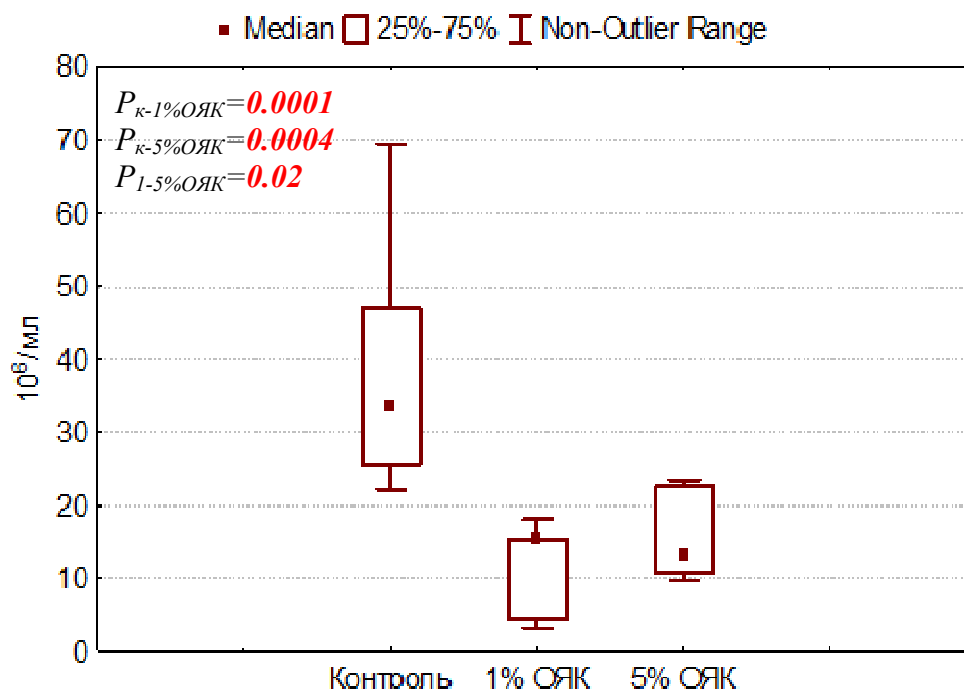


Рис.24. Абсолютное количество CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

3.1.3. Уровень эндотоксина в сыворотке крови

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у мышей с катарально-язвенным колитом, индуцированным 1% раствором ДСН, был в 3.8 раз выше, чем у животных контрольной группы, а у мышей с тяжелым фибринозно-язвенным колитом (5% раствор ДСН) – в 10 раз выше, чем у животных контрольной группы (табл. 6, рис. 25). В сыворотке крови у животных с тяжелым фибринозно-язвенным колитом содержание эндотоксина в 2.5 раз выше, чем в группе мышей с катарально-язвенным колитом (табл. 6, рис. 25).

Таблица 6

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы	Контрольная	Острый язвенный колит		P
		1% ДСН	5% ДСН	
Эндотоксин (EU/ml)	0.08 (0; 0.24)	0.31 (0.21; 0.44)	0.77 (0.57; 0.93)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.04$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0006$ $P_{1-5\%ОЯК}=0.02$

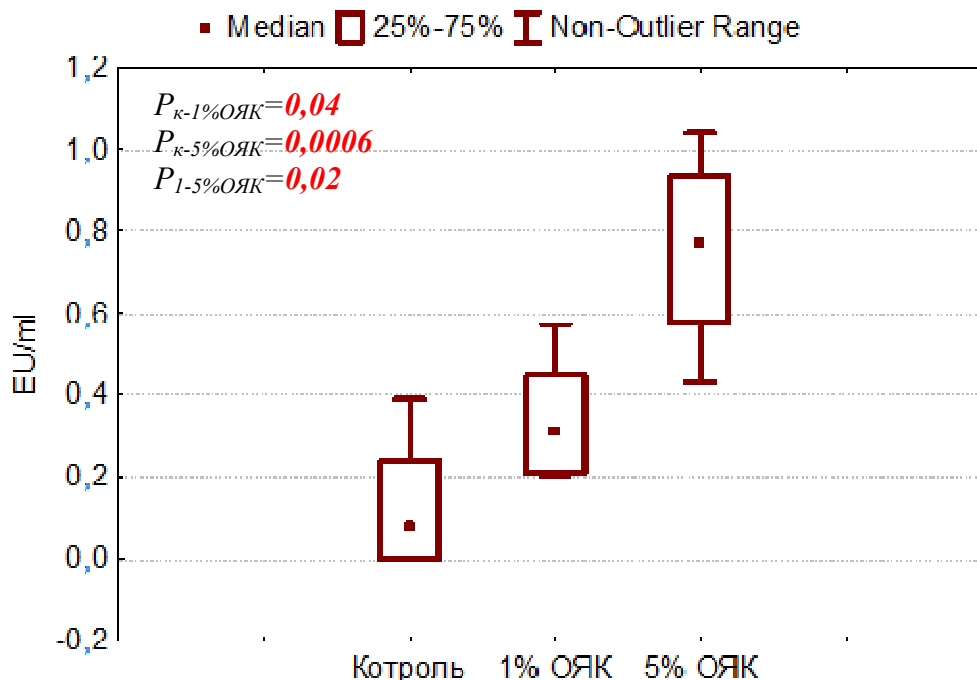


Рис. 25 Уровень эндотоксина в сыворотке крови у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

3.1.4. Морфофункциональная характеристика тимуса

Морфологическая характеристика тимуса

При морфологическом исследовании в тимусе у половозрелых самцов контрольной группы соотношение коркового и мозгового вещества составляло примерно 2:1 (рис. 26 А, Б). Корковое вещество было представлено плотно расположенными лимфоцитами и эпителиальными клетками. Границы между корковым и мозговым веществом были четкими (рис. 26 А, Б). Субкапсулярная зона тимуса представлена 4-8 рядами лимфобластов. Среди лимфобластов субкапсулярной зоны при увеличении 400 выявлялись единичные в поле зрения митотически делящиеся клетки. Мозговое вещество тимуса было представлено равномерно распределенными эпителиальными клетками и лимфоцитами. В нем выявлялись многочисленные тимические тельца, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток (рис. 26 В, Г), а также единичные в препарате тимические тельца с небольшими отложениями кератогиалина (рис. 26 Г).

При остром катарально-язвенном колите в тимусе у половозрелых самцов мышей С57В1/6 выявлялась умеренная акцидентальная инволюция. Соотношение коркового и мозгового вещества составляло примерно 1:1 (рис. 27 А, Б). Корковое вещество было очаговоопустошено, в части долек выявлялась картина «звездного неба» (рис. 27 Б), что является следствием увеличения в коре количества макрофагов, фагоцитирующих гибнущие тимоциты. Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткие (рис. 27 Б). Субкапсулярная зона тимуса представлена 6-12 рядами лимфобластов. Среди лимфобластов субкапсулярной зоны выявлялось 5-8 митотически делящихся клеток в поле зрения (при увеличении 400). В мозговом веществе тимуса выявлялись эпителиальные клетки и лимфоциты, причем лимфоциты преобладали. В мозговом веществе определялись многочисленные тимические тельца (рис. 28): из 3-7 и более эпителиальных

клеток, с отложениями кератогиалина, кистоподобные тимические тельца (рис. 27 Б, Г, рис. 28 В, Г).

При морфологическом исследовании в тимусе у половозрелых самцов мышей С57Bl/6 при остром фибринозно-язвенном колите выявлялась выраженная акцидентальная инволюция. Дольки тимуса были небольших размеров, спавшиеся, с инверсией коркового и мозгового вещества (рис. 29), с большим количеством фрагментов ядер гибнущих тимоцитов (рис. 29 Б). В некоторых дольках корковое вещество сохранялось, но было резко сужено (рис. 29 В). Мозговое вещество тимуса опустошено, в нем преобладали эпителиальные клетки, выявлялись многочисленные тимические тельца из 3-7 и более эпителиальных клеток, а также с отложениями кератогиалина. Тимические тельца в виде кистоподобных полостей были большого диаметра, в некоторых из них определялись сосочкоподобные выросты (рис. 30).

По данным морфометрического исследования у животных контрольной группы преобладало корковое вещество, объемная доля которого составила 65.0%, а индекс отношения объемной доли коркового вещества к мозговому 2.3 (табл. 7, рис. 31). У мышей при остром катарально- и фибринозно-язвенном колите, по сравнению с контрольной группой, статистически значимо снижался в 1,3 и 6 раз, соответственно, показатель объемной доли коркового вещества и индекс отношения коркового вещества к мозговому (табл. 7, рис. 31).

Таким образом, по данным морфологического и морфометрического исследования строение тимуса животных контрольной группы соответствовало нормальному, реактивные изменения в нем отсутствовали. При остром катарально-язвенном колите у половозрелых самцов мышей С57Bl/6 развивается умеренная инволюция тимуса, характеризующаяся опустошением и уменьшением объемной доли коркового вещества, увеличением показателя площади тимических телец и содержания телец поздних фаз развития, а при тяжелом фибринозно-язвенном колите в тимусе

развивается выраженная акцидентальная инволюция, характеризующаяся резким опустошением коркового вещества, инверсией слоев.

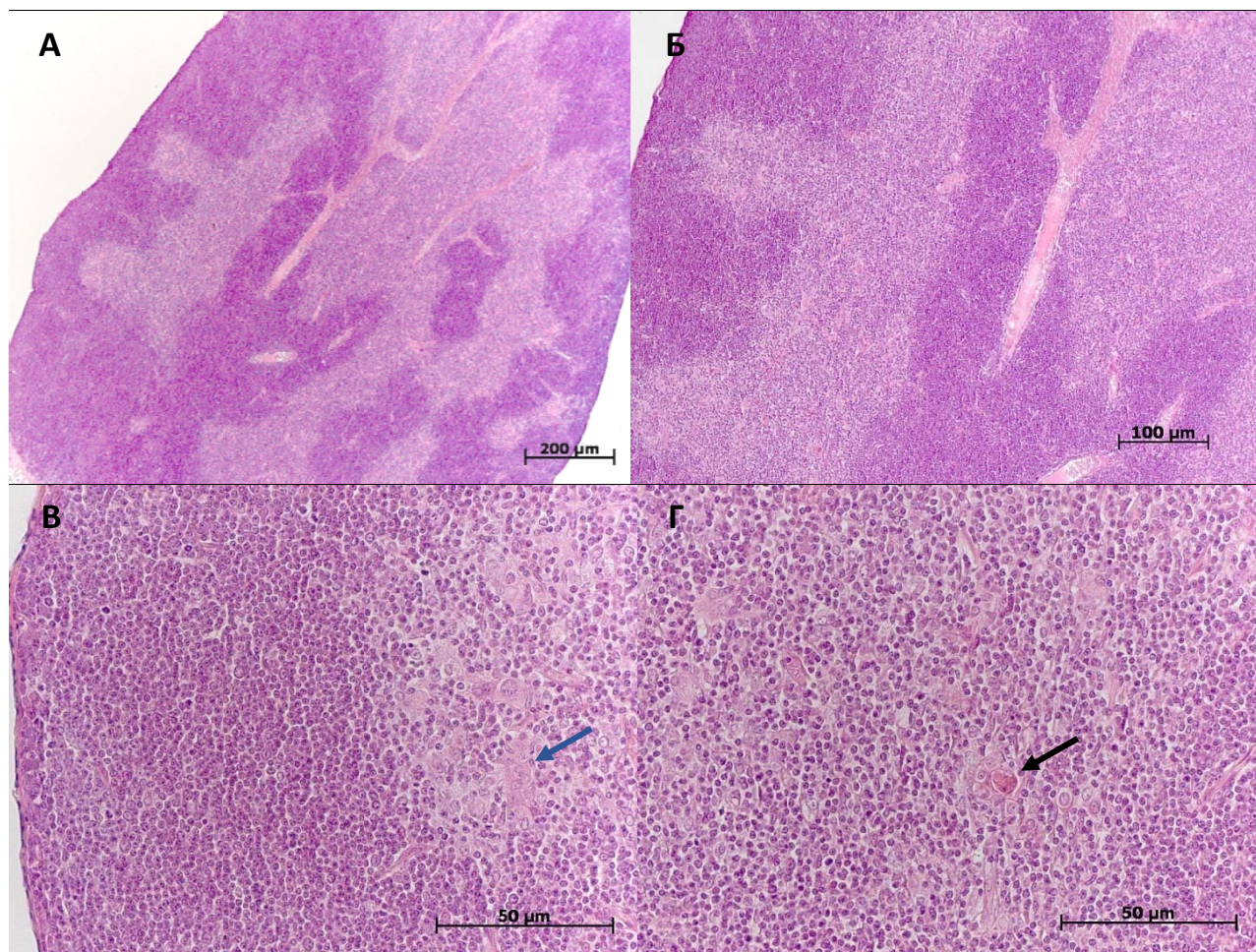


Рис. 26. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы. А, Б – корковое вещество плотно заселено лимфоцитами; В – субкапсулярная зона тимуса выражена, корковое вещество плотно заселено лимфоцитами, границы между корковым и мозговым веществом четкие, в мозговом веществе тимические тельца, состоящие из скопления эпителиальных клеток (синяя стрелка). Г – мозговое вещество. Тимические тельца, состоящие из скопления эпителиальных клеток, единичное в поле зрения тимическое тельце с отложениями кератогиалина (чёрная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

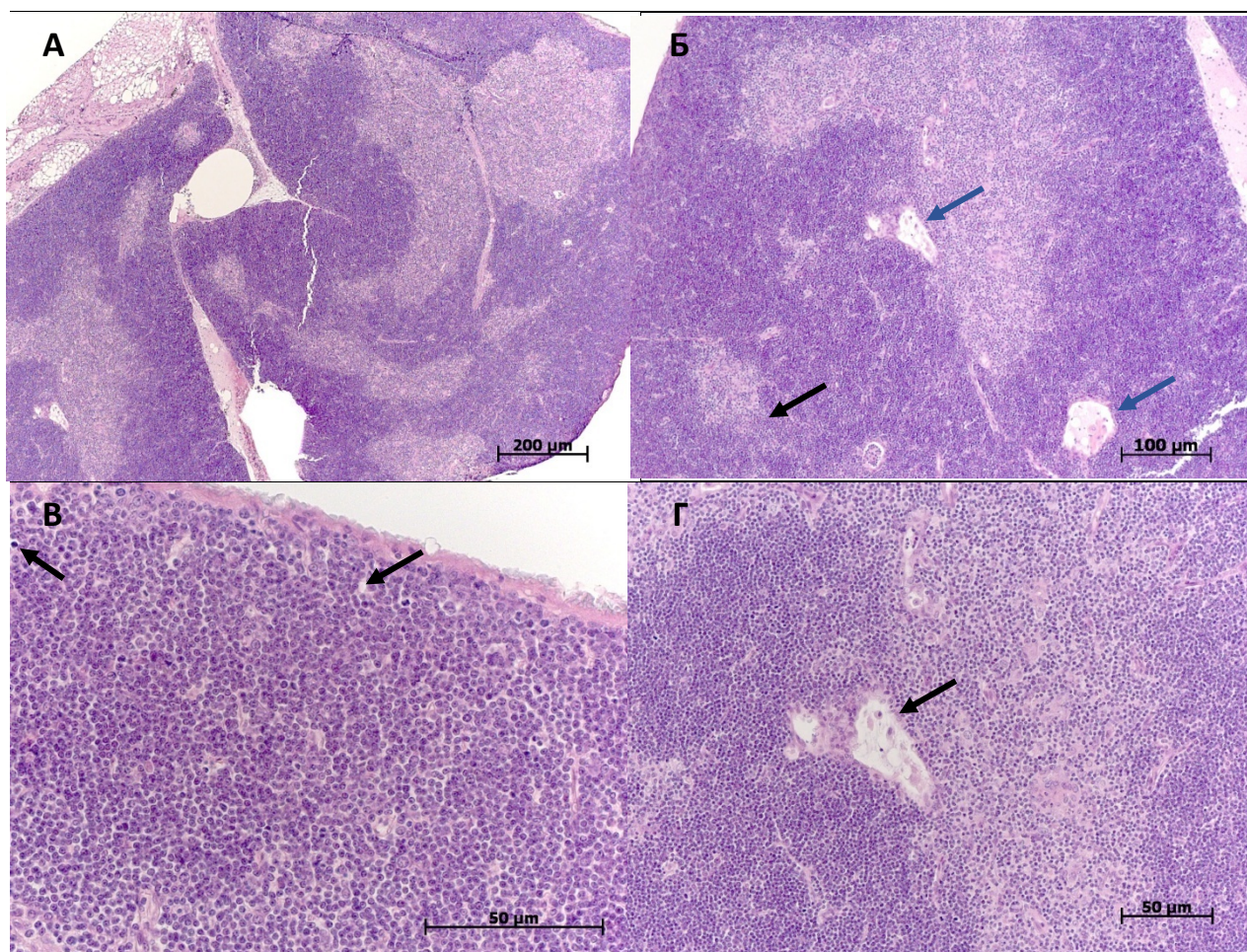


Рис. 27. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым катарально-язвенным колитом. А-Г – умеренная акцидентальная инволюция тимуса. А, Б – границы коркового и мозгового вещества очагово нечеткие, тимические тельца в виде кистоподобных полостей в корковом веществе и на границе коркового и мозгового вещества (синяя стрелка); В – субкапсулярная зона тимуса и корковое вещество неплотно заселены лимфоцитами, выявляются гибнущие клетки (черная стрелка). Г – на границе коркового и мозгового вещества тимическое тельце в виде кистоподобной полости (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

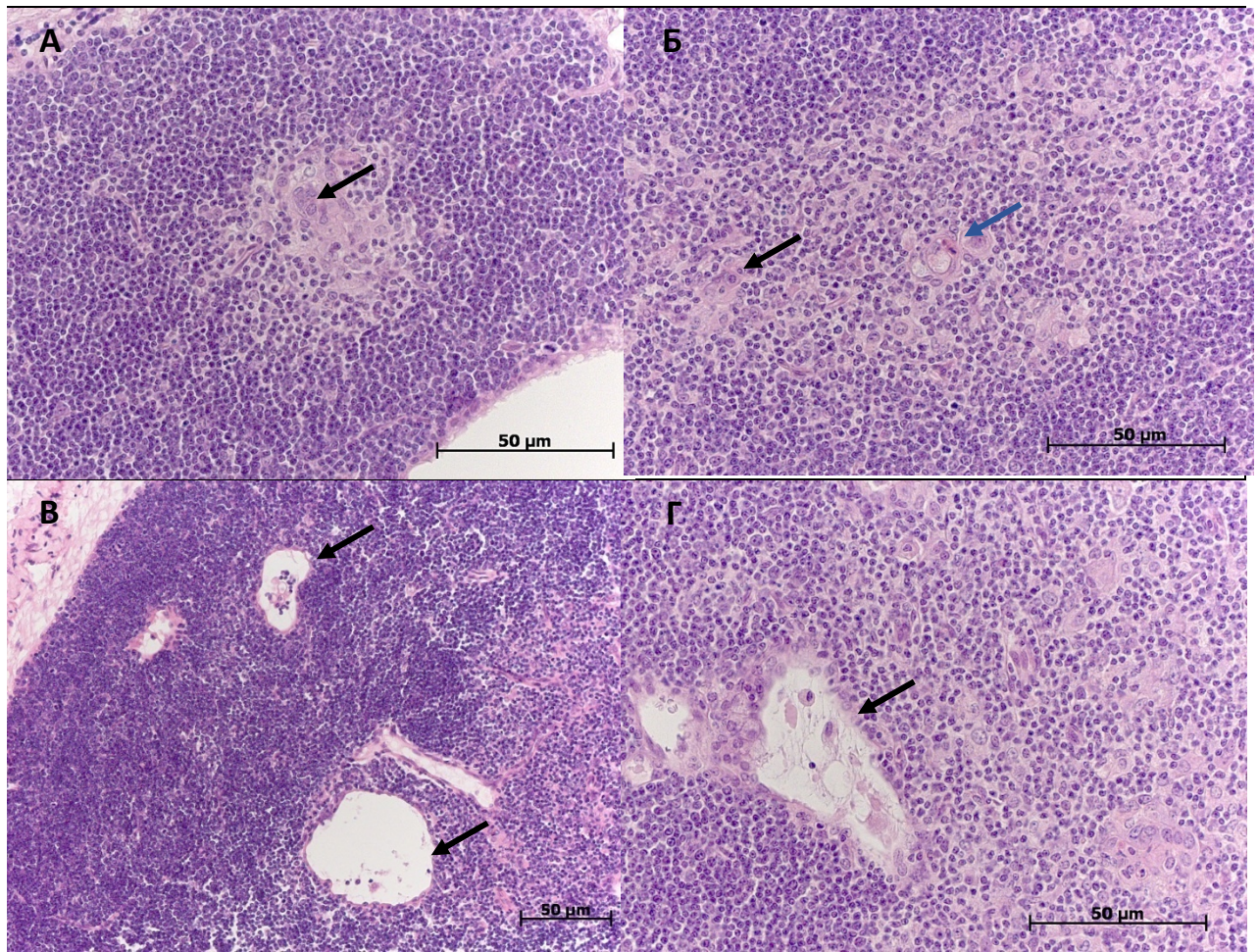


Рис. 28. Морфологическая характеристика тимических телец у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым катарально-язвенным колитом. А-Г – тимические тельца при умеренной акцидентальной инволюции. А, Б – тимические тельца, состоящие из скопления эпителиальных клеток (черная стрелка); Б – тимическое тельце с отложениями кератогиалина (синяя стрелка); В – в корковом веществе, а также на границе коркового и мозгового вещества тимические тельца в виде кистоподобных полостей (черная стрелка); Г – на границе коркового и мозгового вещества тимическое тельце в виде кистоподобной полости, в мозговом веществе тимическое тельце, состоящее из скопления эпителиальных клеток (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

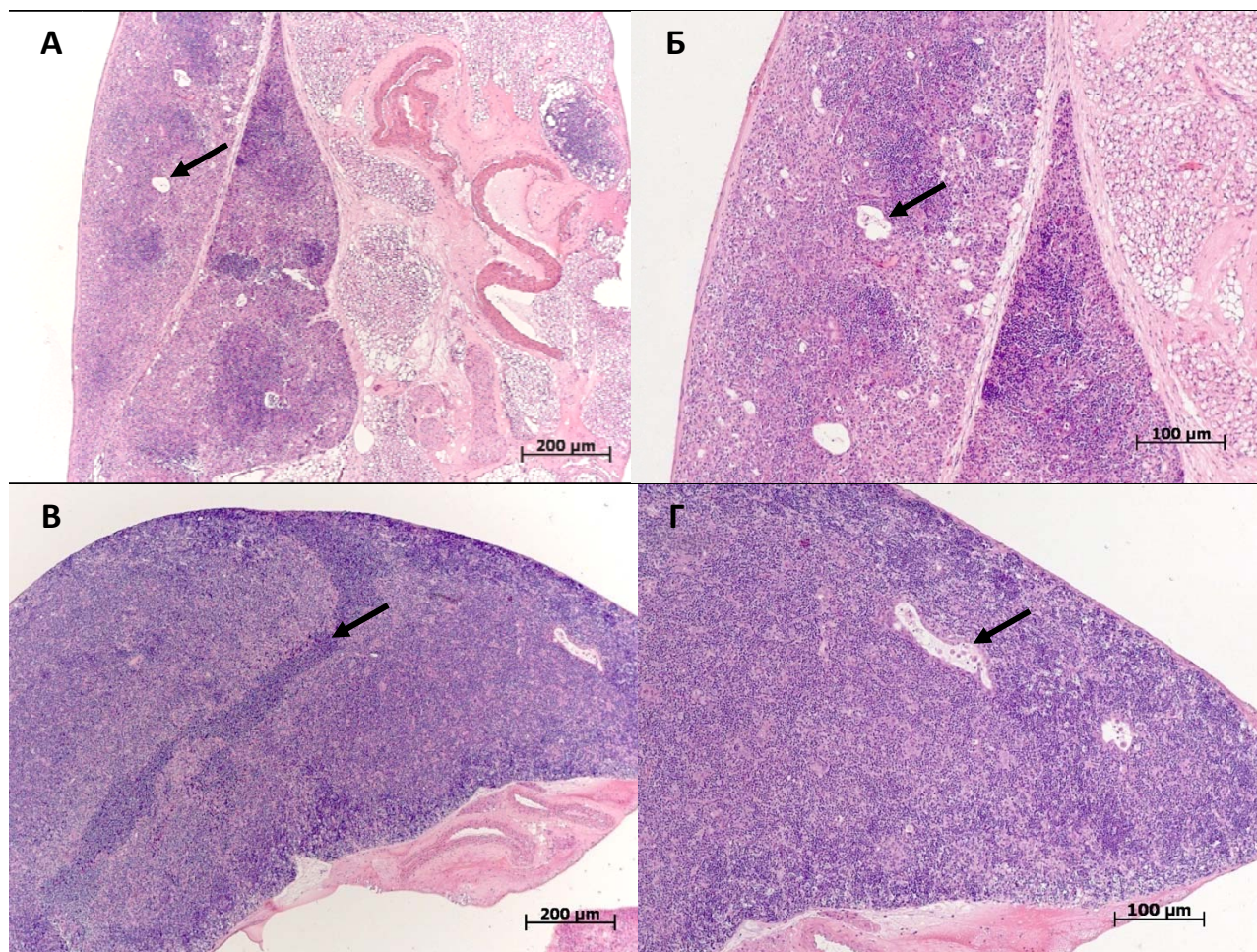


Рис. 29. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым фибринозно-язвенным колитом. А-Г – выраженная акцидентальная инволюция тимуса. А, Б – дольки тимуса резко уменьшены. Инверсия коркового и мозгового вещества, корковое вещество тимуса резко опустошено, в нем выявляются тимические тельца в виде кистоподобных полостей (черная стрелка); В, Г – корковое вещество тимуса резко сужено (черная стрелка), преобладает мозговое вещество; Г – на границе коркового и мозгового вещества выявляются тимические тельца в виде кистоподобных полостей (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

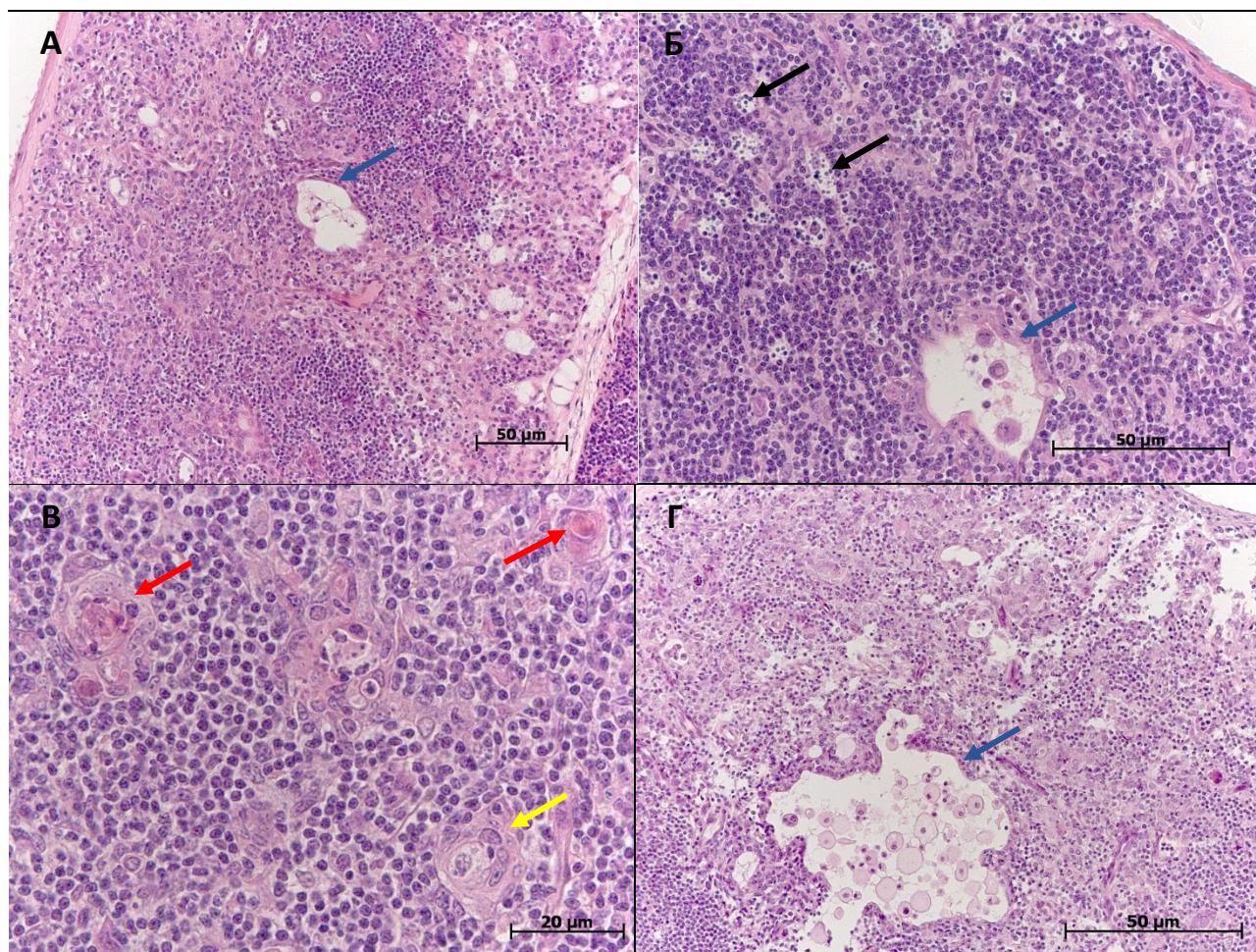


Рис. 30. Морфологическая характеристика тимических телец у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым фибринозно-язвенным колитом. А-Г – тимические тельца при выраженной акцидентальной инволюции. А, Б – корковое вещество тимуса резко опустошено, в нем выявляется картина «звездного неба», очаговые просветления, в которых определяются фрагменты ядер в субкапсулярной зоне тимуса (черная стрелка); А, Б, Г – тимические тельца в виде кистоподобных полостей, располагающиеся на границе коркового и мозгового вещества (синяя стрелка); Б, Г – тимические тельца, в кистоподобных полостях которых выявляются лимфоциты, макрофаги, а также эозинофильные массы; В – многочисленные тимические тельца с отложениями кератогиалина (красная стрелка), а также тимическое тельце, состоящее из скопления эпителиальных клеток (желтая стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

Таблица 7

Морфометрические показатели объемной доли структурно-функциональных зон тимуса у половозрелых самцов мышей С57В1/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Ме (25%-75%))

Показатели	Группы	Острый язвенный колит		P
		1% ДСН	5% ДСН	
Корковое вещество, в %	65.0 (62.5;73.5)	50.0 (48.0;53.0)	11,5 (2,0; 15,0)	$P_{K-1\%ОЯК}=0.00001$ $P_{K-5\%ОЯК}=0.00001$ $P_{I-5\%ОЯК}=0.003$
Мозговое вещество, в %	30.5 (24.0;36.5)	50.0 (47.0;52.0)	88,5 (58,0; 98,0)	$P_{K-1\%ОЯК}=0.00001$ $P_{K-5\%ОЯК}=0.00001$ $P_{I-5\%ОЯК}=0.004$
Индекс отношения объемной плотности коркового вещества к мозговому, усл. ед.	2,2 (1,7;2,8)	1.0 (0.9;1.1)	0,1 (0,02; 0,2)	$P_{K-1\%ОЯК}=0.00001$ $P_{K-5\%ОЯК}=0.00001$ $P_{I-5\%ОЯК}=0.004$

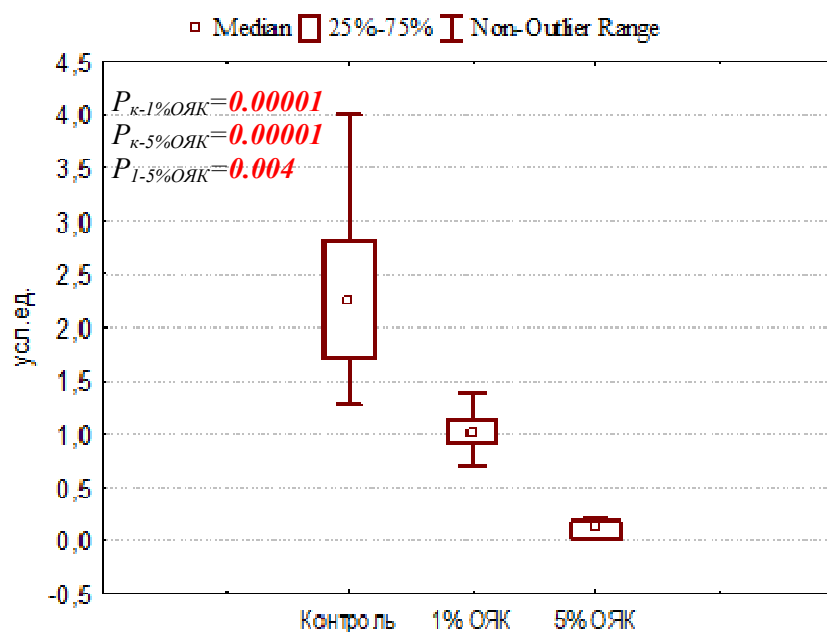


Рис. 31. Индекс отношения объемной плотности коркового вещества к мозговому у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

Субпопуляционный состав лимфоцитов и содержание гибнущих клеток в тимусе

В тимусе при остром катарально-язвенном колите по сравнению с контролем уменьшалось общее количество лимфоцитов, $CD3^+CD19^+$ В-, $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-, незрелых $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD4^+CD25^+$ FOXP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов (табл.8, рис. 32-36).

При остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с контролем в тимусе снижалось количество лимфоцитов, $CD3^+CD19^+$ В-, $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-, незрелых $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов, $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов (табл. 8, рис. 32-35).

При остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с катарально-язвенным снижалось общее количество лимфоцитов, $CD3^+CD19^+$ В-, незрелых $CD4^+CD8^+$ лимфоцитов (табл. 8, рис. 34, 35).

По сравнению с контролем как при остром катарально-язвенном, так и при фибринозно-язвенном колите в тимусе увеличивалось содержание AnnV⁺P⁺ клеток, гибнущих по механизму апоптоза, в 1.2 и 1.8 раз. При нарастании выраженности патологического процесса при остром язвенном колите содержание гибнущих клеток повышалось в 1.5 раза (табл. 9, рис. 37).

Таблица 8

Субпопуляционный состав лимфоцитов в тимусе половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Острый язвенный колит		P
			1% ДСН	5% ДСН	
Лимфоциты	10 ⁶ /мл	47.3 (35.8; 56.7)	10.9 (8.0; 11.0)	5.3 (4.9; 5.4)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0007$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0002$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0003$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	% от лф*	16.7 (14.7; 19.5)	13.5 (13.2; 16.1)	26.1 (20.6; 32.1)	$P_{K-1\%OЯК}=0.04$ $P_{K-5\%OЯК}=0.01$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0002$
	10 ⁶ /мл	7.9 (5.2; 11.1)	1.77 (1.05; 1.78)	1.2 (1.01; 1.7)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.34$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	% от лф	7.8 (6.9; 8.8)	5.1 (5.0; 5.2)	14.1 (9.6; 14.3)	$P_{K-1\%OЯК}=0.00001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.07$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
	10 ⁶ /мл	3.6 (2.5; 5.1)	0.55 (0.41; 0.65)	0.7 (0.4; 0.7)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.28$
CD4 ⁺ CD8 ⁺ дубль позитивные лимфоциты	% от лф	32.45 (24.2; 37.5)	30.8 (29.5; 33.1)	11.9 (9.7; 12.0)	$P_{K-1\%OЯК}=0.5$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
	10 ⁶ /мл	13.3 (10.2; 16.7)	3.24 (2.27; 3.35)	0.6 (0.5; 0.7)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0003$ $P_{K-5\%OЯК}=0.00001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.01$
CD3 ⁻ CD19 ⁺ В-лимфоциты	% от лф	0.5 (0.4; 0.6)	0.8 (0.3; 0.9)	0.4 (0.4; 0.4)	$P_{K-1\%OЯК}=0.46$ $P_{K-5\%OЯК}=0.1$ $P_{I-5\%OЯК}=0.1$
	10 ⁶ /мл	0.2 (0.1; 0.3)	0.09 (0.03; 0.13)	0.02 (0.01; 0.03)	$P_{K-1\%OЯК}=0.008$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0003$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	% от Тх [#]	0.4 (0.4; 0.8)	0.4 (0.3; 0.4)	2.2 (1.4; 2.3)	$P_{K-1\%OЯК}=0.08$ $P_{K-5\%OЯК}=0.008$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
	10 ³ /мл	25.8 (16.2; 38.1)	0.03 (0.03; 0.04)	39.8 (14.1; 40.9)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.056$ $P_{I-5\%OЯК}=0.009$

Условные обозначения: * Лф – лимфоциты; [#]Тх – Т-хелперы

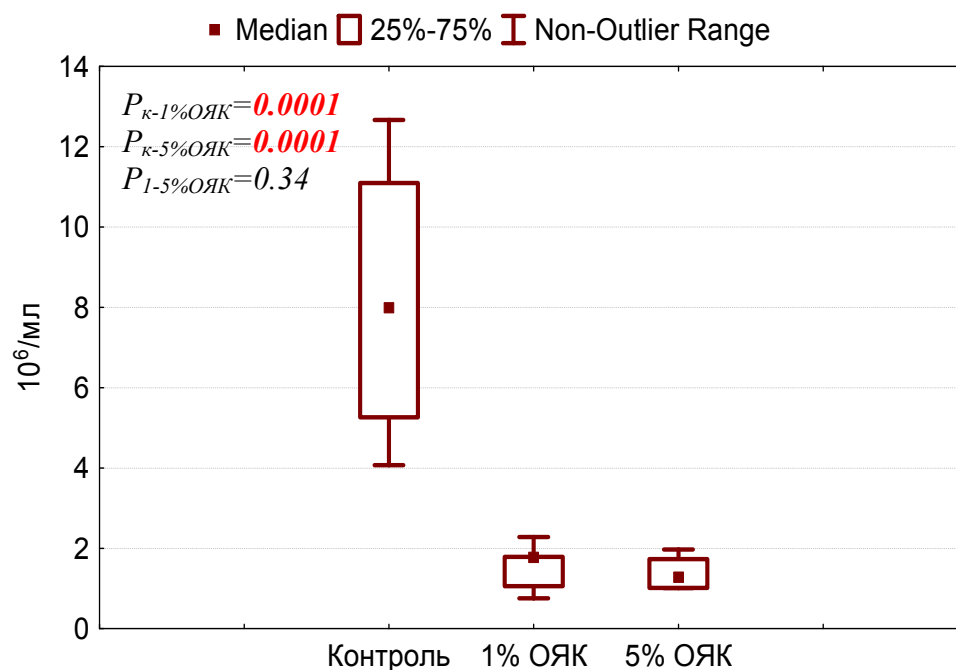


Рис. 32. Абсолютное количество $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

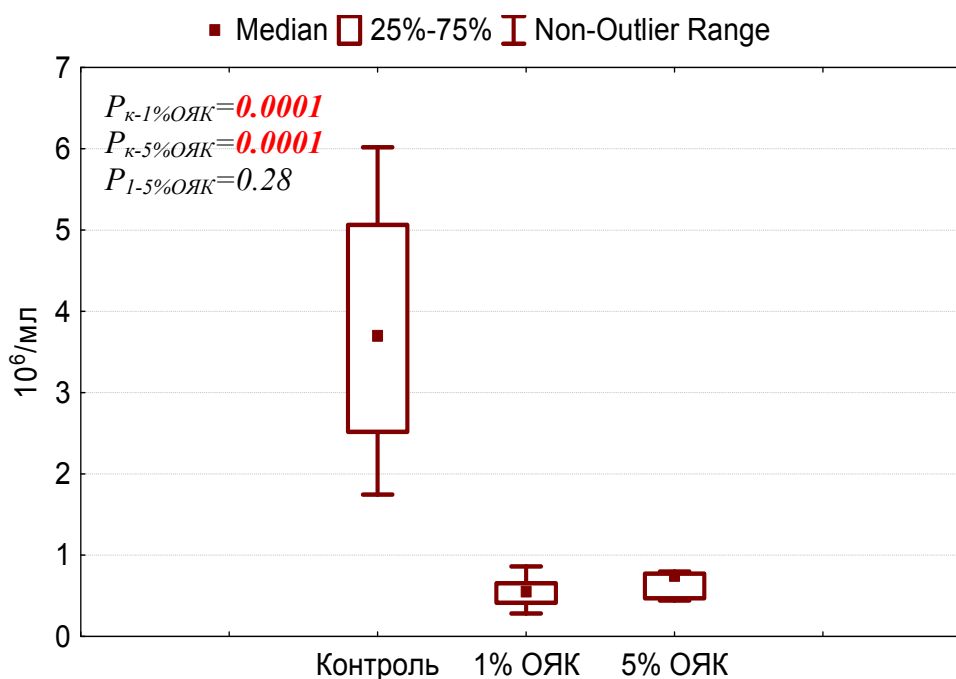


Рис.33. Абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

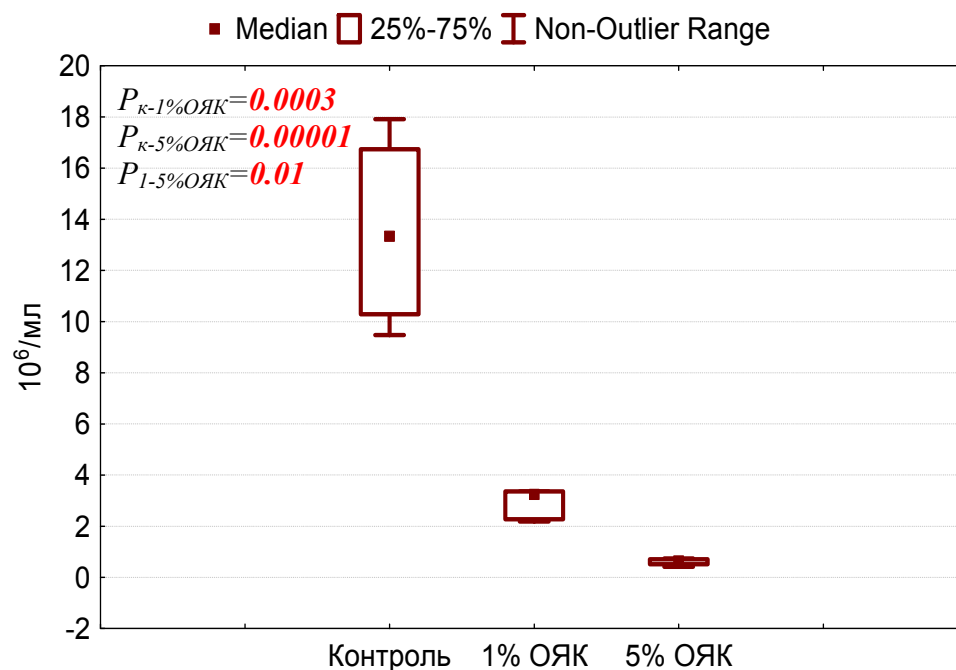


Рис. 34. Абсолютное количество $CD4^+CD8^+$ дубль позитивных лимфоцитов в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

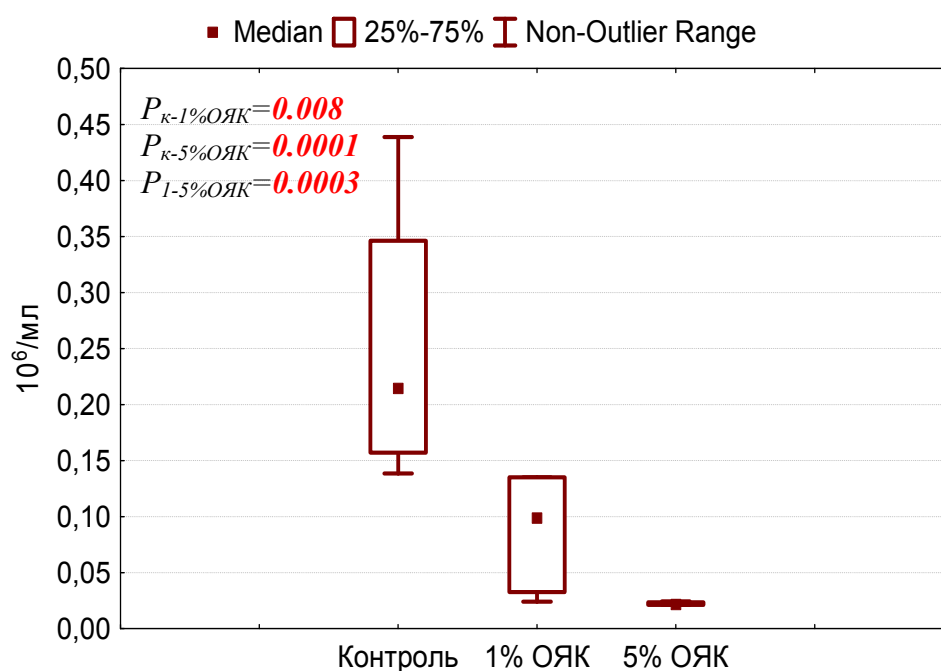


Рис. 35. Абсолютное количество $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

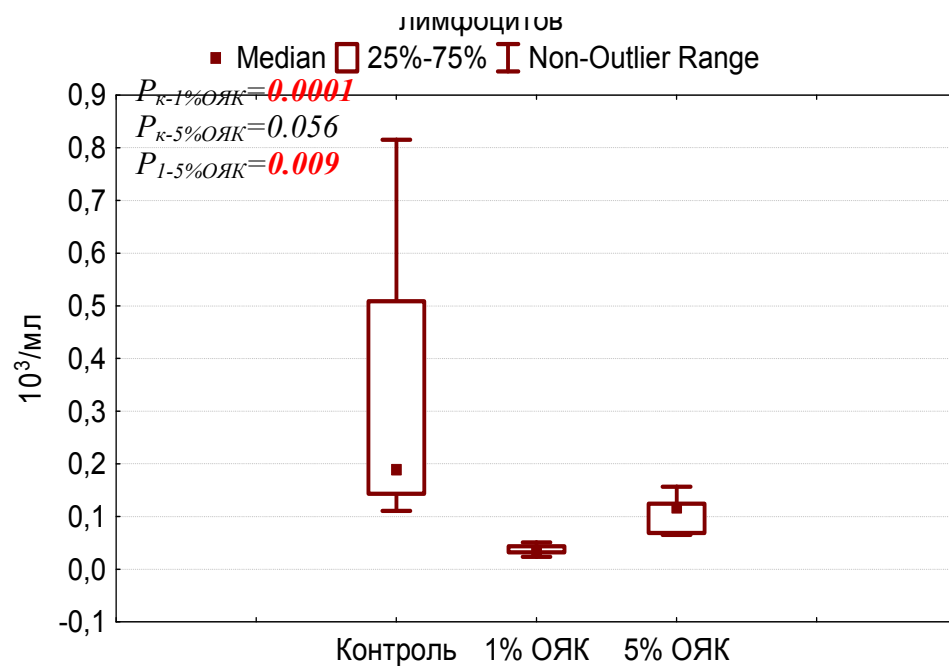


Рис. 36. Абсолютное количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

Таблица 9

Относительное содержание гибнущих по механизму апоптоза Ann V+PI-клеток тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатель в %	Группы	Острый язвенный колит		P
		Контрольная	1% ДСН 5% ДСН	
Гибнущие по механизму апоптоза Ann V ⁺ PI ⁺ клетки		8.2 (1.6; 9.7)	10.0 (8.8; 10.4) 14.5 (13.8; 15.5)	$P_{к-1\%ОЯК}=0,03$ $P_{к-5\%ОЯК}=0,0001$ $P_{1-5\%ОЯК}=0,003$

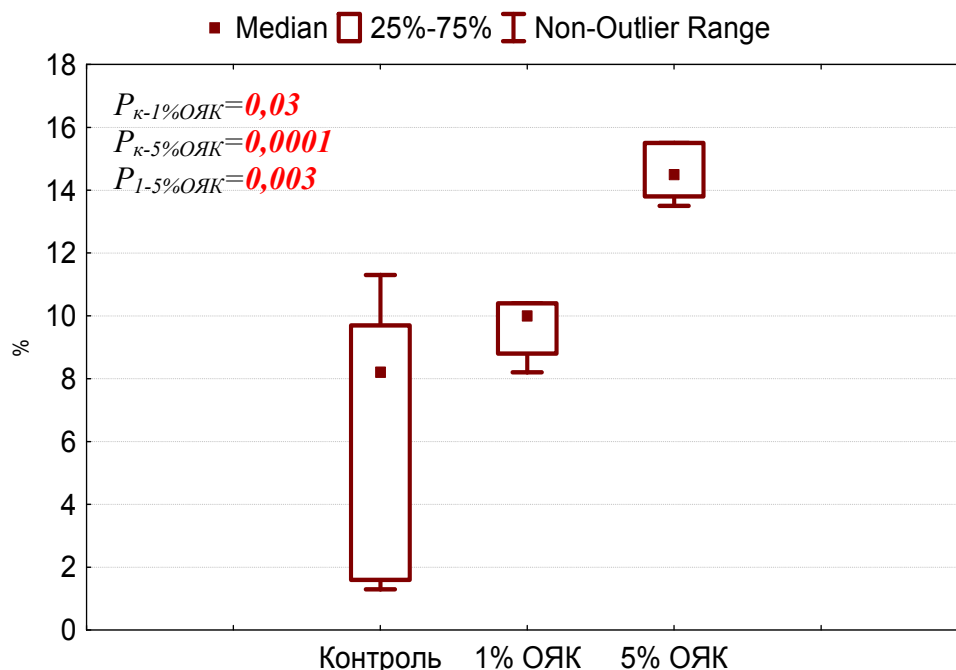


Рис. 37. Относительное содержание гибнущих по механизму апоптоза клеток в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

Состав нелимфоидных клеток коркового и мозгового вещества тимуса

По данным морфометрического исследования на окрашенных гематоксилином и эозином срезах тимуса при катарально-язвенном колите по сравнению с контролем увеличивалась площадь тимических телец, среди них появлялись тимические тельца в виде кистоподобных полостей, снижалось доля тимических телец, состоящих из 3-7 эпителиальных клеток и содержащих кератогиалин (табл. 10).

По данным проточной цитофлуориметрии в тимусе при остром катарально-язвенном колите по сравнению с контролем снижалось количество — $CD45^{+}CD4^{-}CD8^{-}CD11c^{+}$ дендритных клеток (табл. 11, рис. 40). При остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с контролем повышалось относительное содержание $CD45^{+}CD4^{-}CD8^{-}CD11c^{+}$ дендритных и $CD326^{+}UEA^{+}CD205^{-}$ эпителиальных клеток мозгового вещества, $F4/80^{+}$ макрофагов (табл. 11, рис. 38, 40, 41). При остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с катарально-язвенным увеличивалось относительное содержание $CD45^{+}CD4^{-}CD8^{-}CD11c^{+}$ дендритных и $CD326^{+}UEA^{+}CD205^{-}$ эпителиальных клеток мозгового и коркового вещества, а также $F4/80^{+}$ макрофагов (табл. 11, рис. 38, 40, 41).

По данным морфологического и морфометрического исследования тимических телец, состоящих из цитокератин-19 позитивных эпителиальных клеток (рис. 43-45), у мышей при катарально-язвенном колите в 5 раз повышалось их количество, а при остром фибринозно-язвенном колите по сравнению с животными контрольной группы повышались их площадь в 2 раза и количество в 4 раза (табл. 12, рис. 42-45).

Таблица 10

Морфологическая и морфометрическая характеристика тимических телец у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым катарально-язвенным колитом (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контроль	Острый язвенный колит 1% ДСН	P
Площадь от мозгового вещества, %	тимические тельца	1.88 (1.45; 2.22)	3.88 (2.95; 4.96)	<i>0.000004</i>
	кистоподобные тельца	не выявлены	7.15 (3.18; 22.51)	—
Доля от общего количества тимических телец, %	из 3-7 эпителиальных клеток	100.0 (83.0; 100.0)	67.0 (60.0; 73.0)	<i>0.0003</i>
	из 7 и более эпителиальных клеток	17.0 (12.5; 20.0)	22.0 (17.0; 27.0)	0.13
	с кератогиалином	12.5 (11.0; 16.0)	33.0 (32.0; 34.0)	<i>0.01</i>
	в виде кистоподобных полостей	не выявлены	12.5 (7.0; 25.0)	—

Таблица 11

Клеточный состав нелимфоидных клеток тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы	Контрольная	Острый язвенный колит		P
		1% ДСН	5% ДСН	
CD326 ⁺ UEA ⁺ CD205 ⁻ эпителиальные клетки мозгового вещества тимуса	2.6 (2.1; 2.8)	4.75 (3.45; 5.25)	11.3 (7.6; 16.6)	<i>P_{к-1%ОЯК}=0.06</i> <i>P_{к-5%ОЯК}=0.00001</i> <i>P_{1-5%ОЯК}=0.0003</i>
CD326 ⁺ UEA ⁻ CD205 ⁺ эпителиальные клетки коркового вещества тимуса	7 (6.3; 9.2)	5.70 (5.20; 5.80)	9.6 (8.5; 10.2)	<i>P_{к-1%ОЯК}=0.11</i> <i>P_{к-5%ОЯК}=0.2</i> <i>P_{1-5%ОЯК}=0.01</i>
CD45 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD11c ⁺ дендритные клетки	1.3 (1.2; 1.4)	0.80 (0.60; 0.80)	13.2 (6.9; 17.8)	<i>P_{к-1%ОЯК}=0.009</i> <i>P_{к-5%ОЯК}=0.00001</i> <i>P_{1-5%ОЯК}=0.0001</i>
F4/80 ⁺ макрофаги	14.5 (12.6; 16.0)	21.70 (13.60; 26.90)	42.2 (37.9; 42.8)	<i>P_{к-1%ОЯК}=0.21</i> <i>P_{к-5%ОЯК}=0.0003</i> <i>P_{1-5%ОЯК}=0.0008</i>

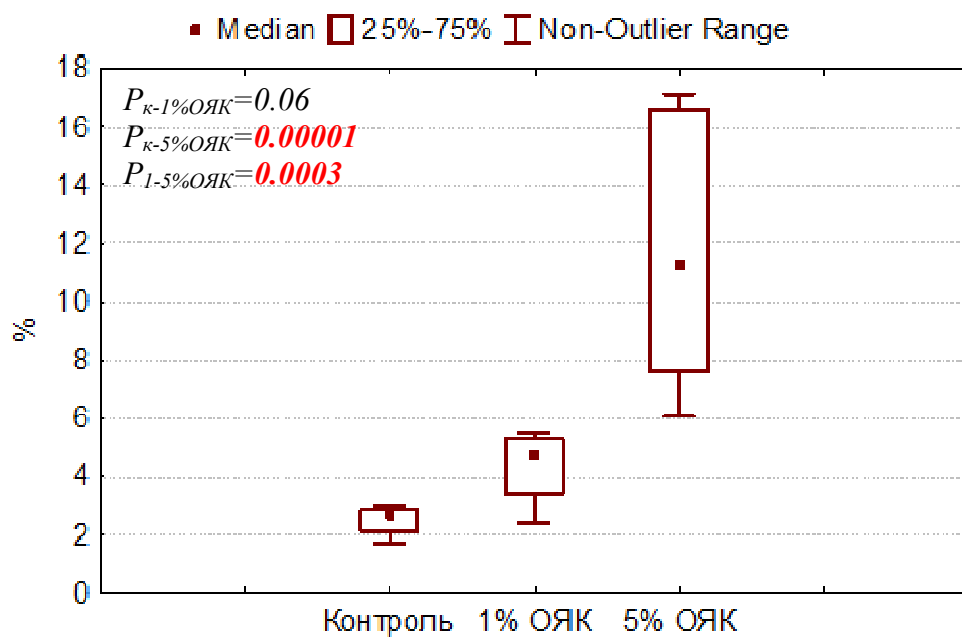


Рис. 38. Относительное содержание $CD326^+UEA^+CD205^-$ эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

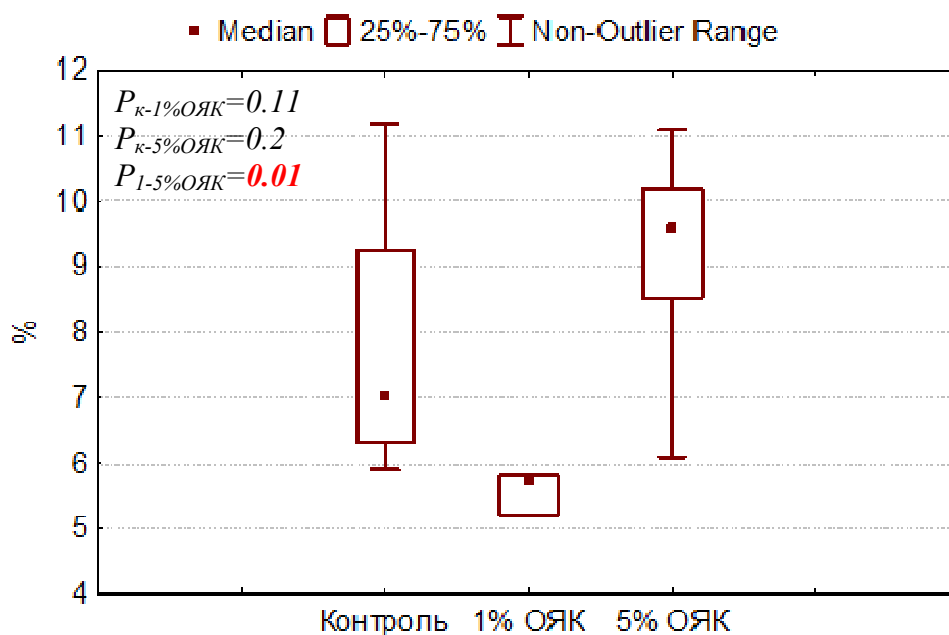


Рис. 39. Относительное содержание $CD326^+UEA^-CD205^+$ эпителиальных клеток коркового вещества тимуса у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

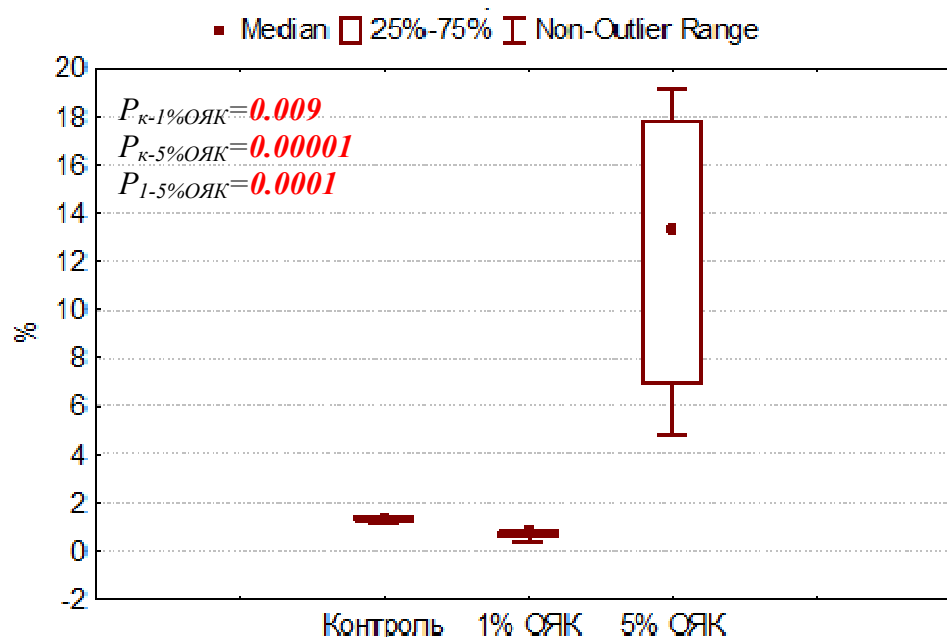


Рис. 40. Относительное содержание $CD45^+CD4^-CD8^-CD11c^+$ дендритных клеток в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

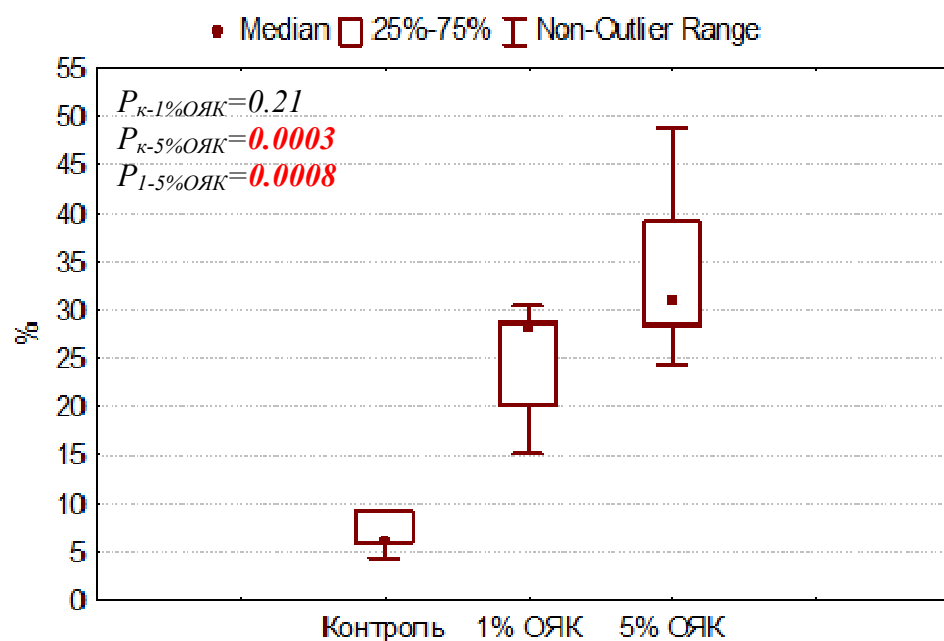


Рис. 41. Относительное содержание $F4/80^+$ макрофагов в тимусе у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

Показатели количества и площади цитокератин 19 позитивных тимических телец и эпителиальных клеток тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы	Контрольная	Острый язвенный колит		P
		1% ДСН	5% ДСН	
Площадь СК19 ⁺ тимических телец, мкм ²	154.5 (50.17; 214.24)	201.28 (153.31; 472.36)	274.61 (180.62; 452.72)	$P_{K-1\%OЯК}=0.06$ $P_{K-5\%OЯК}=0,0003$ $P_{1-5\%OЯК}=0,53$
Количество СК19 ⁺ тимических телец, абс. число	1.0 (0; 1.0)	5.0 (3.0; 5.0)	4.0 (3.0; 5.0)	$P_{K-1\%OЯК}=0,00001$ $P_{K-5\%OЯК}=0,00002$ $P_{1-5\%OЯК}=0,98$

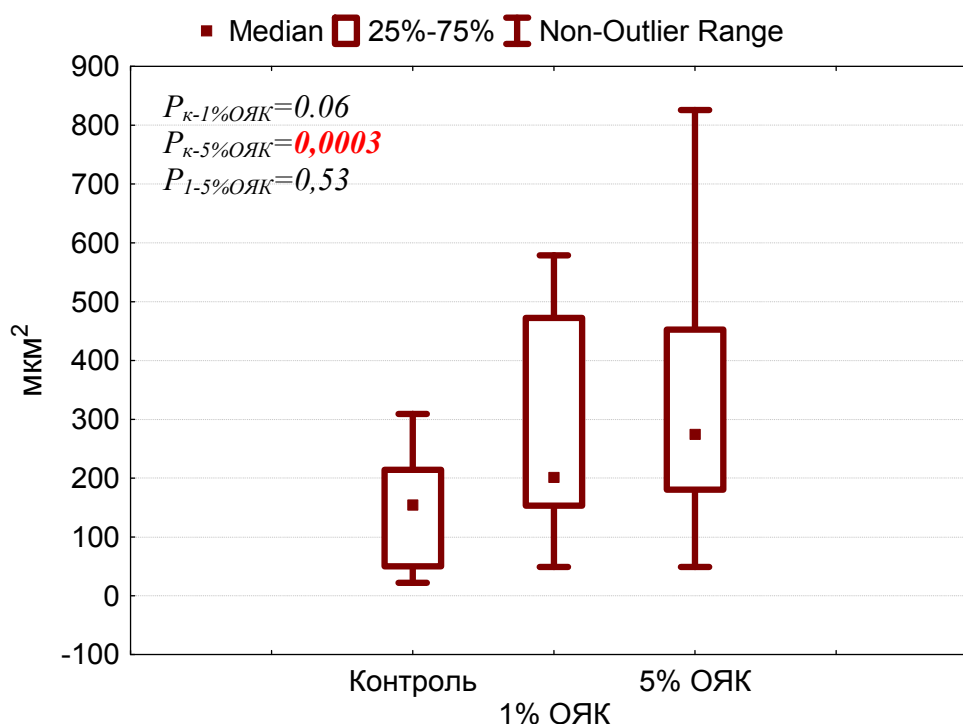


Рис. 42. Показатели площади тимических телец, состоящих из СК19⁺ эпителиальных клеток

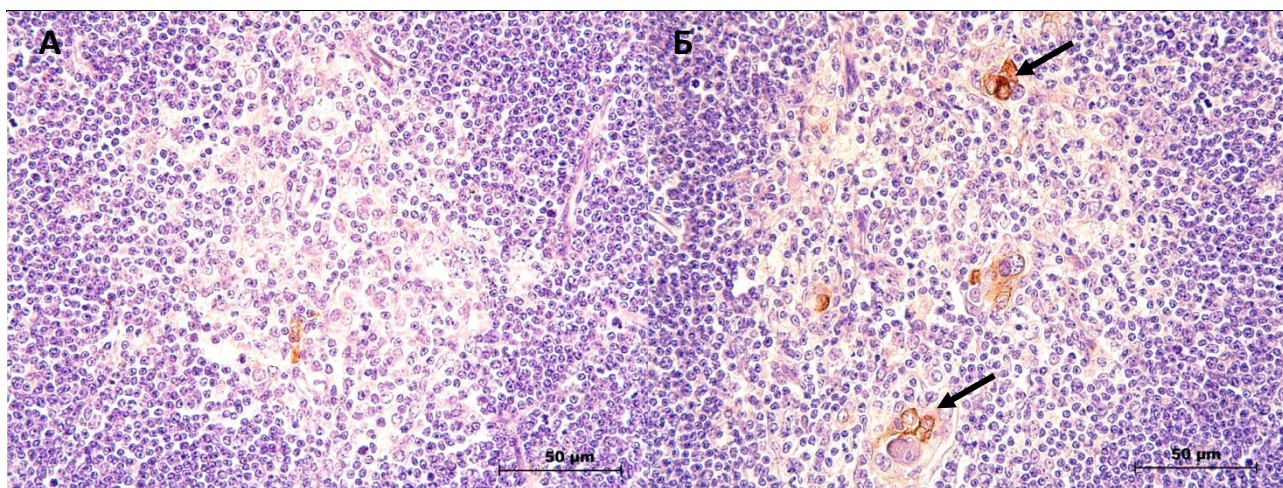


Рис. 43. Морфологическая характеристика эпителиальных клеток тимуса у мышей контрольной группы. А, Б – тимические тельца, образованные цитокератин-19 позитивными эпителиальными клетками. Б – тимические тельца, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток, экспрессирующих цитокератин-19 (черная стрелка). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19

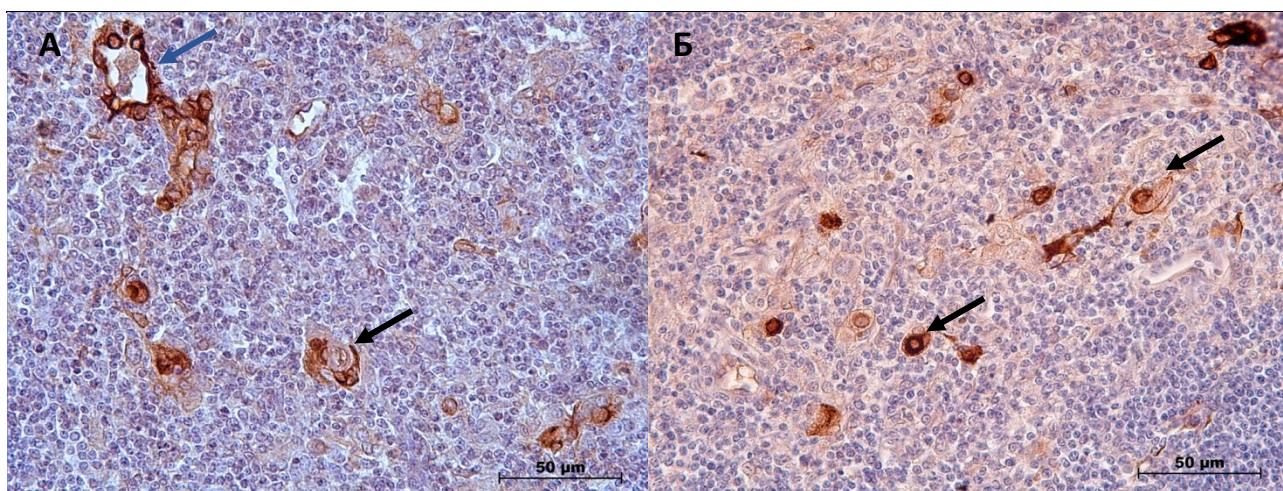


Рис. 44. Морфологическая характеристика эпителиальных клеток тимуса у мышей с острым катарально-язвенным колитом. А, Б – многочисленные тимические тельца, образованные цитокератин-19 позитивными эпителиальными клетками. А – тимическое тельце в виде кистоподобной полости (синяя стрелка); Б – тимические тельца, состоящие из нескольких эпителиальных клеток, экспрессирующих цитокератин-19 (черная стрелка). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19

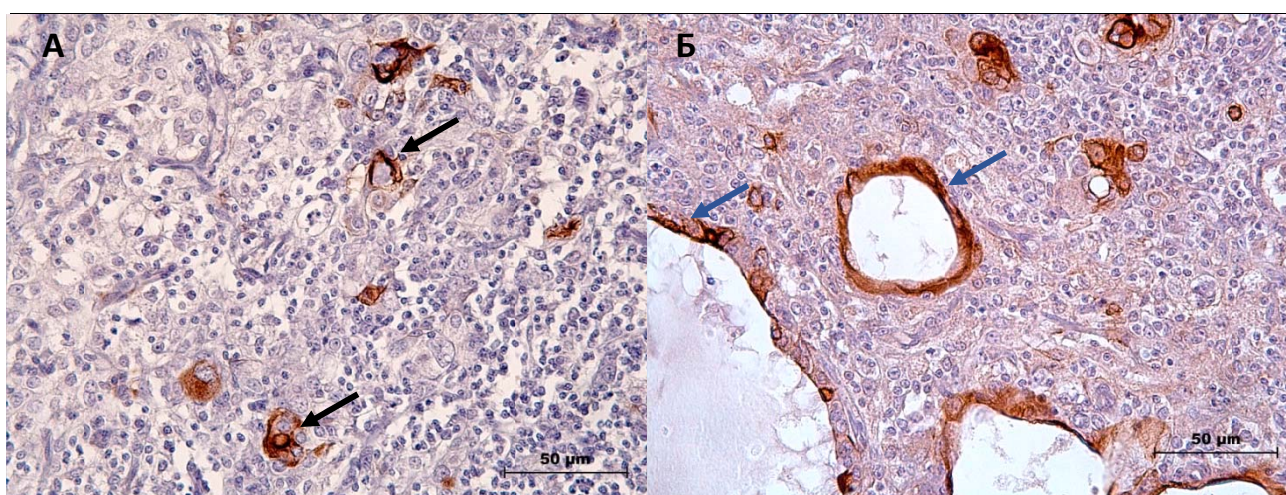


Рис. 45. Морфологическая характеристика эпителиальных клеток тимуса у мышей с острым фибринозно-язвенным колитом. А – многочисленные тимические тельца, состоящие из 3-7 эпителиальных клеток, образованные цитокератин-19 позитивными эпителиальными клетками (черная стрелка); Б – тимические тельца в виде кистоподобных полостей, выстланных эпителиальными клетками, экспрессирующими цитокератин-19 (синяя стрелка). Иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19

3.1.5. Морфофункциональная характеристика селезенки

При морфологическом исследовании в селезенке у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы отношение белой пульпы к красной составляло примерно 1:1 (рис.46 А). Белая пульпа селезенки была представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с небольшими герминативными центрами (рис. 46 А). В герминативных центрах лимфоидных узелков среди лимфобластов выявлялись единичные митотически делящиеся клетки. По периферии лимфоидных узелков, на границе белой и красной пульпы, была хорошо выражена маргинальная зона. В красной пульпе селезенки обнаруживались равномерно распределенные форменные элементы крови, макрофаги и единичные в препарате мегакариоциты.

По данным морфометрического исследования объемная доля белой пульпы составляла 49,0%, а индекс отношения объемной плотности белой пульпы к красной – 0,96 (табл. 13, рис. 47, 50). ПАЛМ-зона была слабо выражена, её объемная плотность составляла 2,0% (табл. 13).

Таким образом, по данным морфологического и морфометрического исследования в селезенке у контрольных мышей патологических и реактивных изменений не выявлено.

При морфологическом исследовании в селезенке у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при остром катарально-язвенном колите соотношение белой и красной пульпы составляло примерно 1,0:1,5 (рис. 46 Б). Белая пульпа селезенки была представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с небольшими герминативными центрами (рис. 46 Б). В герминативных центрах лимфоидных узелков среди лимфобластов выявлялись единичные митотически делящиеся клетки. По периферии лимфоидных узелков маргинальная зона была выражена слабее, чем в контрольной группе. В красной пульпе селезенки обнаруживались

равномерно распределенные форменные элементы крови, нейтрофилы, макрофаги, мегакариоциты.

По данным морфометрического исследования не было обнаружено статистически значимых различий между животными контрольной группы и с острым катарально-язвенным колитом по показателям объемной плотности белой и красной пульпы, лимфоидных узелков и ПАЛМ-зоны селезенки (табл. 13).

Таким образом, у половозрелых мышей самцов C57Bl/6 при остром катарально-язвенном колите по данным морфологического исследования строение селезенки соответствует норме.

При морфологическом исследовании у животных с острым фибринозно-язвенным колитом селезенка опустошена, лимфоидные узелки мелкие, ПАЛМ-зона не выражена (рис. 46 В). В красной пульпе наблюдалось увеличение числа нейтрофильных лейкоцитов, мегакариоцитов.

При морфометрическом исследовании отмечалась в 5,4 раза редукция белой пульпы, объемная доля лимфоидных узелков снижалась по сравнению с контролем (табл. 13, рис. 47-50).

Таким образом, при фибринозно-язвенном колите селезенка опустошена – снижена объемная доля белой пульпы, ПАЛМ-зоны и лимфоидных узелков.

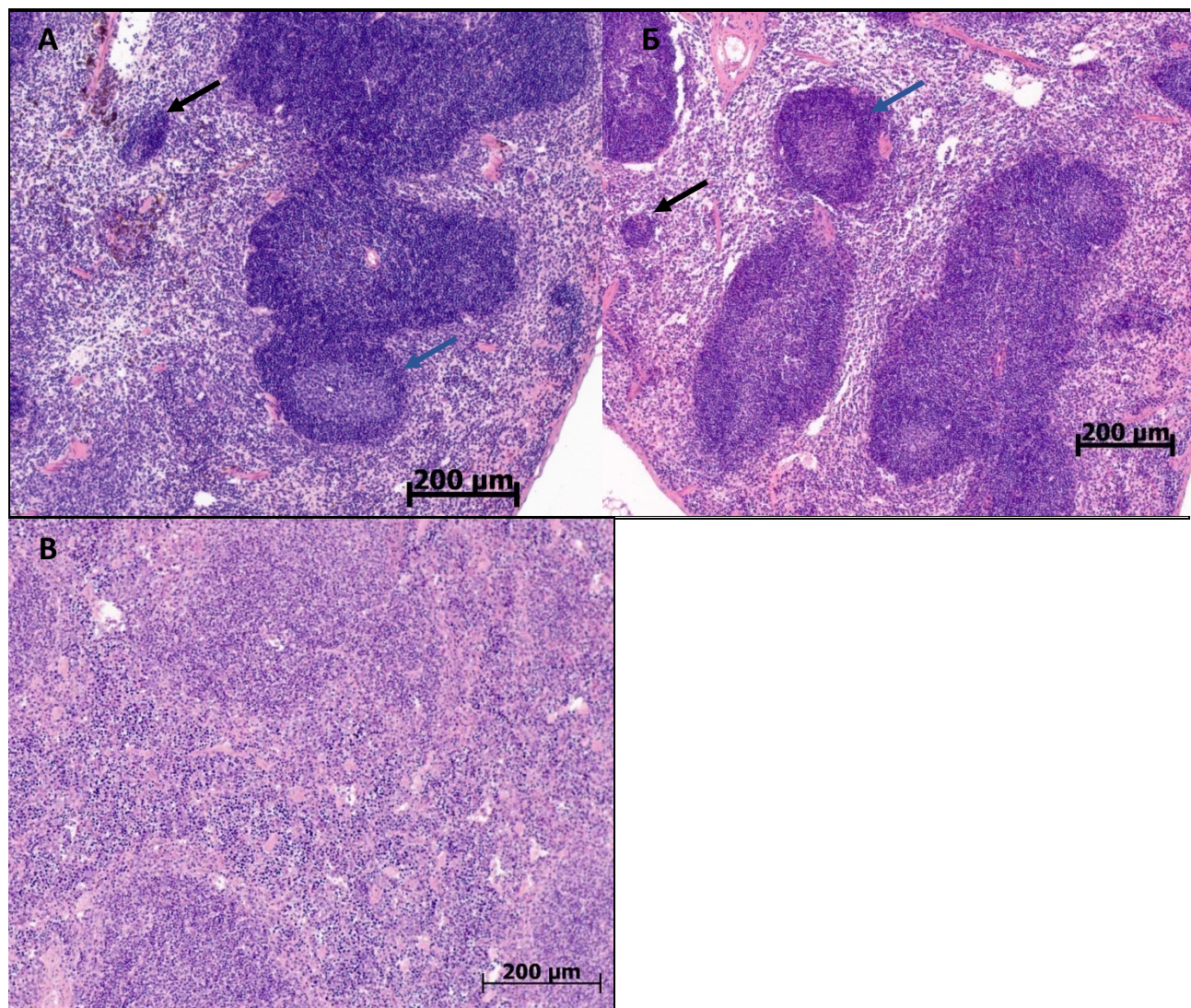


Рис. 46. Морфологическая характеристика селезенки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной и экспериментальных групп. Половозрелые самцы мышей C57Bl/6 контрольной группы (А), с острым катарально-язвенным колитом (Б), острым фибринозно-язвенным колитом (В). А, Б – белая пульпа селезенки представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной (черная стрелка) и лимфоидными узелками с герминативными центрами (синяя стрелка). По периферии лимфоидных узелков, на границе белой и красной пульпы, хорошо выражена маргинальная зона. В красной пульпе селезенки обнаруживаются равномерно распределенные форменные элементы крови и макрофаги; В – при фибринозно-язвенном колите наблюдается редукция белой пульпы и замещение ее на красную пульпу. Окраска гематоксилином и эозином

Таблица 13

Морфометрические показатели структурно-функциональных зон селезенки у половозрелых самцов мышей С57В1/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Ме (25%-75%))

Показатели		Контрольная	Острый язвенный колит		P
			1% ДСН	5% ДСН	
Объемная доля, %	ПАЛМ-зона	2.0 (1.0; 2.0)	2.0 (2.0; 4.0)	0 (0; 2.0)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.08$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.11$ $P_{1-5\%ОЯК}=0.001$
	лимфоидные узелки	49.0 (30.0; 53.0)	37.0 (25.5; 48.5)	5.5 (0; 12.5)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.051$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{1-5\%ОЯК}=0.0001$
	белая пульпа	49.0 (31.0; 55.0)	38.5 (31.0; 50.5)	9 (0; 16.0)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.1$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{1-5\%ОЯК}=0.0001$
	красная пульпа	51.0 (45.0; 69.0)	61.5 (49.5; 69.0)	91.0 (84.0; 100.0)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.19$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{1-5\%ОЯК}=0.0001$
Индекс отношения объемной плотности белой пульпы к красной, усл. ед.		0,96 (0,45; 1,22)	0.62 (0.44; 1.02)	0.09 (0; 0.19)	$P_{к-1\%ОЯК}=0.2$ $P_{к-5\%ОЯК}=0.0001$ $P_{1-5\%ОЯК}=0.0001$

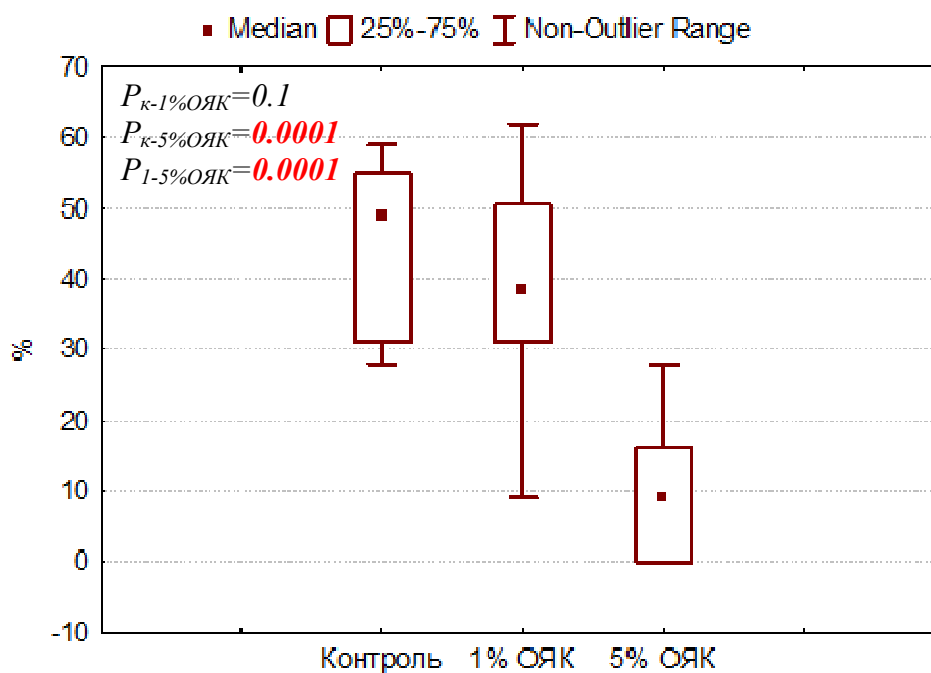


Рис. 47. Объемная плотность белой пульпы селезенки у половозрелых самцов мышей С57В1/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

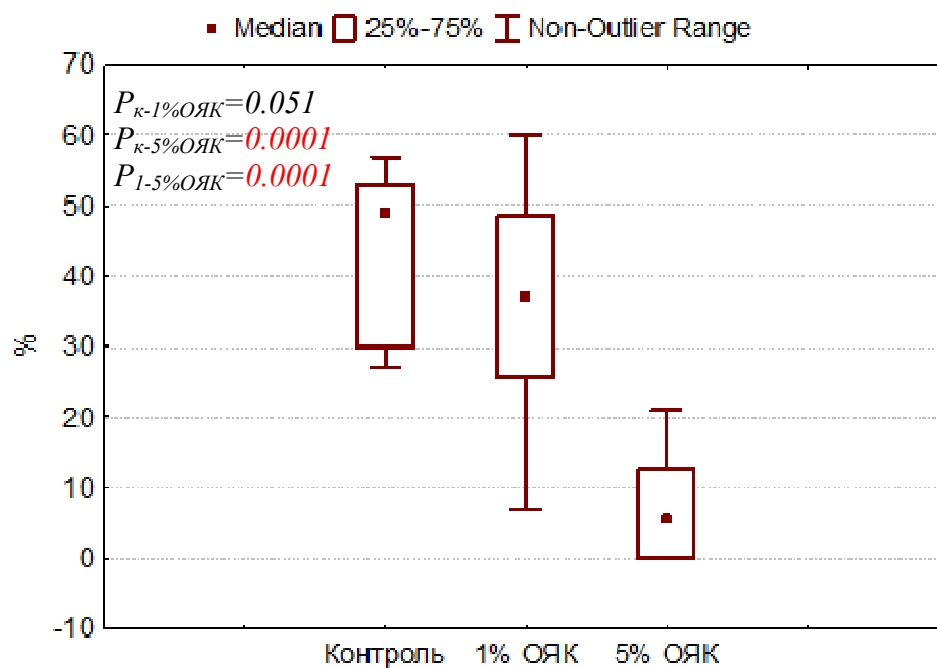


Рис. 48. Объемная плотность лимфоидных узелков селезенки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

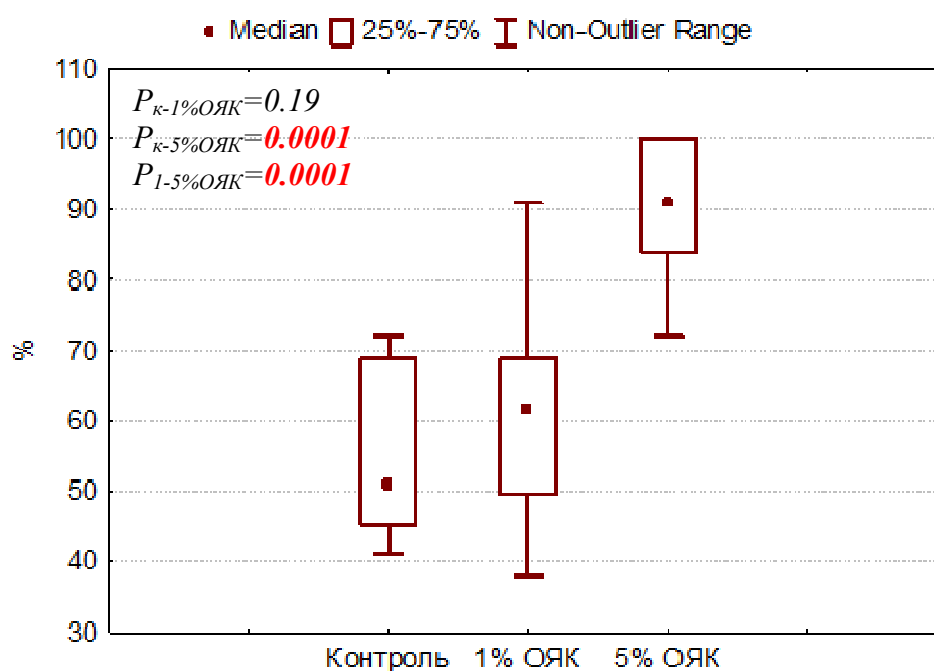


Рис. 49. Объемная плотность красной пульпы селезенки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

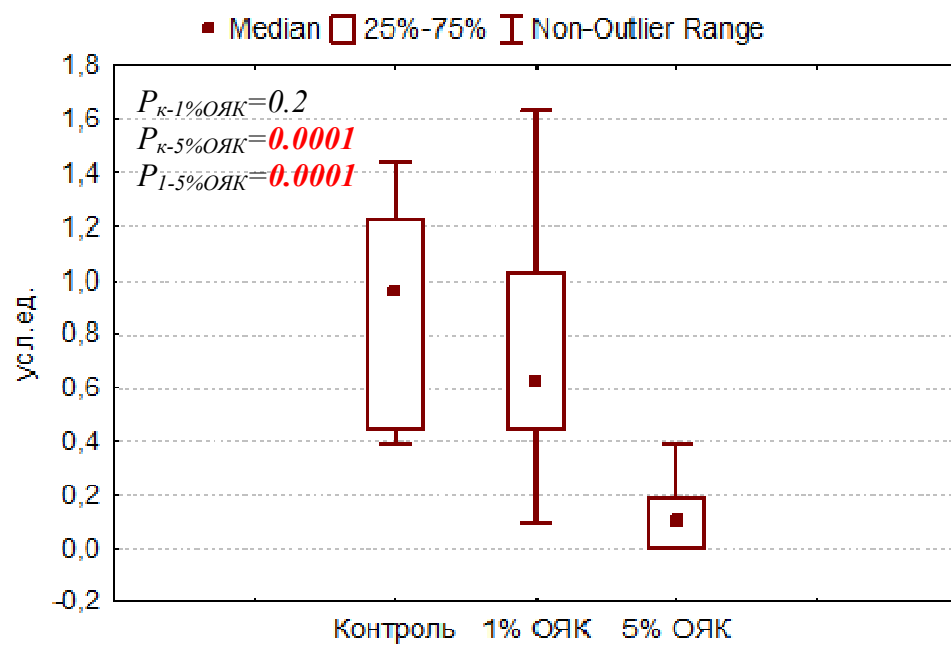


Рис. 50. Индекс отношения объемной плотности белой пульпы селезенки к красной пульпе у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

3.1.6. Морфофункциональная характеристика брыжеечных лимфатических узлов

Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов

При морфологическом исследовании брыжеечные лимфатические узлы половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы были окружены соединительнотканной капсулой (рис. 51 А). Наружная кора образована первичными и вторичными лимфоидными узелками с герминативными центрами (рис. 51 Б), а также межфолликулярной зоной лимфоцитов (рис. 51А). Паракортикальная зона плотно заселена лимфоцитами. Мозговое вещество представлено лимфоцитами, плазмócитами, макрофагами, ретикулярными клетками, коллагеновыми и ретикулярными волокнами, макрофагами стромы. В краевом и мозговых синусах обнаруживались лимфоциты и макрофаги (рис. 51 В). При окраске по методу Ниссля очагов метакромазии и метакроматических включений в клетках брыжеечных лимфатических узлов не выявлено (рис. 51 Г).

Таким образом, у половозрелых мышей самцов C57Bl/6 контрольной группы по данным морфологического исследования строение брыжеечных лимфатических узлов соответствует нормальному, какие-либо реактивные изменения отсутствуют.

При морфологическом исследовании брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с катарально- и фибринозно-язвенным острым колитом узлы окружены соединительнотканной капсулой, лимфоидные узелки содержали широкие герминативные центры по сравнению с животными контрольной группы (рис. 52 А, Б, 53 А, Б). Паракортикальная зона широкая, плотно заселена лимфоцитами (рис. 52 А, Б, 53 А, Б). В мозговом слое присутствовало большое количество макрофагов, лимфоцитов, ретикулярных клеток (рис 52 В, 53 В). Краевой и мозговые синусы расширены, количество клеточных элементов в них резко увеличено, и они представлены лимфоцитами и макрофагами в соотношении примерно

1:1 (рис 52 В, 53 В). При окраске по методу Ниссля в краевом и мозговых синусах брыжеечных лимфатических узлов выявлялись макрофаги, содержащие метакроматически окрашенные гранулы декстрансульфата натрия (рис. 52 Г, 53 Г).

Таким образом, у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 как при катарально-язвенном, так и при фибринозно-язвенном остром колите выявляются реактивные изменения в брыжеечных лимфатических узлах, гиперплазия В и Т зон, макрофагальная реакция в синусах.

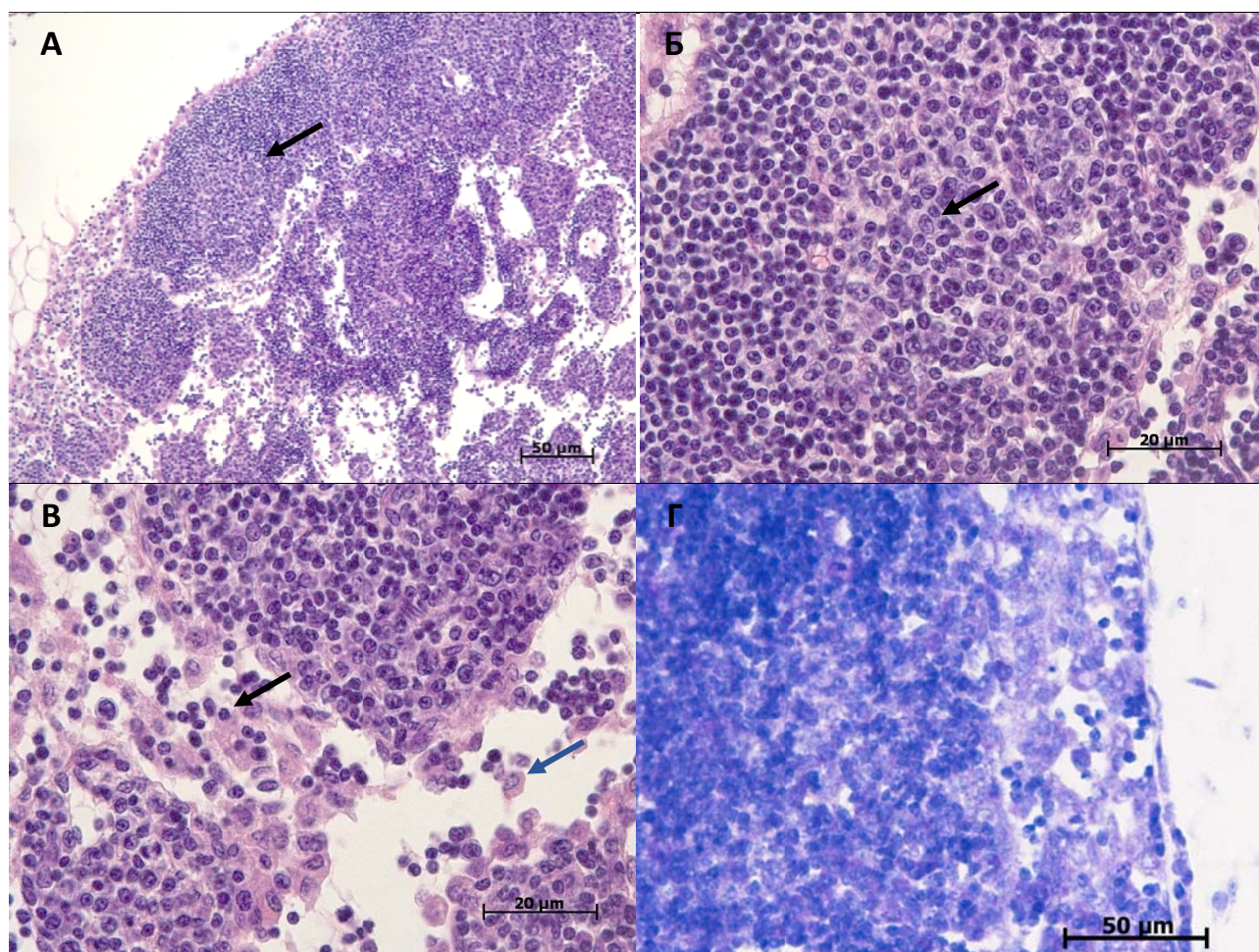


Рис. 51. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы. А – лимфоидные узелки со светлыми центрами (черная стрелка); Б – светлый центр лимфоидного узелка, преобладают лимфобласты (черная стрелка); В – в просветах мозговых синусов небольшое количество лимфоцитов (черная стрелка) и макрофагов (синяя стрелка), лимфоциты преобладают, в мозговых тяжах лимфоциты и единичные плазмциты; Г – при окраске по методу Ниссля очагов метахромазии и метахроматических включений в клетках не выявлено. Окраска гематоксилином и эозином (А-В), окраска по методу Ниссля (Г)

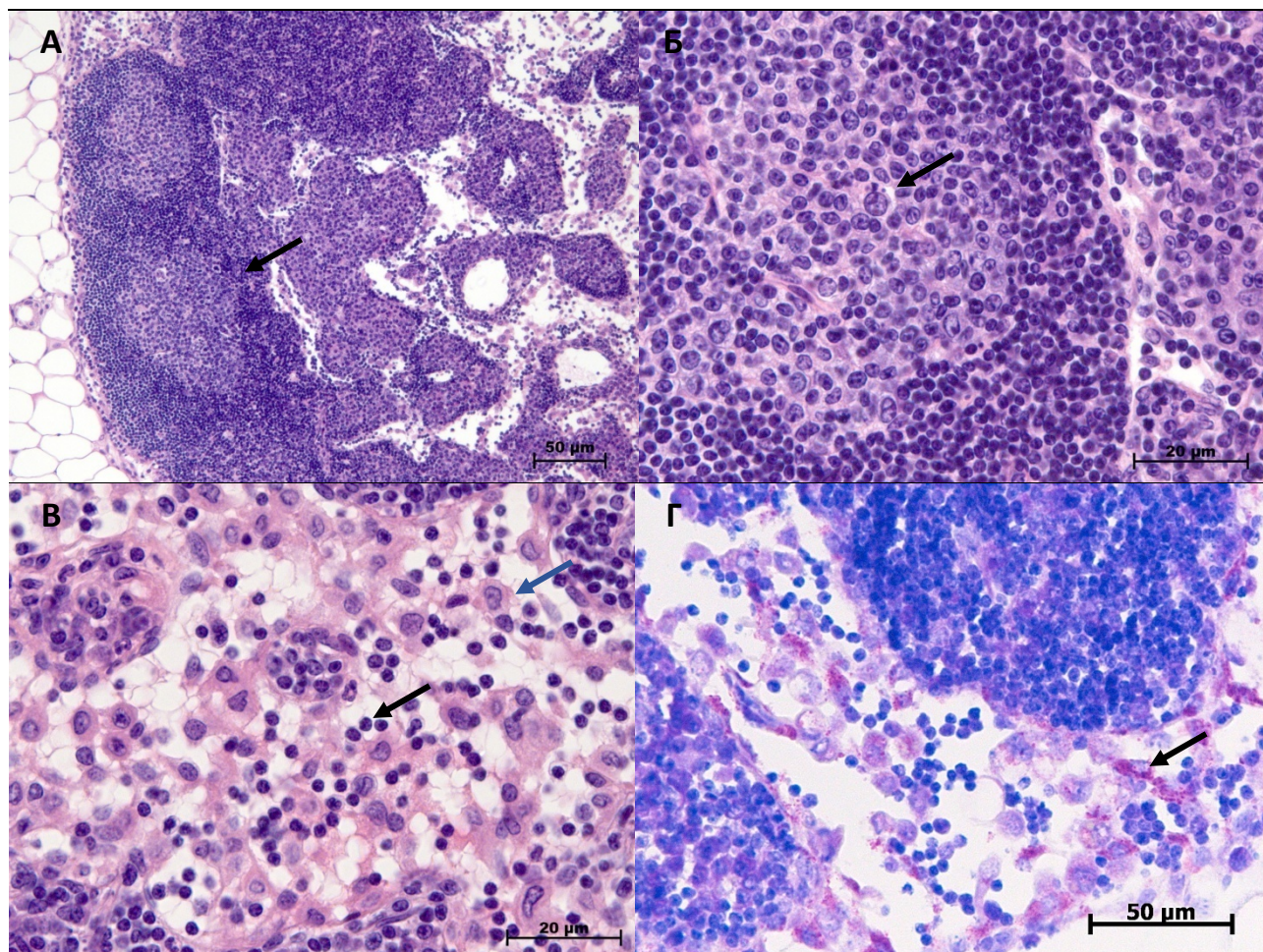


Рис. 52. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым катарально-язвенным колитом. А – лимфоидные узелки с широкими светлыми центрами (черная стрелка); Б – светлый центр лимфоидного узелка, преобладают лимфобласты (черная стрелка); В – в просветах мозговых синусов количество клеток резко увеличено, выявляются лимфоциты (черная стрелка) и макрофаги (синяя стрелка); Г – в мозговых синусах метахроматически окрашенные гранулы декстрансульфатанатрия, лежащие отдельно и в цитоплазме макрофагов (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином (А-В), окраска по методу Ниссля (Г)

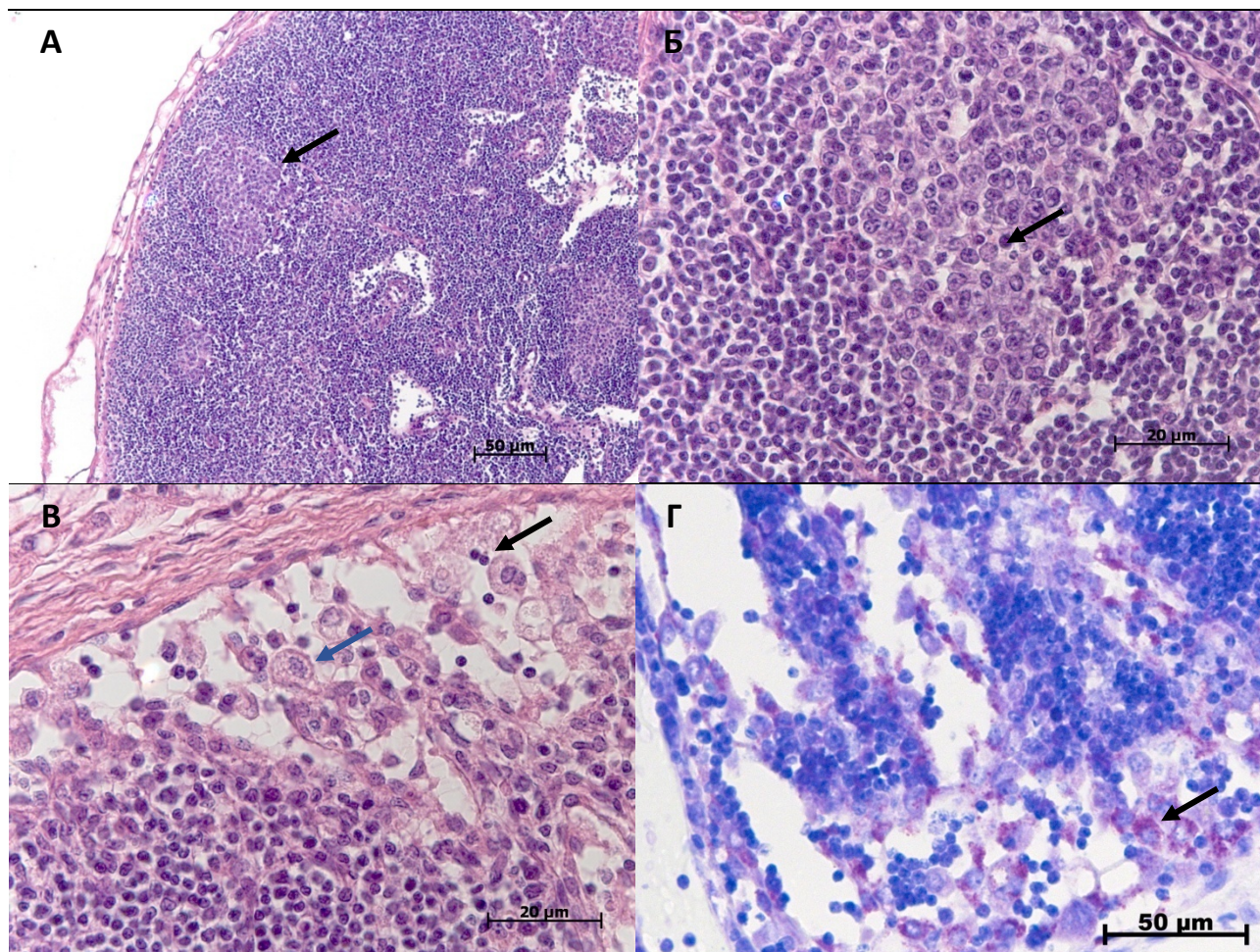


Рис. 53. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым фибринозно-язвенным колитом. А – лимфоидные узелки с широкими светлыми центрами (черная стрелка), паракортикальная зона широкая; **Б** – светлый центр лимфоидного узелка, преобладают лимфобласты; **В** – в просветах синусов количество клеточных элементов увеличено, выявляются лимфоциты (черная стрелка) и пенистые макрофаги (синяя стрелка), макрофаги преобладают; **Г** – в мозговых синусах метахроматически окрашенные гранулы декстрансульфата натрия, лежащие отдельно и в цитоплазме макрофагов (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином (А-В), окраска по методу Ниссля (Г)

Субпопуляционный состав лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов

По сравнению с контролем в брыжеечных лимфатических узлах у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 как при остром катарально-язвенном, индуцированным 1% раствором ДСН, так и фибринозно-язвенном (5% ДСН) колите статистически значимо уменьшалось абсолютное количество лимфоцитов (в 1,5 и 2 раза, соответственно), $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов (1,3 и 2,7 раза). По сравнению с контролем при остром катарально-язвенном колите ниже содержание $CD3^-CD19^+$ В-лимфоцитов (в 1,6 раза); при остром фибринозно-язвенном колите в 1,8 раза уменьшалось количество $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, а число $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов увеличивалось в 2,1 раза (табл. 14; рис. 55-58).

По данным оценки субпопуляций лимфоцитов при нарастании выраженности патологического процесса при остром язвенном колите уменьшалось абсолютное количество лимфоцитов в 1,4 раза, в 2 раза $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов и $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов, а содержание $CD3^-CD19^+$ В- и $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов увеличивалось в 1,4 и 3 раза соответственно (табл. 14; рис. 54-58).

Таблица 14

Субпопуляционный состав лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Острый язвенный колит		P
			1% ДСН	5% ДСН	
Лейкоциты	10 ⁶ /мл	27.25 (22.8; 27.5)	12.84 (12.39; 13.34)	9.9 (8.75; 13.05)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0002$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.11$
Лимфоциты	10 ⁶ /мл	19.44 (15.61; 20.48)	12.96 (11.6; 12.0)	9.23 (7.95; 13.33)	$P_{K-1\%OЯК}=0.001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.02$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	% от лф*	34.2 (29.0; 37.6)	35.4 (32.1; 35.4)	23.2 (19.15; 27.6)	$P_{K-1\%OЯК}=0.3$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
	10 ⁶ /мл	5.33 (4.52; 5.86)	4.11 (3.8; 4.1)	1.97 (1.58; 2.44)	$P_{K-1\%OЯК}=0.01$ $P_{K-5\%OЯК}=0.002$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	% от лф	25.37 (21.7; 26.4)	35.1 (35.1; 38.7)	26.3 (23.0; 32.2)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
	10 ⁶ /мл	3.96 (3.38; 4.12)	4.2 (4.2; 4.5)	2.2 (1.77; 2.75)	$P_{K-1\%OЯК}=0.06$ $P_{K-5\%OЯК}=0.00001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0006$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	% от лф	36.46 (36.1; 37.1)	29.5 (21.7; 29.6)	18.8 (18.25; 23.0)	$P_{K-1\%OЯК}=0.0001$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.02$
	10 ⁶ /мл	5.69 (5.63; 5.79)	3.53 (2.5; 3.5)	4.92 (3.54; 6.78)	$P_{K-1\%OЯК}=0.01$ $P_{K-5\%OЯК}=0.46$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0001$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	% от Тх [#]	5.4 (5.4; 5.52)	9.78 (8.5; 10.5)	26.3 (23.0; 32.0)	$P_{K-1\%OЯК}=0.01$ $P_{K-5\%OЯК}=0.0001$ $P_{I-5\%OЯК}=0.0006$
	10 ³ /мл	267.46 (146.8; 316.9)	191.25 (178.4; 327.4)	560.0 (471.0; 604.5)	$P_{K-1\%OЯК}=0.04$ $P_{K-5\%OЯК}=0.01$ $P_{I-5\%OЯК}=0.008$

Условные обозначения: * Лф – лимфоциты; [#]Тх – Т-хелперы

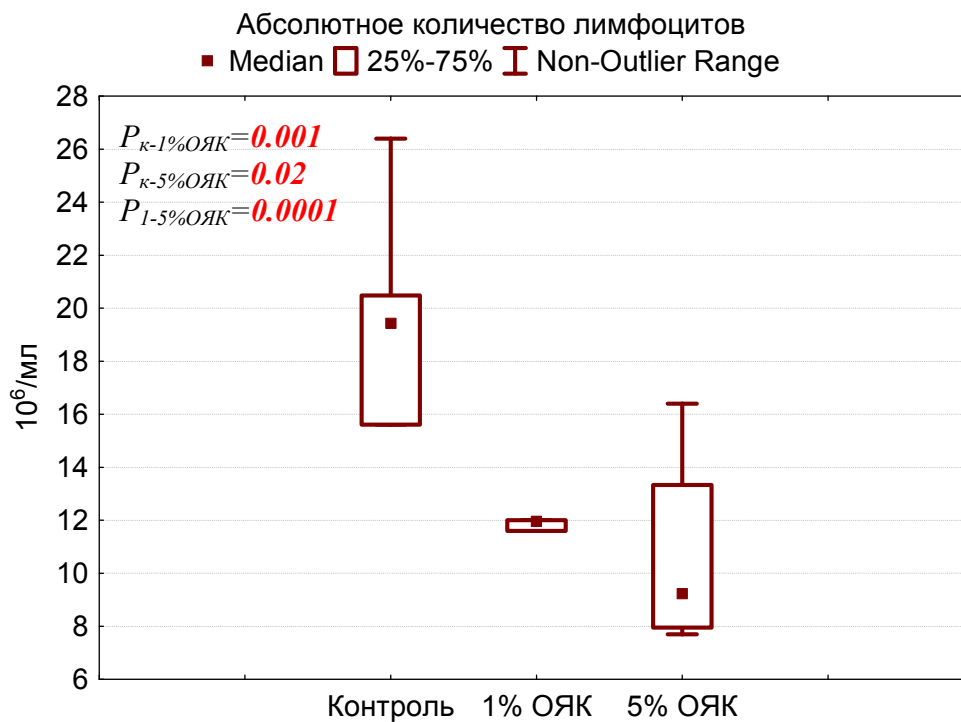


Рис. 54. Абсолютное количество лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

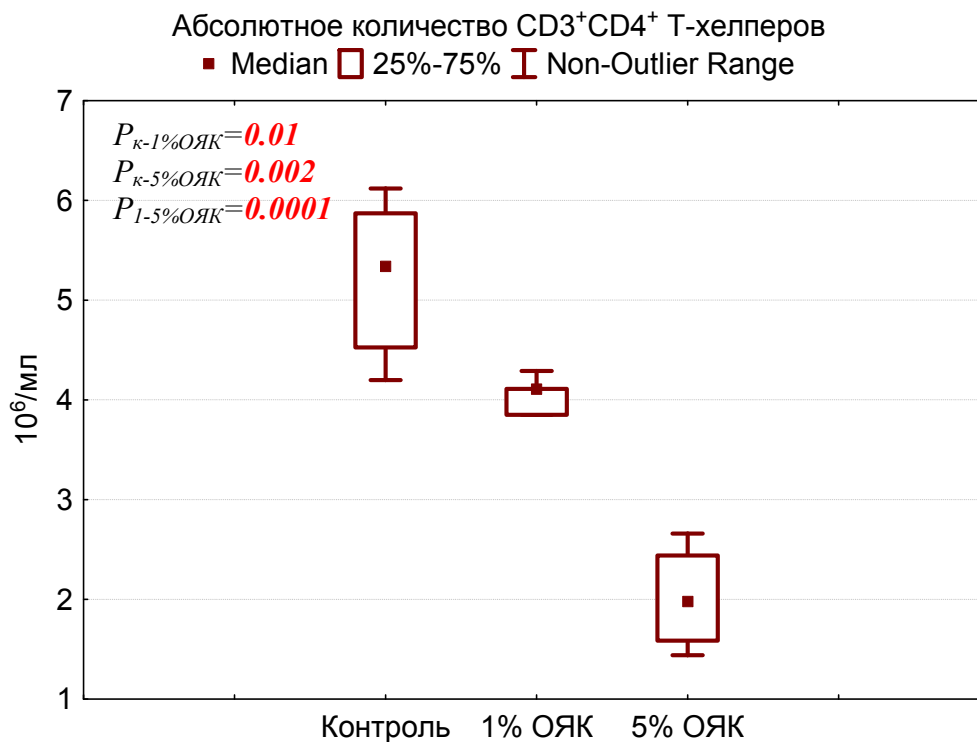


Рис. 55. Абсолютное количество CD3⁺CD4⁺Т-хелперов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

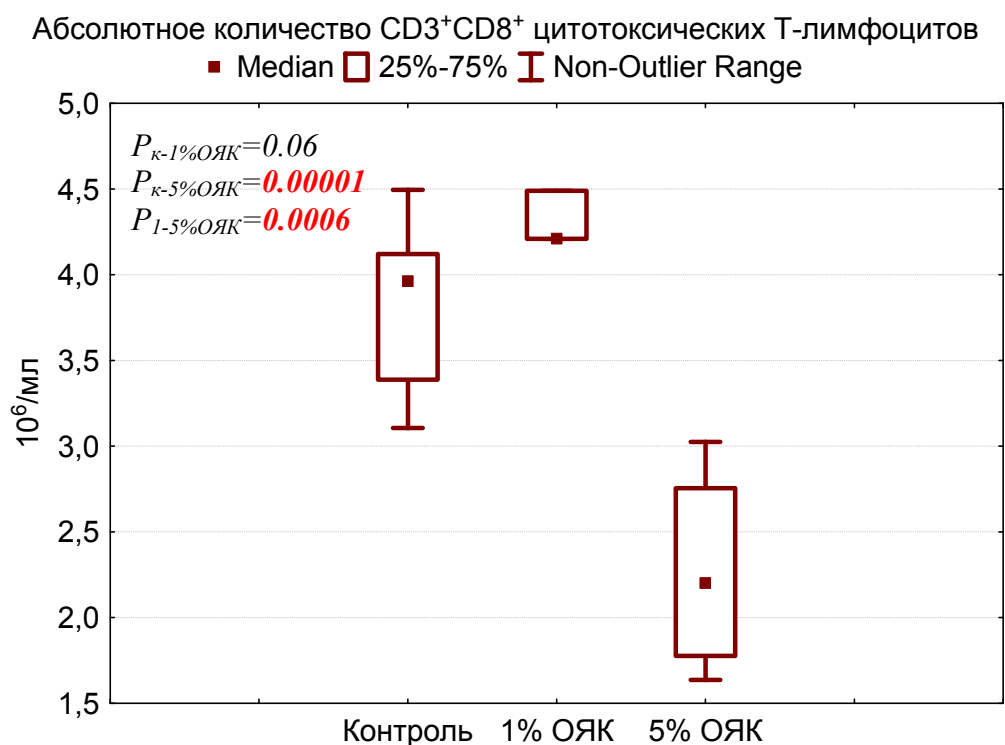


Рис. 56. Абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

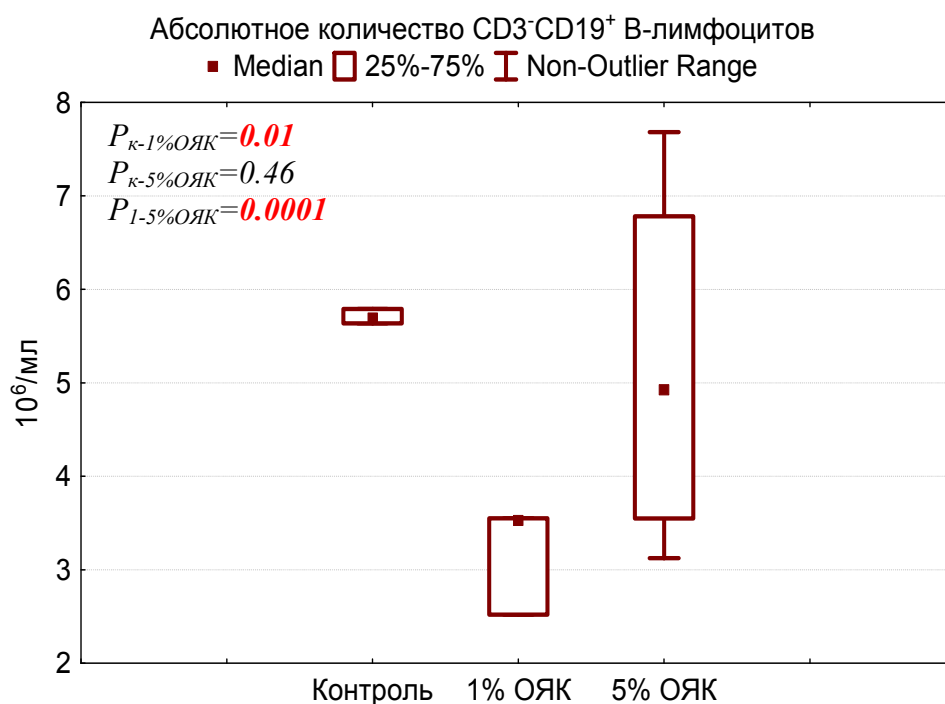


Рис. 57. Абсолютное количество $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

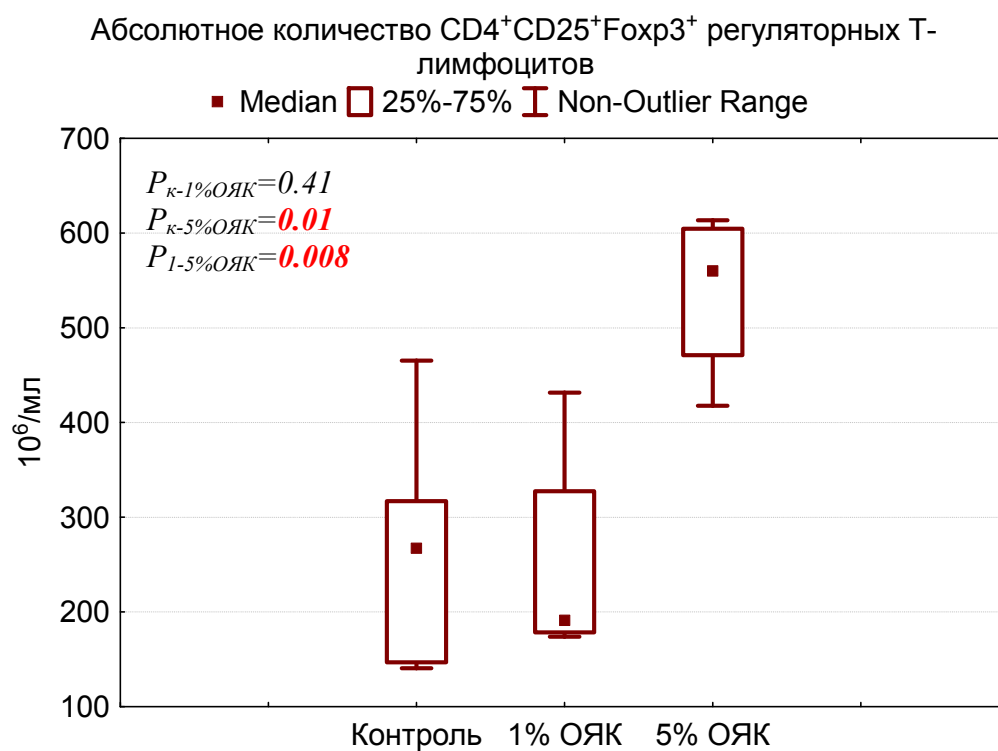


Рис. 58. Абсолютное количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и с острым язвенным колитом разной тяжести

3.2. Морфофункциональная характеристика иммунной системы у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

3.2.1. Морфофункциональная характеристика ободочной кишки

Морфологическая характеристика ободочной кишки

При морфологическом исследовании у мышей C57Bl/6, которых в течение 5 суток поили 1% раствором ДСН и выводили из эксперимента на 28-е сутки (ранний срок), в ободочной кишке выявлялась картина хронического язвенного колита. Поверхность эпителия была очагово покрыта слоем слизи. Крипты деформированы, их просветы расширены, местами заполнены слизью (рис. 59 Б). Расстояние между криптами увеличивалось. В собственной пластинке слизистой оболочки наблюдался очаговый отек, выраженная диффузная и очаговая воспалительная инфильтрация, состоящая из лимфоцитов, плазмочитов, макрофагов и единичных нейтрофилов (рис. 59 Б). Воспалительная инфильтрация была максимально выражена в базальном отделе собственной пластинки слизистой оболочки. Мышечная пластинка состояла из 2-3 слоев гладкомышечных клеток, с равномерно окрашенной эозинофильной цитоплазмой. В подслизистой основе наблюдался очаговый отек, расширение просвета лимфатических сосудов, выраженная диффузная и очаговая воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, плазмочитов, гистиоцитов и единичных нейтрофилов (рис. 59 В). При окраске по Массону выявлялись очаги фиброза (рис. 60 Б). Мышечная оболочка состояла из кольцевого и продольного слоев гладкомышечных клеток. В соединительнотканых септах мышечной оболочки между пучками гладкомышечных клеток и вокруг ганглиев межмышечного нервного сплетения выявлялись лимфоциты и единичные нейтрофилы. Встречались как темные, так и светлые гладкомышечные клетки (рис. 59А).

На гистологических срезах дистального отдела ободочной кишки определялись единичные эпителизированные эрозии и язвы (рис. 59 А). Эпителий в этих зонах был высокий призматический с гиперхромными ядрами. В собственной пластинке слизистой оболочки выражена воспалительная инфильтрация (рис. 59 А). Мышечная пластинка не изменена и состояла из 2-3 слоев гладкомышечных клеток. В подслизистой основе выявлялись клетки воспалительного инфильтрата – лимфоциты, плазмоциты, гистиоциты и нейтрофилы.

При хроническом язвенном колите на 56-е сутки (поздний срок) эксперимента в слизистой оболочке ободочной кишки определялись множественные небольшие эпителизированные язвы, были выражены признаки ремоделирования слизистой оболочки – крипты деформированы, просветы их расширены (рис. 61 А), а число снижено, отмечались крипт-абсцессы. Наблюдался очаговый фиброз слизистой оболочки и подслизистой основы, их воспалительная инфильтрация из лимфоцитов, макрофагов и плазмоцитов, наиболее выраженная в базальном отделе собственной пластинки слизистой оболочки (рис. 61 Б, В).

Таким образом, по данным морфологического исследования, на 28-е и 56-е сутки при потреблении животными 1% раствора ДСН у половозрелых мышей С57Bl/6 развивается хронический язвенный колит, характеризующийся эпителизированными язвами, деформацией крипт, максимально выраженной инфильтрацией плазмócитами и лимфоцитами в базальном отделе собственной пластинки слизистой оболочки ободочной кишки.

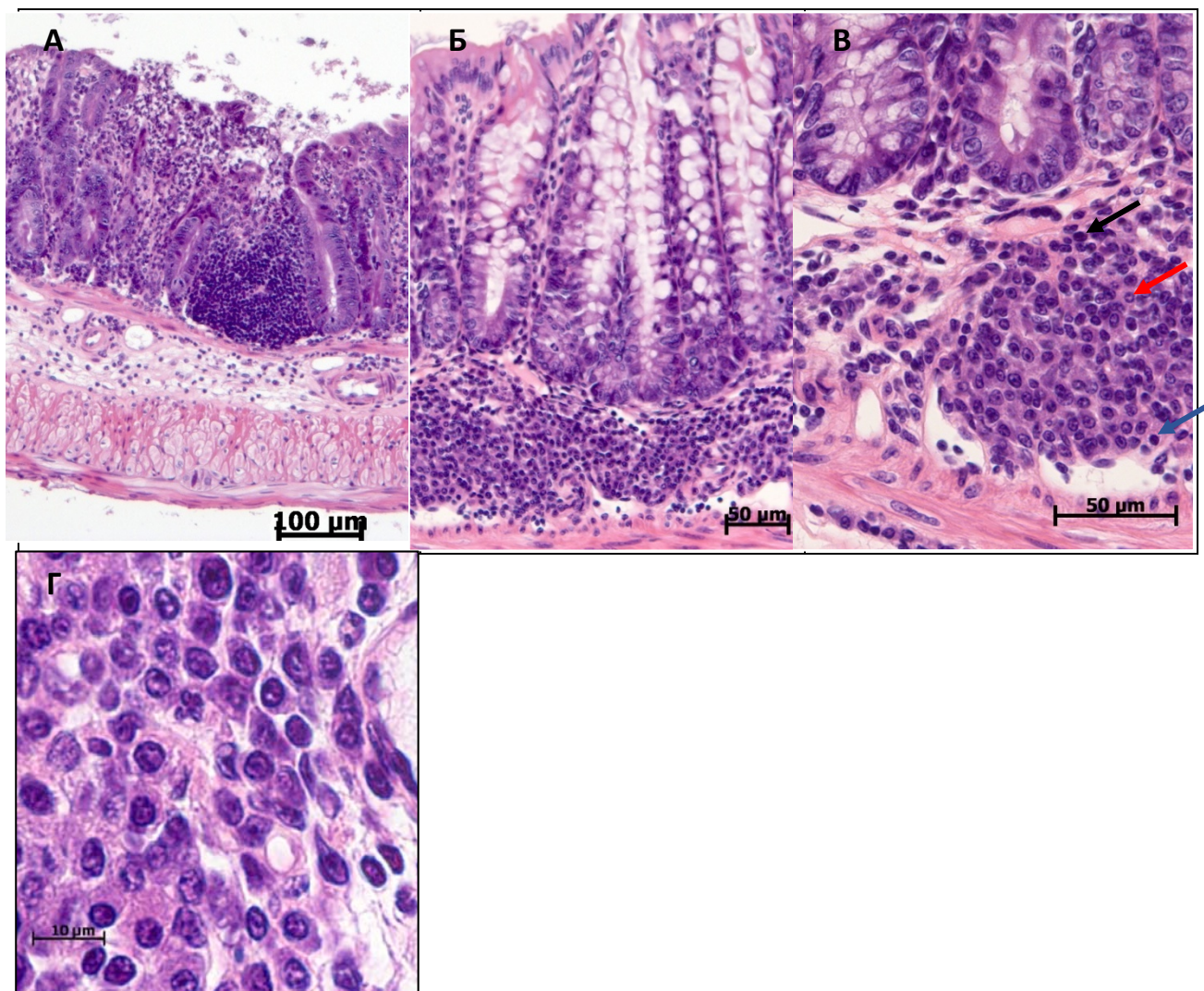


Рис. 59. Морфологические изменения ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 28-е сутки развития. А – эпителизирующаяся язва. В собственной пластинке слизистой оболочки регенераторные изменения: эпителий крипт высокий, цилиндрический, с гиперхромными ядрами, выраженная воспалительная инфильтрация. Б, В, Г – в собственной пластинке слизистой оболочки выраженная воспалительная инфильтрация плазмócитами (черная стрелка), лимфоцитами (синяя стрелка), нейтрофилами (красная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

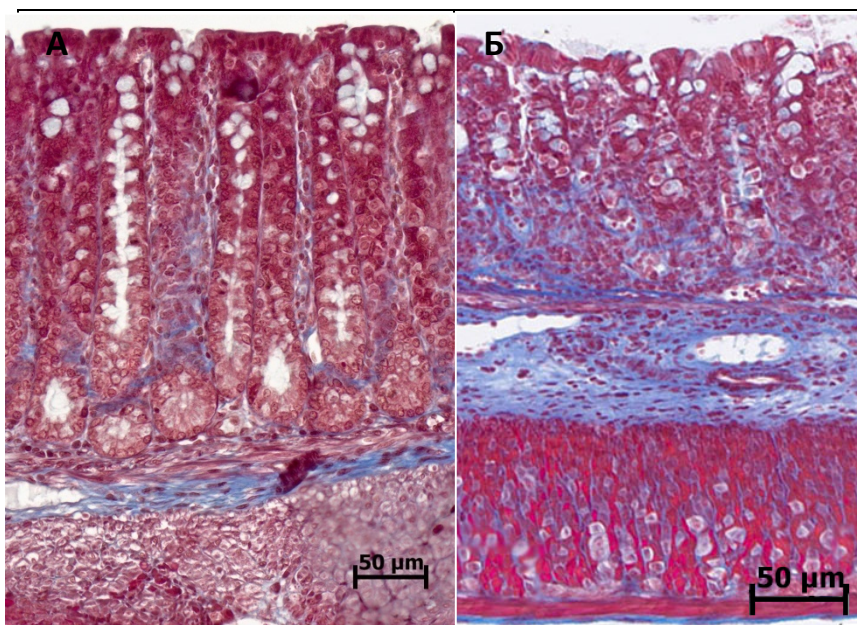


Рис. 60. Ободочная кишка половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы (А) и с хроническим язвенным колитом на 28-е (Б) сутки. Б – фиброз собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистого слоя. Окраска по методу Массона

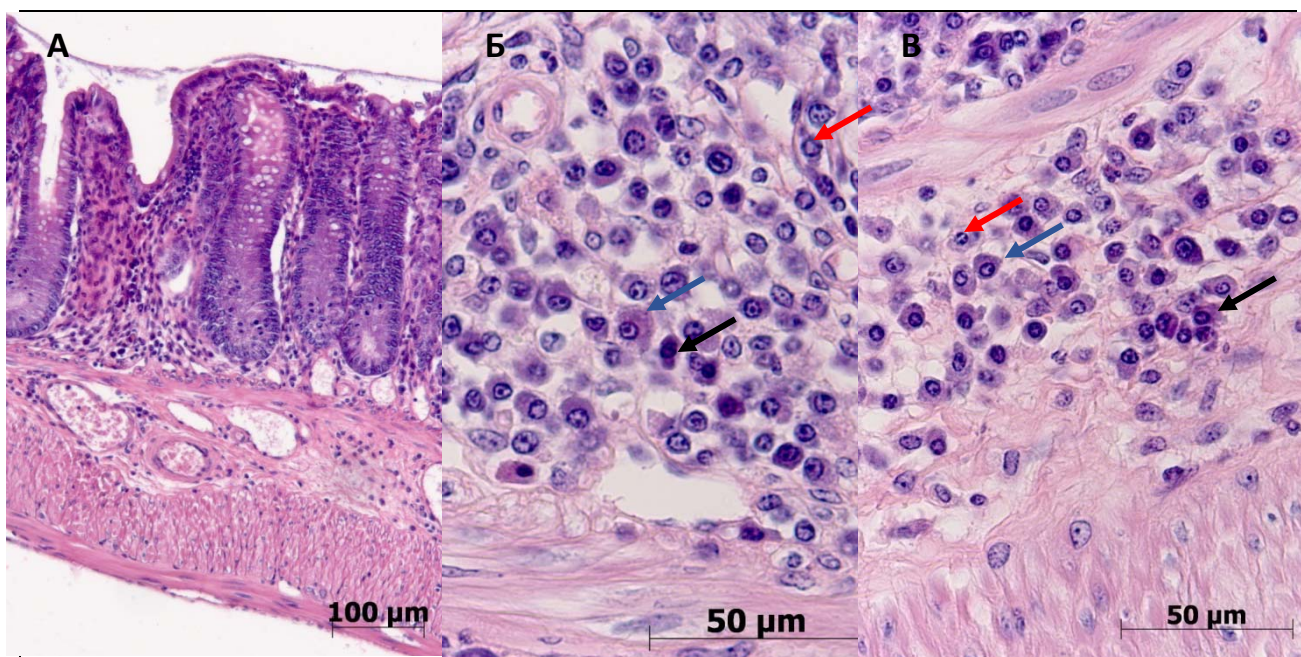


Рис. 61. Морфологические изменения ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 56-е сутки развития. А – эпителизирующаяся язва. В собственной пластинке слизистой оболочки регенераторные изменения: эпителий крипт высокий, цилиндрический, с гиперхромными ядрами, выраженная воспалительная инфильтрация; Б – в собственной пластинке слизистой оболочки выраженная воспалительная инфильтрация плазмócитами (черная стрелка), макрофагами (синяя стрелка), нейтрофилами (красная стрелка); В – в подслизистой основе выраженная воспалительная инфильтрация плазмócитами (черная стрелка), лимфоцитами (синяя стрелка), нейтрофилами (красная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

Субпопуляционный состав лимфоцитов и макрофагов в суспензии клеток ободочной кишки

В суспензии клеток ободочной кишки при хроническом язвенном колите на 28-сутки по сравнению с контролем увеличивалось относительное содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов, $F4/80^+$ макрофагов (табл. 15, рис. 62-64).

При хроническом язвенном колите на 56-сутки по сравнению с контролем в ободочной кишке увеличивалось относительное содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов (табл. 15, рис. 62, 63).

Между ранним и поздним сроком развития хронического язвенного колита изменения по показателям субпопуляций лимфоцитов и макрофагов в стенке ободочной кишки отсутствовали.

Таким образом, в ранний и поздний срок развития хронического язвенного колита по сравнению с контролем в ободочной кишке увеличивалось относительное содержание Т-хелперов, В-лимфоцитов. В ранние сроки развития по сравнению с контролем также увеличивалось относительное содержание макрофагов. Между хроническим язвенным колитом в поздние и ранние сроки развития не было выявлено статистически значимых различий по показателям субпопуляций лимфоцитов и макрофагов в стенке ободочной кишки.

Таблица 15

Субпопуляционный состав лимфоцитов и содержание макрофагов в стенке ободочной кишки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита (Ме (25%-75%))

Показатели в % Группы	Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
		28-е сутки	56-е сутки	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	2.90 (1.60; 3.50)	17.0 (13.50; 24.40)	8.20 (5.90; 12.20)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.04$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0.0006$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.17$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	1.60 (1.00; 2.00)	0.20 (0.20; 1.70)	0.60 (0.15; 3.25)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.77$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0.65$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.89$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	1.40 (0.40; 1.80)	12.0 (3.70; 12.20)	14.60 (7.70; 30.50)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.002$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0.04$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.96$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	15.40 (14.50; 29.30)	70.25 (38.20; 81.20)	48.10 (23.40; 66.70)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.13$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0.26$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.75$
F4/80 ⁺ макрофаги	0.60 (0.60; 1.80)	2.40 (1.0; 3.20)	3.30 (2.30; 4.20)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.04$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0.74$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.88$

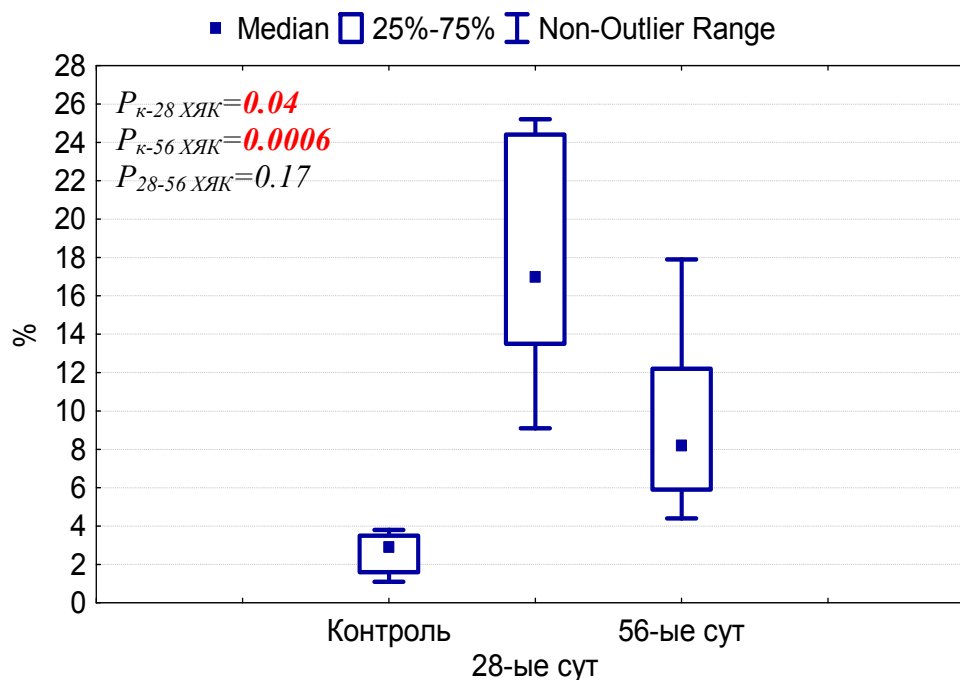


Рис. 62. Относительное содержание CD3⁺CD4⁺Т-хелперов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

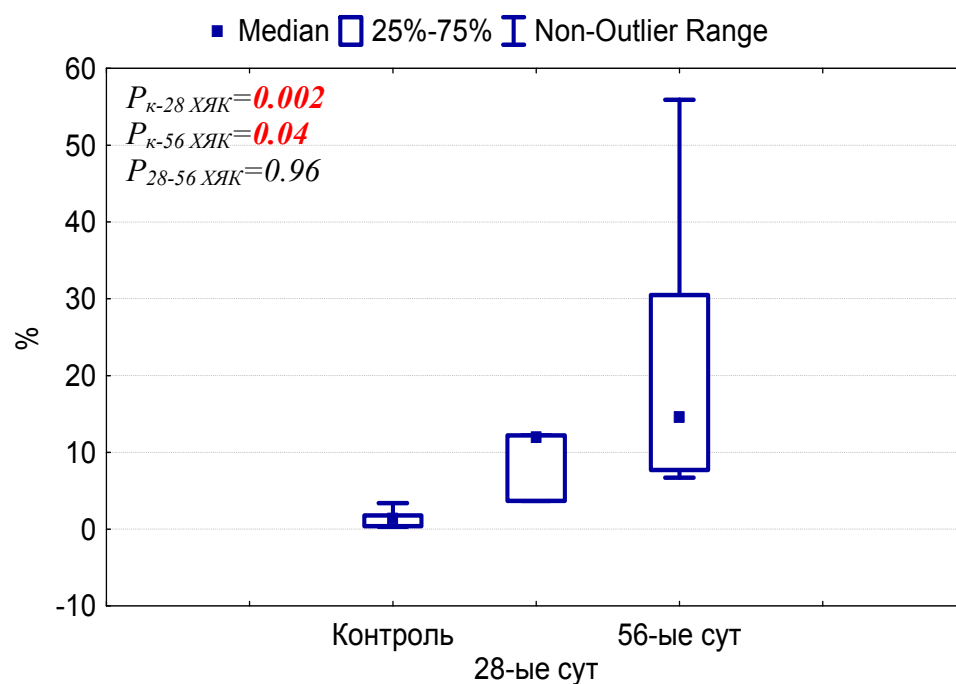


Рис. 63. Относительное содержание $\text{CD3}^+\text{CD19}^+$ В-лимфоцитов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

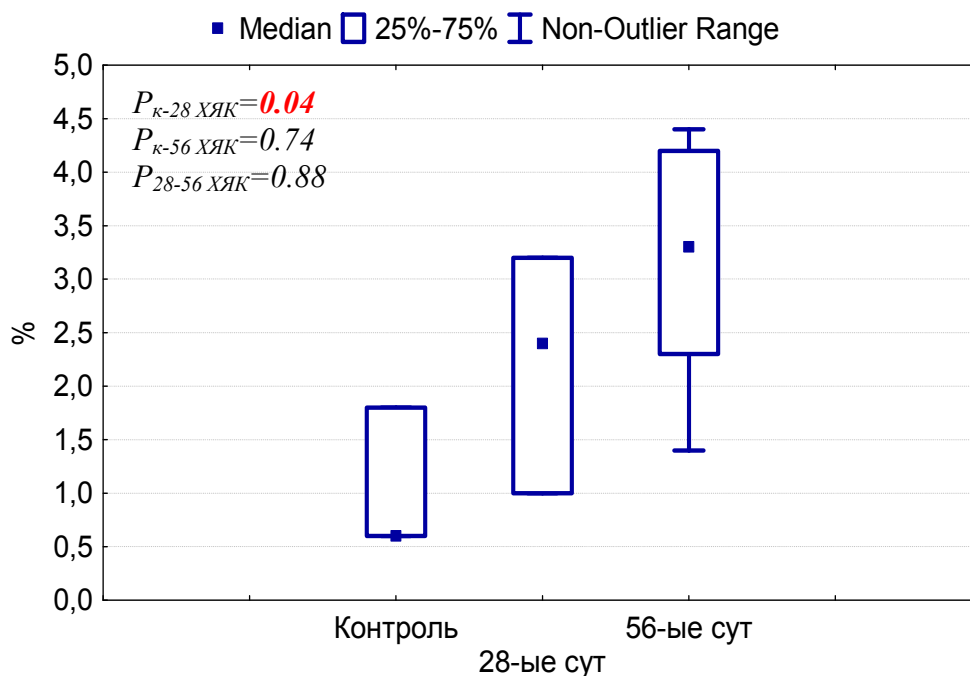


Рис. 64. Относительное содержание F4/80^+ макрофагов в суспензии клеток ободочной кишки у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

3.2.2. Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови

При хроническом язвенном колите на 56-е сутки по сравнению с контролем в периферической крови возросло относительное содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов, а также абсолютное количество $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 16, рис. 65).

Между хроническим язвенным колитом в ранние и поздние сроки развития не было выявлено статистически значимых различий по показателям субпопуляций лимфоцитов в периферической крови.

Таблица 16

Субпопуляционный состав лимфоцитов в периферической крови у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
			28-е сутки	56-е сутки	
Лейкоциты	$10^6/\text{мл}$	9.40 (8.80; 9.60)	9,80 (7,2; 9,8)	9,2 (7,9; 11,7)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,12$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,26$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,35$
Лимфоциты	$10^6/\text{мл}$	7.50 (7,07; 8,10)	7,20 (5,6; 8,4)	7,2 (6,26; 9,4)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,31$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,10$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,41$
$CD3^+CD4^+$ Т-хелперы	% от лф*	14.80 (14.14; 16.0)	15,50 (13,5; 16,3)	12,10 (6,90; 14,20)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,75$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,04$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,27$
	$10^6/\text{мл}$	1.17 (1.14; 1.23)	0,87 (0,74; 1,4)	0,81 (0,56; 1,19)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,89$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,17$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,94$
$CD3^+CD8^+$ цитотоксические Т-лимфоциты	% от лф	12.86 (11.20; 14.60)	13,70 (12,6; 14,8)	10,05 (9,30; 12,0)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=1,0$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,31$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,41$
	$10^6/\text{мл}$	1.01 (0.91; 1.17)	0,81 (0,77; 1,18)	0,82 (0,66; 0,98)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,68$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,30$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=1,0$
$CD3^-CD19^+$ В-лимфоциты	% от лф	65.80 (57.90; 66.80)	64,90 (63,2; 65,3)	50,05 (38,70; 63,50)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,78$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,11$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,28$
	$10^6/\text{мл}$	4.49 (3.04; 5.35)	5,25 (3,66; 5,3)	3,50 (2,57; 4,48)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=1,0$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,79$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,62$
$CD4^+CD25^+$ $FOXP3^+$ регуляторные Т-лимфоциты	% от Тх [#]	2.80 (2.40; 3.60)	3,90 (3,5; 6,8)	9,7 (6,5; 11,5)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,06$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,0001$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,23$
	$10^3/\text{мл}$	33.57 (25.66; 46.82)	53,55 (28,86; 54,02)	60,23 (44,21; 121,66)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,72$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,02$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,81$

Условные обозначения: * Лф – лимфоциты; [#]Тх – Т-хелперы

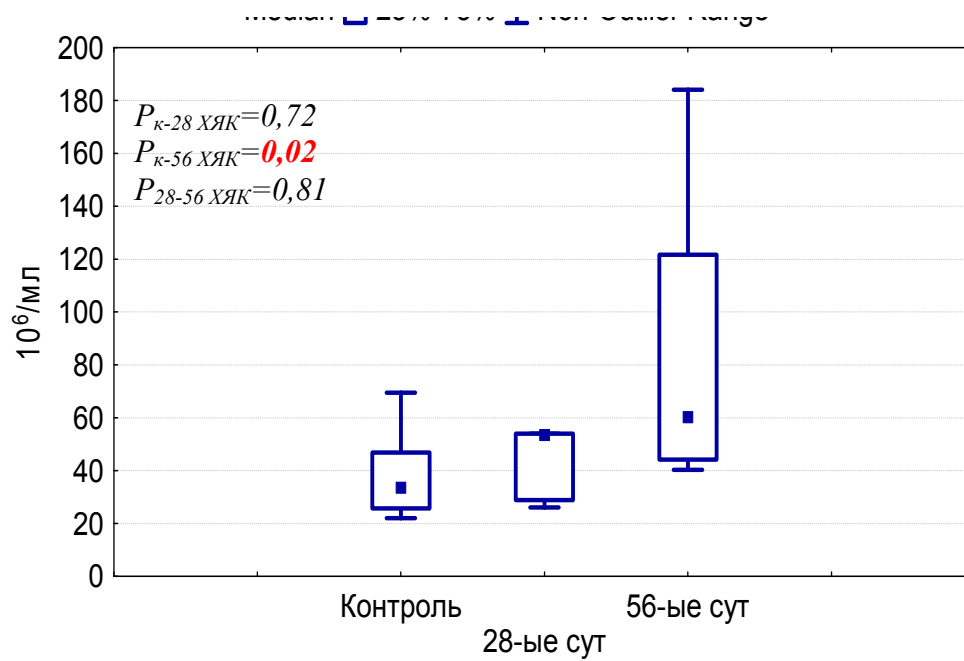


Рис. 65. Абсолютное количество $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

3.2.3. Уровень эндотоксина в сыворотке крови

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у мышей на 28-е сутки хронического язвенного колита статистически значимо не отличался от животных контрольной группы, а у мышей с хроническим язвенным колитом на 56-е сутки был в 4 раз выше, чем у животных контрольной группы и в 15 раз выше, чем у животных с хроническим язвенным колитом на 28-е сутки (табл. 17, рис. 66).

Таким образом, в поздние сроки развития хронического язвенного колита выявлена эндотоксинемия. Животные контрольной группы не отличались от хронического язвенного колита в ранние сроки развития по уровню эндотоксина в сыворотке крови.

Таблица 17

Уровень эндотоксина в сыворотке крови у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы	Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
		28-е сутки	56-е сутки	
Эндотоксин (EU/ml)	0.08 (0; 0.24)	0.02 (0.01; 0.12)	0,31 (0,28; 0,44)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,40$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,02$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,01$

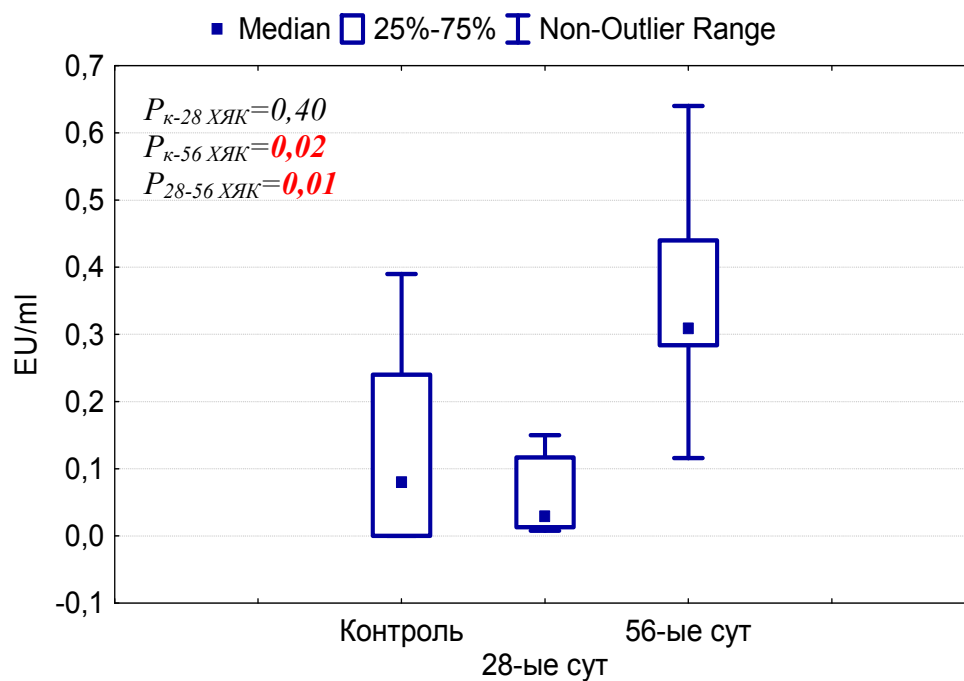


Рис. 66. Уровень эндотоксина в сыворотке крови у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

3.2.4. Морфофункциональная характеристика тимуса

Морфологическая характеристика тимуса

Тимус животных контрольной группы имел нормальное строение, реактивные изменения в нем отсутствовали.

При морфологическом исследовании на 28-е сутки развития хронического язвенного колита в тимусе развивалась умеренная акцидентальная инволюция. Кортикальное вещество преобладало, но было очаговоопустошено, во всех дольках выявлялась картина «звездного неба» (рис. 67 А, Б), что является следствием увеличения гибнущих тимоцитов в корковом веществе, а также количества макрофагов их фагоцитирующих. Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткие (рис. 67 Б, 68 А). Субкапсулярная зона тимуса представлена 5-8 рядами лимфобластов. Как среди лимфобластов субкапсулярной зоны, так и среди лимфоцитов коркового вещества выявлялись митотически делящиеся клетки. У 6 животных из 22 мозговое вещество тимуса опустошено, в нем выявлялись эпителиальные клетки и лимфоциты, причем лимфоциты преобладали. В мозговом веществе определялись многочисленные тимические тельца (рис. 68) из 3-7 и более эпителиальных клеток, а также с отложениями кератогиалина. Тимические тельца в виде кистоподобных полостей определялись в корковом, на границе коркового и мозгового и в мозговом веществе. У 6 животных из 22 тимические тельца в виде кистоподобных полостей формировали «розетки» — скопления трех и более кист.

При хроническом язвенном колите на 56-е сутки в тимусе у 14 животных из 16 выявлена умеренная акцидентальная инволюция, а у двух животных — выраженная. Кортикальное вещество преобладало, но было очаговоопустошено, во всех дольках выявлялась картина «звездного неба» (рис. 69 Б), что является следствием увеличения гибнущих лимфоцитов в корковом веществе, а также количества макрофагов, фагоцитирующих

гибнущие тимоциты. Границы между корковым и мозговым веществом были очагово нечеткие (рис. 69 А, Б). Субкапсулярная зона тимуса представлена 5-8 рядами лимфобластов. Как среди лимфобластов субкапсулярной зоны, так и среди лимфоцитов коркового вещества выявлялись митотически делящиеся клетки. Мозговое вещество тимуса опустошено, в нем выявлялись эпителиальные клетки и лимфоциты, причем лимфоциты преобладали. В мозговом веществе определялись многочисленные тимические тельца (рис. 69В, Г, 70) из 3-7 и более эпителиальных клеток и с отложениями кератогиалина. Тимические тельца в виде кистоподобных полостей определялись как на границе коркового и мозгового вещества, так и в мозговом и корковом веществе у 7 животных из 16.

При морфометрическом исследовании у животных с хроническим язвенным колитом на 56-е сутки по сравнению с контрольной группой уменьшалась объемная доля мозгового вещества, повышалась объемная доля коркового вещества и, как следствие, индекс отношения объемной плотности коркового к мозговому веществу (табл. 18, рис. 71).

Таким образом, по данным морфологического и морфометрического исследования в ранние и поздние сроки развития хронического язвенного колита в тимусе выявляется гиперплазия коркового вещества.

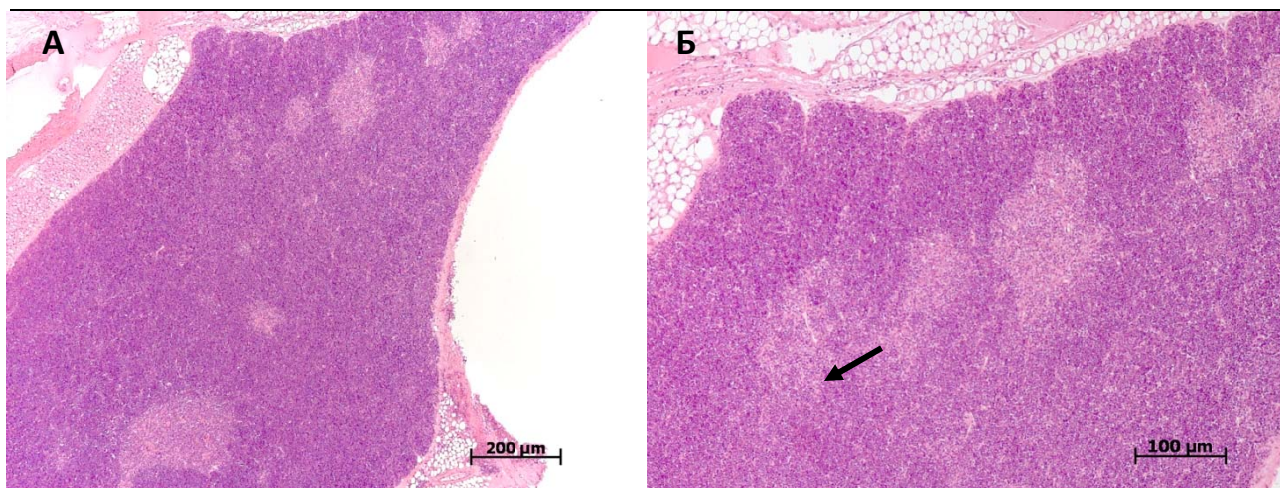


Рис. 67. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 28-е сутки эксперимента. А, Б – гиперплазия коркового вещества тимуса. Кортикальное вещество плотно заселено лимфоцитами, резко расширено. Границы коркового и мозгового вещества очагово нечеткие (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

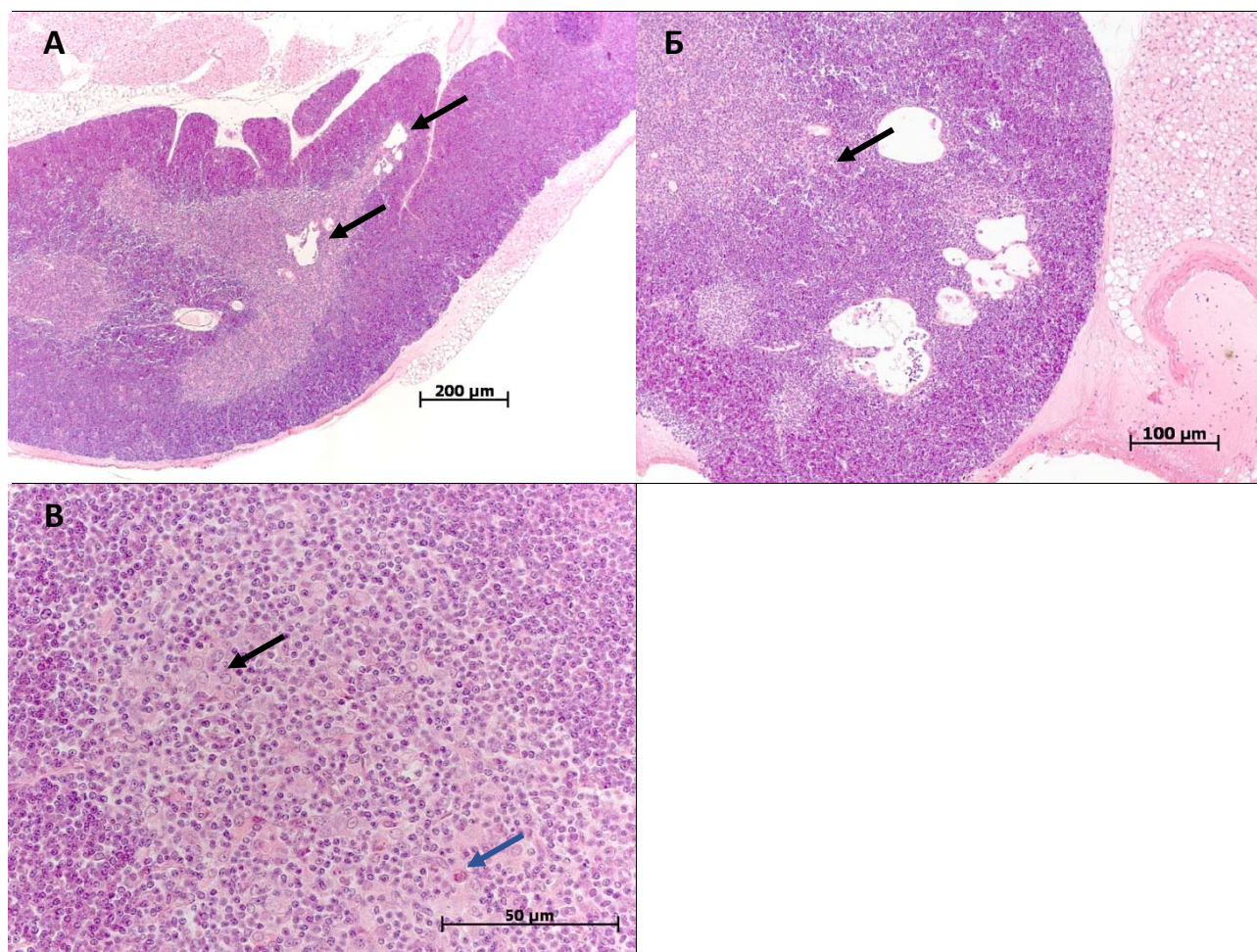


Рис. 68. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 28-е сутки эксперимента. А – корковое вещество преобладает и плотно заселено лимфоцитами. В мозговом веществе, а также на границе коркового и мозгового вещества определяется скопление тимических телец в виде кистоподобных полостей (черная стрелка); **Б** – границы коркового и мозгового вещества очагово нечеткие (черная стрелка). В корковом веществе выявляется скопление тимических телец в виде кистоподобных полостей. **В** – мозговое вещество тимуса. Тимические тельца, состоящие из 3-5 эпителиальных клеток (черная стрелка), тимические тельца с отложениями кератогиалина (синяя стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

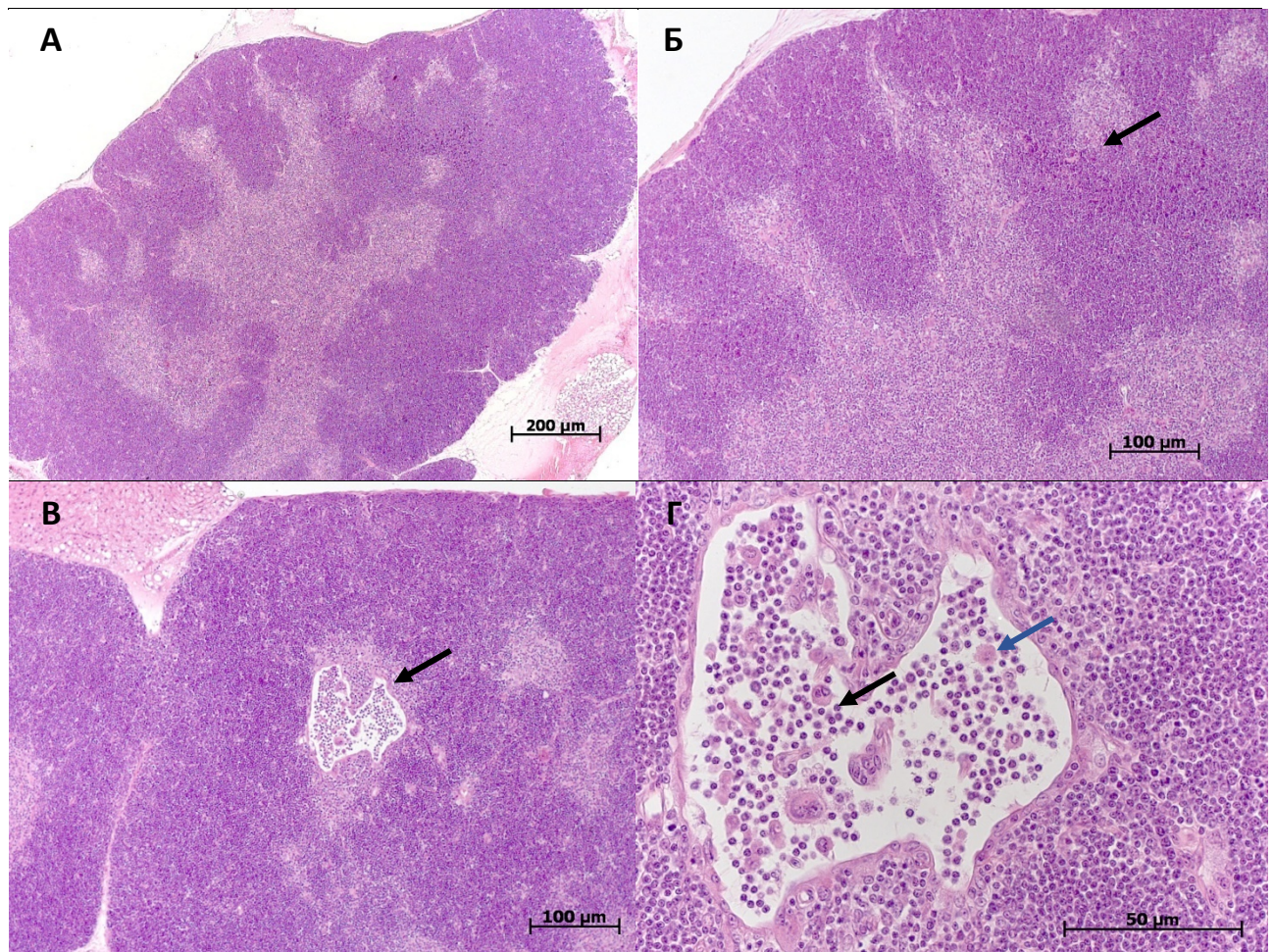


Рис. 69. Морфологическая характеристика тимуса у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 56-е сутки эксперимента. А, Б – корковое вещество плотно заселено лимфоцитами, границы между корковым и мозговым веществом очагово нечеткие (черная стрелка); В, Г – на границе коркового и мозгового вещества гигантское тимическое тельце (черная стрелка); Г – тимическое тельце в виде кистоподобной полости выстлано эпителиальными клетками тимуса, в просвете полости определяются многочисленные лимфоциты (черная стрелка) и небольшое число макрофагов (синяя стрелка). Окраска гематоксилином и эозином

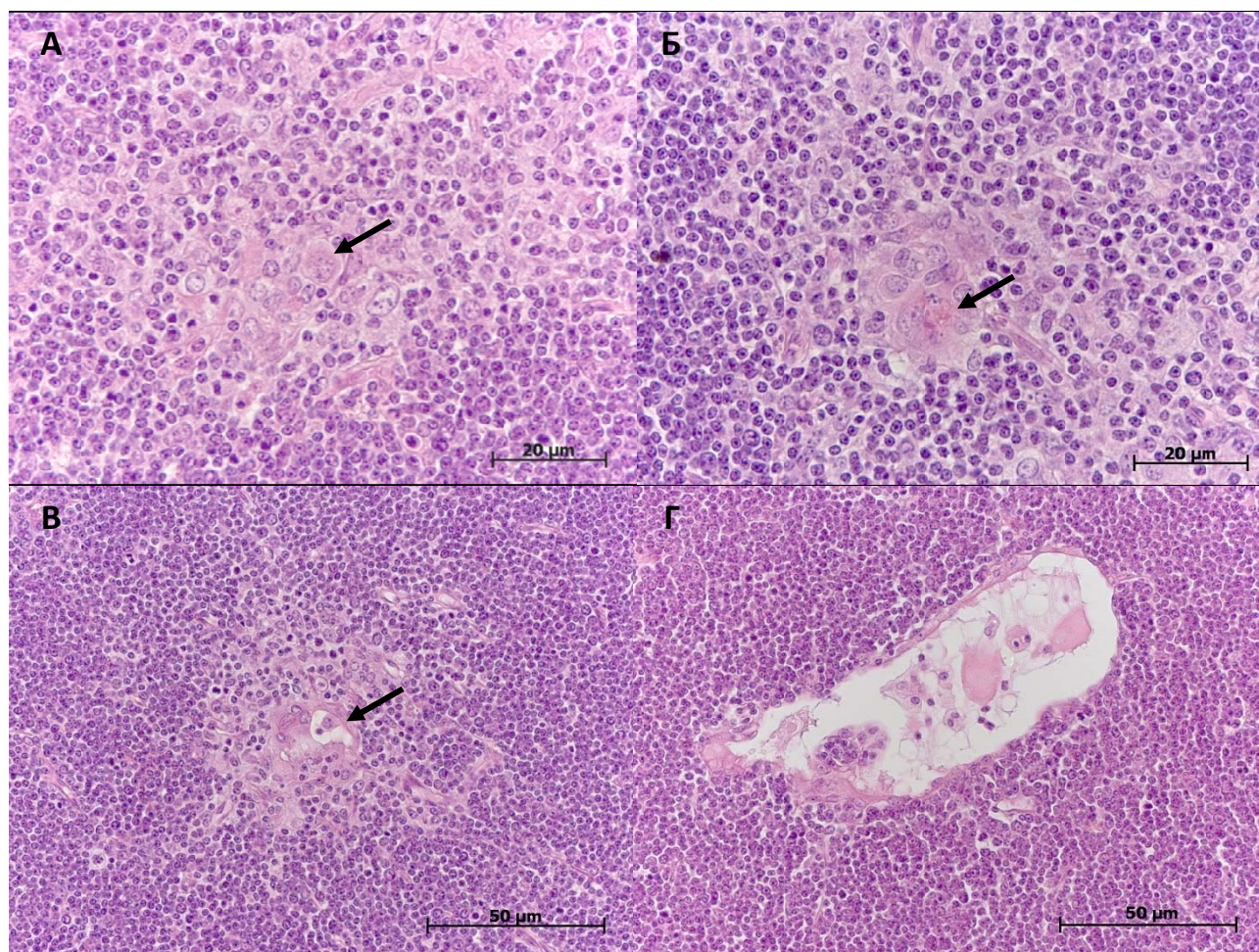


Рис. 70. Морфологическая характеристика тимических телец у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 56-е сутки эксперимента. А-В – тимическое тельце, состоящее из скопления эпителиальных клеток (черная стрелка); Б – кератинизация центральной части тимического тельца (черная стрелка); В – начальный этап образования полости в тимическом тельце (черная стрелка); Г – тимическое тельце в виде кистоподобной полости, выстланной эпителиальными клетками, в просвете отпределяются лимфоциты и эозинофильные массы. Окраска гематоксилином и эозином

Таблица 18

Показатели объемной доли структурно-функциональных зон тимуса у половозрелых самцов мышей С57Вl/6 контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита (Ме (25%-75%))

Показатели	Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		<i>P</i>
		28-е сутки	56-е сутки	
Корковое вещество, в %	65.0 (62.50;73.50)	74,0 (62,0;85,0)	78,5 (76,0; 87,0)	$P_{к-28\text{ ХЯК}}=0,46$ $P_{к-56\text{ ХЯК}}=0,01$ $P_{28-56\text{ ХЯК}}=0,2$
Мозговое вещество, в %	30.50 (24.0;36.50)	26,0 (15,0;38,0)	21,5 (13,0; 24,0)	$P_{к-28\text{ ХЯК}}=0,42$ $P_{к-56\text{ ХЯК}}=0,04$ $P_{28-56\text{ ХЯК}}=0,2$
Индекс отношения объемной плотности коркового вещества к мозговому, усл. ед.	2,25 (1,70;2,82)	2,85 (1,63;5,67)	3,65 (1,2; 6,7)	$P_{к-28\text{ ХЯК}}=0,85$ $P_{к-56\text{ ХЯК}}=0,03$ $P_{28-56\text{ ХЯК}}=0,2$

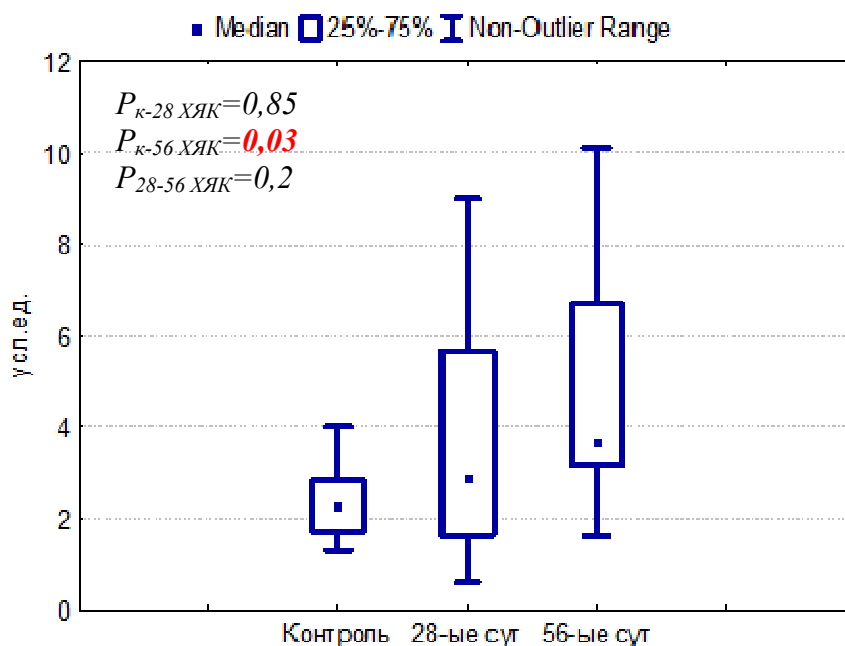


Рис. 71. Индекс отношения объемной плотности коркового вещества к мозговому у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

Субпопуляционный состав лимфоцитов тимуса

При хроническом язвенном колите на 28-е сутки по сравнению с контролем в тимусе снижалось абсолютное число $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов, также относительное содержание $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов (табл. 19; рис. 73).

При хроническом язвенном колите на 56-е сутки по сравнению с контролем в тимусе уменьшалось относительное и абсолютное количество $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов (табл. 19, рис. 73).

Относительное содержание $CD4^+CD8^+$ незрелых дубль позитивных лимфоцитов было ниже в ранние сроки развития хронического язвенного колита (табл. 19).

Таким образом, в ранние и поздние сроки развития хронического язвенного колита по сравнению с контролем в тимусе снижалось абсолютное число В-лимфоцитов, в ранние сроки уменьшалось относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов. Между хроническим язвенным колитом в ранние и поздние сроки развития выявлены статистически значимые различия по показателю $CD4^+CD8^+$ незрелых дубль позитивных лимфоцитов.

Таблица 19

Субпопуляционный состав лимфоцитов в тимусе у половозрелых самцов
мышей С57В1/6 контрольной группы и в разные сроки развития
хронического язвенного колита (Ме (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
			28-е сутки	56-е сутки	
Лимфоциты	10 ⁶ /мл	47.3 (35.8; 56.7)	38,24 (28,24; 58,49)	47,0 (47,0; 49,0)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,26$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,1$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,3$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	% от лф*	16.7 (14.7; 19.5)	16,1 (15,9; 17,0)	14,6 (13,8; 15,7)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,9$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,6$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,5$
	10 ⁶ /мл	7.9 (5.2; 11.1)	6,81 (4,51; 9,3)	6,76 (6,13; 7,4)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,41$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,38$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,46$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	% от лф	7.8 (6.9; 8.8)	5,9 (5,7; 6,1)	6,0 (5,2; 6,6)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,05$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,09$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,75$
	10 ⁶ /мл	3.7 (2.5; 5.1)	2,2 (1,7; 3,4)	2,8 (2,5; 2,8)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,1$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,19$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,34$
CD4 ⁺ CD8 ⁺ дубль позитивные лимфоциты	% от лф	32.45 (24.2; 37.5)	24,7 (23,8; 26,2)	34,1 (32,0; 34,8)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,32$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,8$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,05$
	10 ⁶ /мл	13.3 (10.2; 16.7)	7,3 (6,9; 16,9)	16,0 (13,6; 17,05)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,29$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,2$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,07$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	% от лф	0.5 (0.4; 0.6)	0,2 (0,1; 0,2)	0,1 (0,1; 0,1)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,15$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,007$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,77$
	10 ⁶ /мл	0.2 (0.1; 0.3)	0,06 (0,05; 0,1)	0,04 (0,04; 0,05)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,01$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,0008$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,09$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	% от Тх [#]	0.4 (0.4; 0.8)	0,4 (0,4; 0,4)	0,4 (0,2; 0,5)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,5$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,8$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,3$
	10 ³ /мл	25.8 (16.2; 38.1)	27,9 (18,03; 40,8)	23,9 (14,7; 30,7)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0,39$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,26$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,35$

Условные обозначения: * Лф – лимфоциты; [#]Тх – Т-хелперы

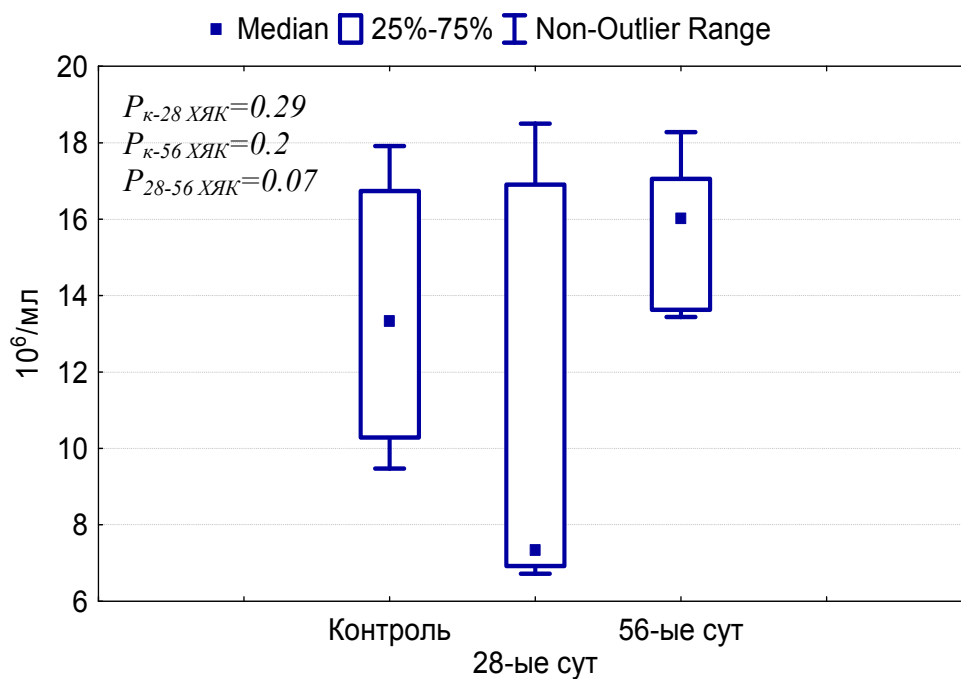


Рис. 72. Абсолютное количество $CD4^+CD8^+$ дубль позитивных Т-лимфоцитов в тимусе у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

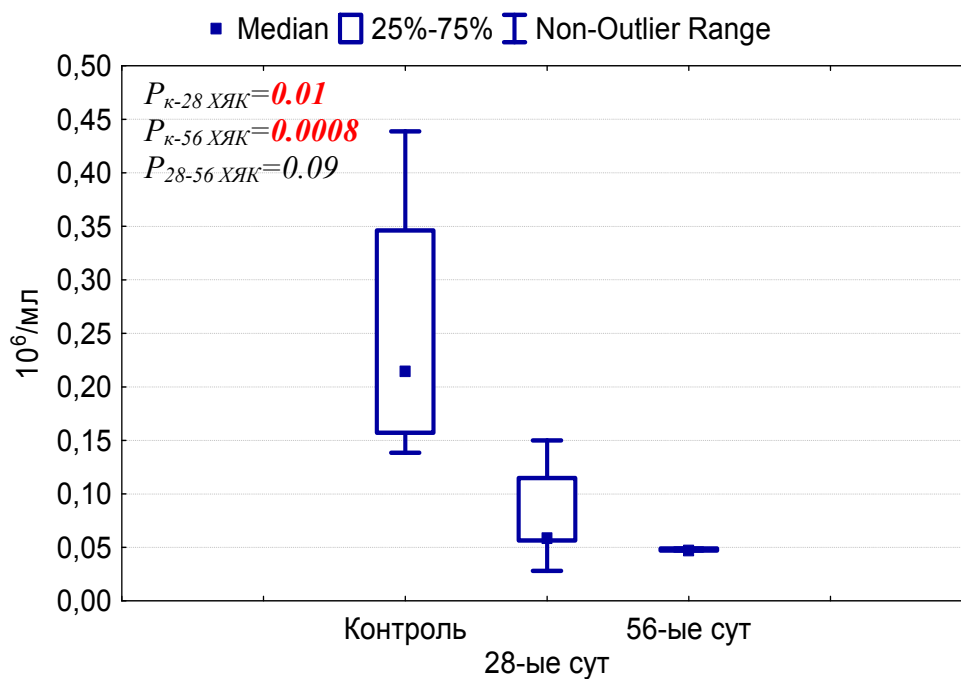


Рис. 73. Абсолютное количество $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов в тимусе у животных контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

Состав нелимфоидных клеток тимуса

По данным морфологического и морфометрического исследования на окрашенных гематоксилином и эозином срезах тимуса при хроническом язвенном колите на 56-е сутки, по сравнению с 28-ми сутками в мозговом веществе наблюдалась гиперплазия эпителиальных клеток. На 56-е сутки хронического язвенного колита в тимусе по сравнению с контролем увеличивалась площадь тимических телец, и среди них тимических телец, состоящих из скопления эпителиальных клеток (табл. 20). В оба срока хронического язвенного колита увеличивалась объемная доля тимических телец, состоящих из 3-7 эпителиальных клеток, выявлялось большое число тимических телец в виде кистоподобных полостей, как в мозговом, так и в корковом веществе (табл. 20).

По данным морфометрического исследования тимических телец, состоящих из цитокератин-19 позитивных эпителиальных клеток, у мышей на 56-е сутки развития хронического язвенного колита площадь тимических телец повышалась по сравнению с животными контрольной группы (табл. 21; рис. 74). В оба срока хронического язвенного колита увеличивалось количество тимических телец, состоящих из цитокератин-19 позитивных эпителиальных клеток (табл. 21, рис. 75, 76)

По данным проточной цитофлуориметрии в тимусе на 28-е сутки хронического язвенного колита по сравнению с контролем увеличивалось относительное содержание $CD326^{+}UEA^{+}CD205^{-}$ эпителиальных клеток мозгового вещества, $CD45^{+}CD4^{-}CD8^{-}CD11c^{+}$ дендритных клеток и снижалось число $CD326^{+}UEA^{-}CD205^{+}$ эпителиальных клеток коркового вещества (табл. 22; рис. 77-79). При хроническом язвенном колите на 56-е сутки по сравнению с контролем увеличивалось относительное количество $CD326^{+}UEA^{+}CD205^{-}$ эпителиальных клеток мозгового вещества, снижалось содержание $CD326^{+}UEA^{-}CD205^{+}$ эпителиальных клеток коркового вещества,

CD45⁺CD4⁻CD8⁻CD11c⁺ дендритных клеток, а также F4/80⁺ макрофагов (табл. 22; рис. 77-80).

Таким образом, по данным морфологического и морфометрического исследования в сочетании с проточной цитофлуориметрией в поздние сроки развития хронического язвенного колита в тимусе наблюдалась более выраженная гиперплазия эпителия.

Таблица 20

Морфометрические показатели тимических телец у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита (Me (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
			28-е сутки	56-е сутки	
Площадь от мозгового вещества, %	Тимические тельца	1.88 (1.45; 2.22)	2.08 (1.13; 3.04)	3.33 (2.8; 4.6)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0.21$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0.0003$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.001$
	Кистоподобные тельца	Не выявлены	21.18 (15.02; 31.1)	10.46 (3.32; 25.75)	$P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.06$
Доля от общего количества тимических телец, %	из 3-7 эпителиальных клеток	100.0 (83.0; 100.0)	62.5 (50.0; 83.0)	58.5 (50.0; 75.0)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0.007$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0.001$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=1,0$
	из 7 и более эпителиальных клеток	17.0 (12.5; 20.0)	25.0 (20.0; 37.5)	33.0 (25.0; 50.0)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0.21$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,03$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,55$
	с кератогиалином	12.5 (11.0; 16.0)	21.0 (15.0; 22.0)	18.0 (13.75; 21.5)	$P_{K-28 \text{ ХЯК}}=0.11$ $P_{K-56 \text{ ХЯК}}=0,4$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,98$
	в виде кистоподобных полостей	Не выявлены	18.5 (16.0; 35.3)	17.0 (15.0; 33.0)	$P_{28-56 \text{ ХЯК}}=1,0$

Таблица 21

Количество и площадь цитокератин 19 позитивных тимических телец у половозрелых самцов мышей С57В1/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита (Me (25%-75%))

Параметры \ Группы	Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
		28-е сутки	56-е сутки	
Площадь СК19 ⁺ тимических телец, мкм ²	154.5 (50.17; 214.24)	163,49 (108,9; 298,56)	185,67 (122,74; 310;67)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,11$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,01$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,44$
Количество СК19 ⁺ тимических телец, абс. число	1.0 (0; 1.0)	6,0 (3,0; 7,0)	4,5 (2,5; 6,0)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,001$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,001$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,89$

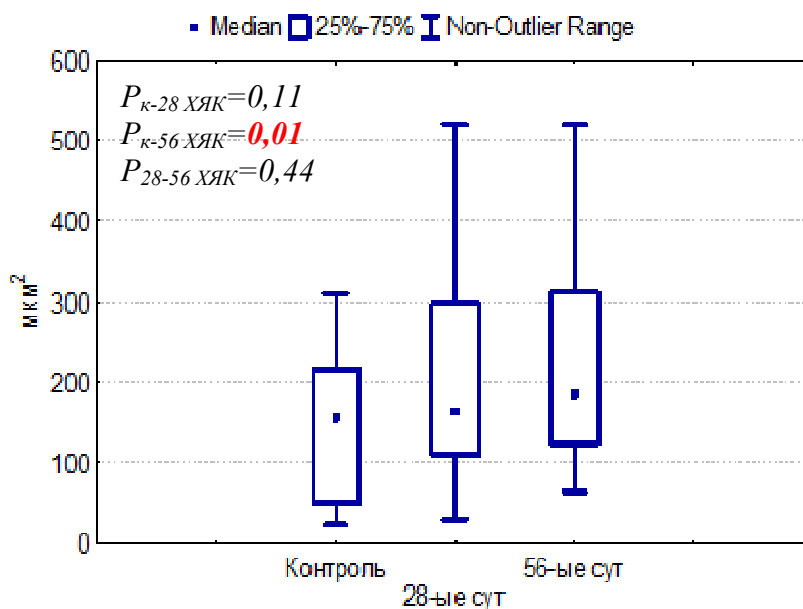


Рис. 74. Площадь тимических телец, состоящих из цитокератин 19 положительных эпителиальных клеток, у животных контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

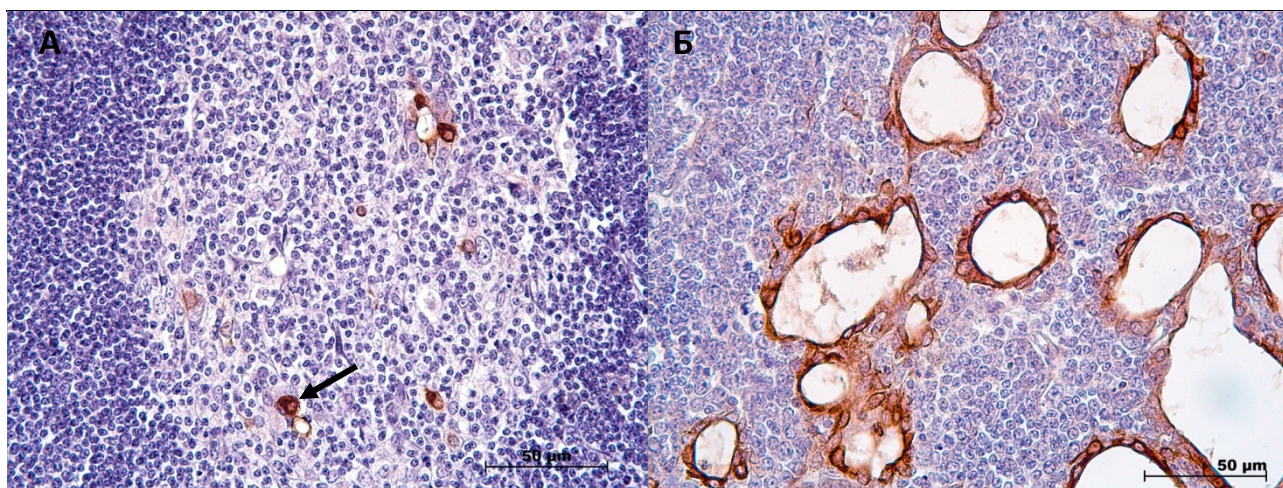


Рис. 75. Морфологическая характеристика эпителиальных клеток тимуса у мышей с хроническим язвенным колитом на 28-е сутки эксперимента. А – многочисленные тимические тельца, состоящие из скопления цитокератин-19 позитивных эпителиальных клеток (черная стрелка); **Б** – скопление тимических телец в виде кистоподобных полостей, выстланных эпителиальными клетками, экспрессирующими цитокератин-19. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19

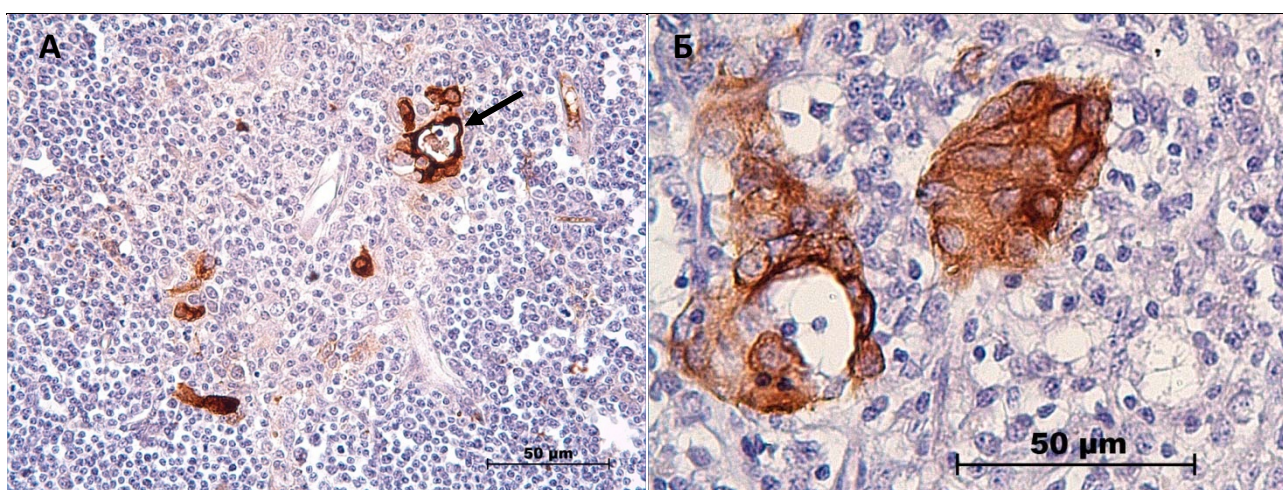


Рис. 76. Морфологическая характеристика эпителиальных клеток тимуса у мышей с хроническим язвенным колитом на 58-ые сутки эксперимента. А – тимические тельца, состоящие из скопления цитокератин-19 позитивных эпителиальных клеток, тимическое тельце, в центральной части начало формирования кистоподобной полости (черная стрелка); **Б** – крупные тимические тельца состоящие из скоплений эпителиальных клеток, экспрессирующих цитокератин-19, начало формирования кистоподобной полости. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к цитокератину-19

Состав нелимфоидных клеток тимуса у половозрелых самцов мышей С57В1/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита (Ме (25%-75%))

Показатели, в %	Группы	Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
			28-е сутки	56-е сутки	
CD326 ⁺ UEA ⁺ CD205 ⁻ эпителиальные клетки мозгового вещества тимуса		2.6 (2.1; 2.8)	6.2 (5.0; 6.4)	22,05 (19,6; 23,1)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,0001$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,0003$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,0003$
CD326 ⁺ UEA ⁻ CD205 ⁺ эпителиальные клетки коркового вещества тимуса		7 (6.3; 9.2)	1,6 (1,2; 3,3)	5,1 (4,0; 6,7)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,0008$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,03$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,01$
CD45 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD11c ⁺ дендритные клетки		1.3 (1.2; 1.4)	2,5 (2,0; 3,6)	0,9 (0,8; 1,4)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,003$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,15$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,001$
F4/80 ⁺ макрофаги		14.5 (12.6; 16.0)	11,8 (8,9; 14,4)	3,4 (3,1; 3,6)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,26$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,0005$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,001$

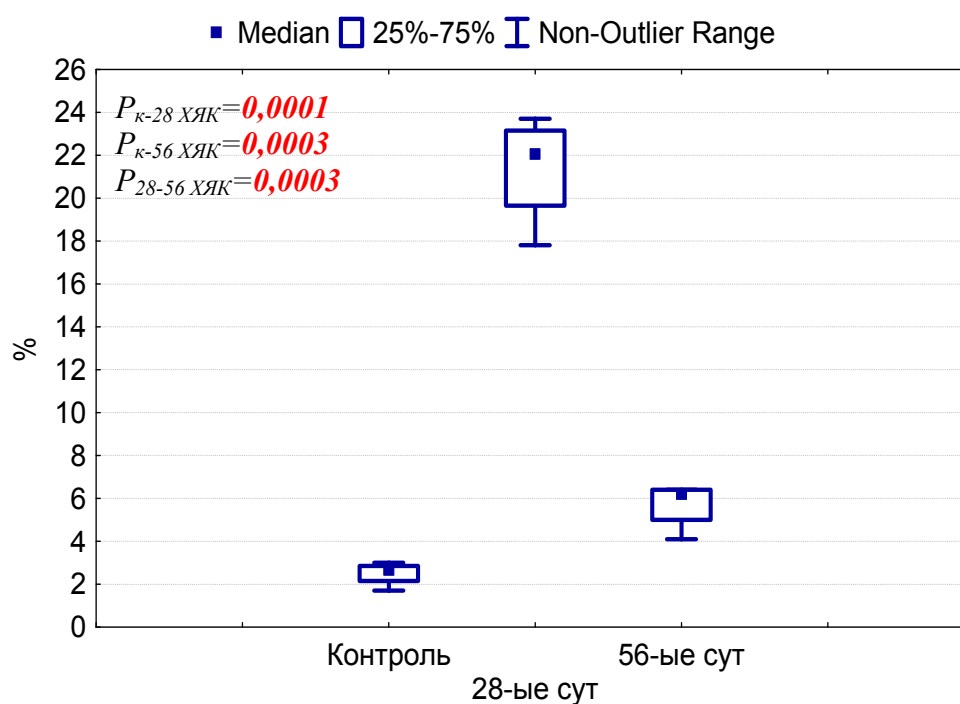


Рис. 77. Относительное содержание CD326⁺UEA⁺CD205⁻ эпителиальных клеток мозгового вещества тимуса у животных контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

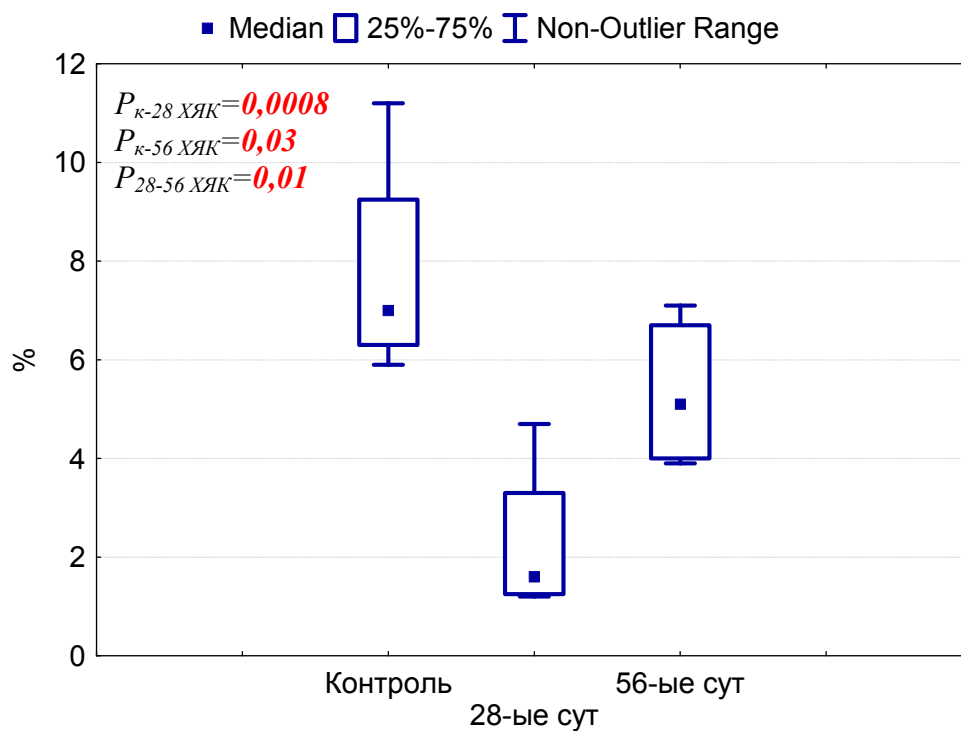


Рис. 78. Относительное содержание $\text{CD326}^+\text{UEA}^-\text{CD205}^+$ эпителиальных клеток коркового вещества тимуса у животных контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

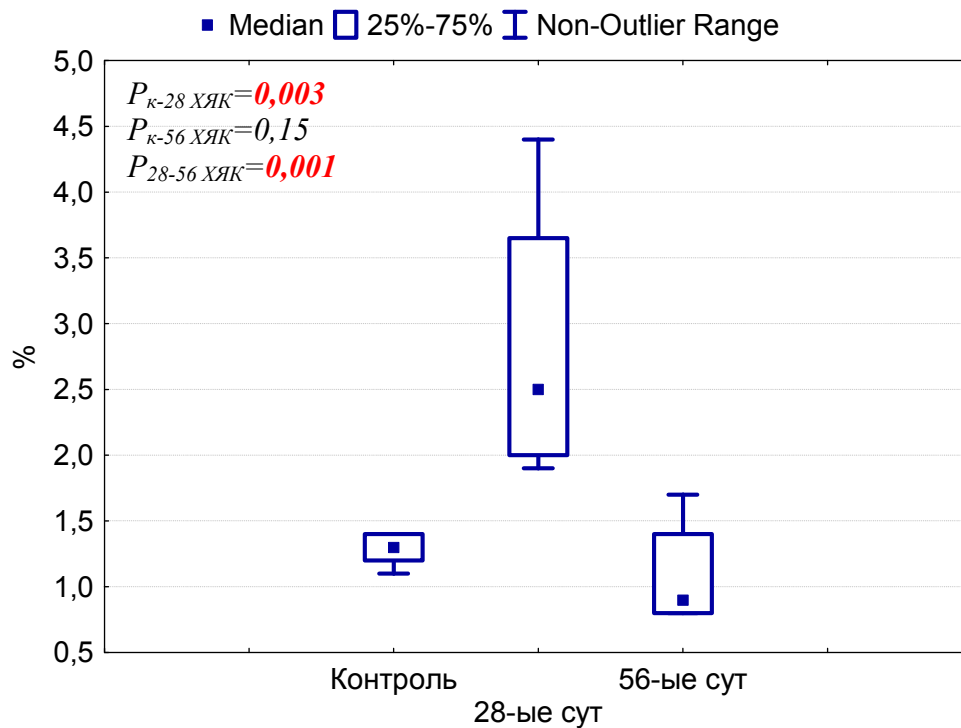


Рис. 79. Относительное содержание $\text{CD45}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD11c}^+$ дендритных клеток тимуса у животных контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

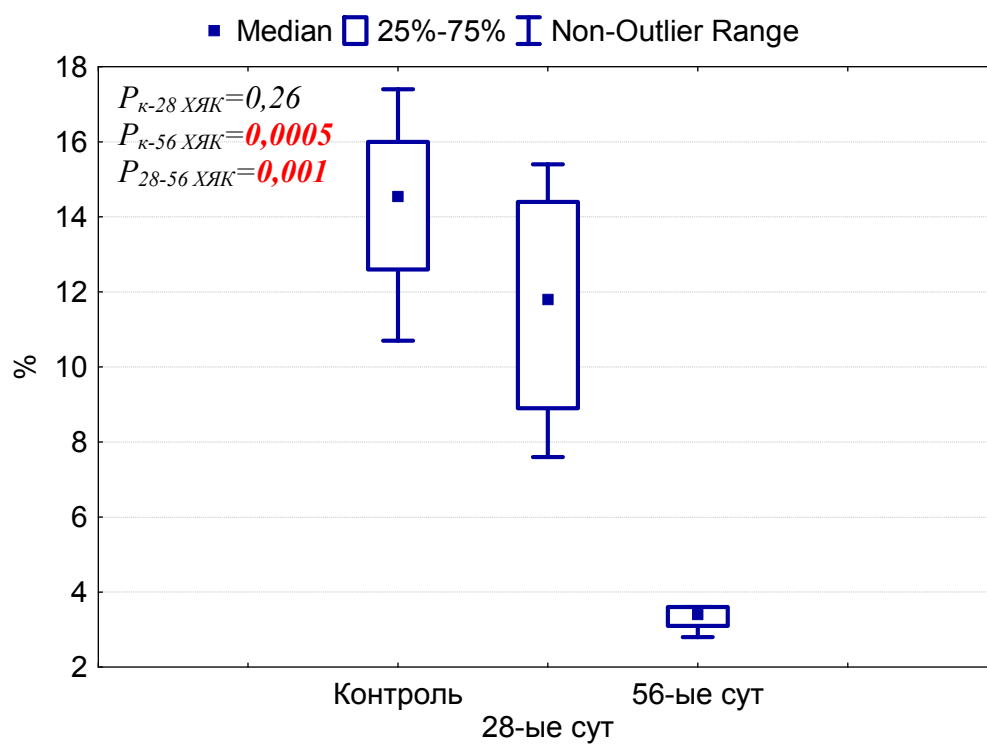


Рис. 80. Относительное содержание F4/80⁺ макрофагов в тимусе у животных контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

3.2.5. Морфофункциональная характеристика селезенки

При морфологическом исследовании селезенка у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы имела нормальное строение, реактивных изменений выявлено не было. Белая пульпа селезенки была представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с небольшими герминативными центрами, состоящими из лимфобластов и единичных митотически делящихся клеток и лимфоцитов (рис. 46 А). В красной пульпе определялись равномерно распределенные форменные элементы крови, макрофаги и единичные мегакариоциты.

При морфологическом исследовании в селезенке у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при хроническом язвенном колите на 28-е сутки отношение белой пульпы к красной составляло 1,0:1,5 (табл. 23). Белая пульпа селезенки представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с узкими герминативными центрами (рис. 81 А). В герминативных центрах лимфоидных узелков среди лимфобластов выявлялись единичные митотически делящиеся клетки. По периферии лимфоидных узелков, на границе белой и красной пульпы, маргинальная зона была выражена слабее, чем в контрольной группе. В красной пульпе селезенки обнаруживались равномерно распределенные форменные элементы крови и макрофаги.

При морфологическом исследовании в селезенке у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при хроническом язвенном колите на 56-е сутки отношение белой пульпы к красной составляло 1:1 (табл. 23). Белая пульпа селезенки была представлена ПАЛМ-зоной более выраженной по сравнению с контролем и хроническим язвенным колитом на 28-е сутки, и лимфоидными узелками с узкими герминативными центрами (табл. 23, рис. 81 Б). В герминативных центрах лимфоидных узелков среди лимфобластов выявлялись единичные митотически делящиеся клетки. По периферии лимфоидных узелков, на границе белой и красной пульпы, маргинальная

зона была выражена слабее, чем в контрольной группе. В красной пульпе селезенки обнаруживались равномерно распределенные форменные элементы крови и макрофаги.

По данным морфометрического исследования хронический язвенный колит на 28-е и 56-е сутки отличались от контрольной группы по показателям объемной плотности белой и красной пульпы (табл. 23). При хроническом колите на 28-е и 56-е сутки по сравнению с контролем показатель объемной плотности ПАЛМ-зоны селезенки был статистически значимо выше в 2,0 и 4,3 раза соответственно (табл. 23, рис. 82).

Таким образом, у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при хроническом колите в селезенке по данным морфометрического анализа выявляется гиперплазия Т-зависимой ПАЛМ-зоны, более выраженная в поздние сроки развития хронического язвенного колита.

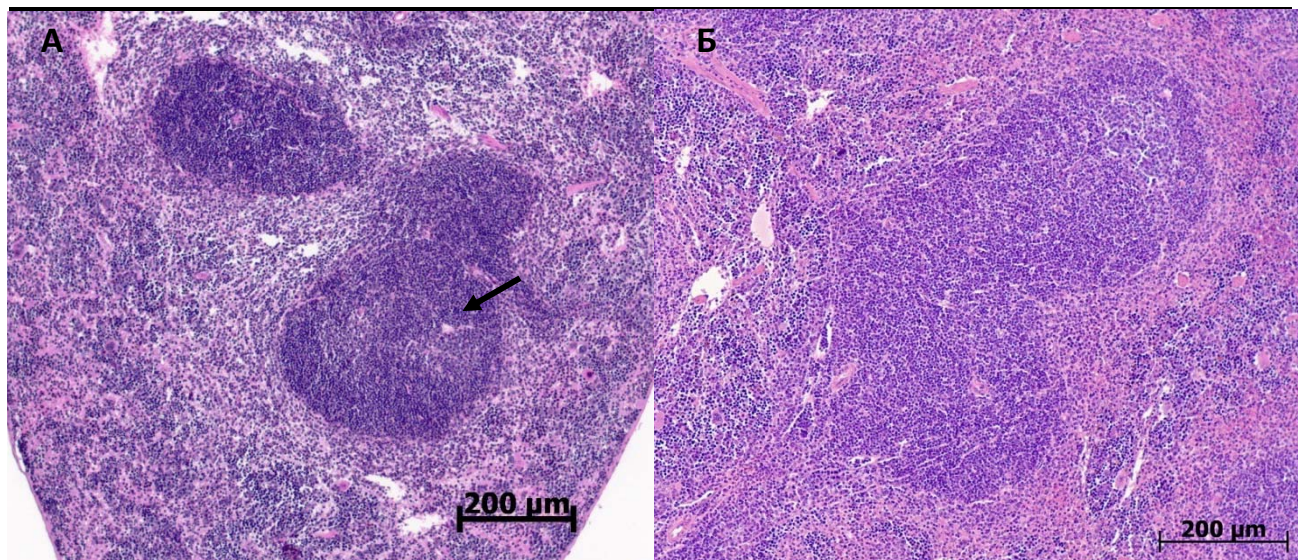


Рис. 81. Морфологическая характеристика селезенки у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 в разные сроки хронического язвенного колита. А – хронический язвенный колит 28-е сутки. Белая пульпа селезенки представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками с герминативными центрами. По периферии лимфоидных узелков хорошо выражена маргинальная зона (черная стрелка); **Б – хронический язвенный колит 56-е сутки.** Белая пульпа селезенки представлена слабо выраженной ПАЛМ-зоной и лимфоидными узелками. По периферии лимфоидных узелков слабо выражена маргинальная зона. Окраска гематоксилином и эозином

Таблица 23

Морфометрические показатели структурно-функциональных зон селезенки у половозрелых самцов мышей С57Вl/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита (Ме (25%-75%))

Показатели		Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
			28-е сутки	56-е сутки	
Объемная доля, %	ПАЛМ-зона	2.0 (1.0; 2.0)	4,0 (3,0; 5,0)	8,6 (5,0; 11,0)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.02$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0.00001$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.01$
	лимфоидные узелки	49.0 (30.0; 53.0)	36,0 (21,0; 45,0)	41,4 (31,0; 50,0)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.1$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=1.0$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.4$
	белая пульпа	49.0 (31.0; 55.0)	39,0 (26,0; 47,0)	50,0 (41,0; 65,0)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.3$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=1.0$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.05$
	красная пульпа	51.0 (45.0; 69.0)	61,0 (53,0; 74,0)	50,0 (35,0; 59,0)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.2$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=1.0$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.04$
Индекс отношения объемной плотности белой пульпы к красной, усл. ед.		0,96 (0,45; 1,22)	0,63 (0,35; 0,88)	1,15 (0,69; 1,86)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0.28$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=1.0$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0.05$

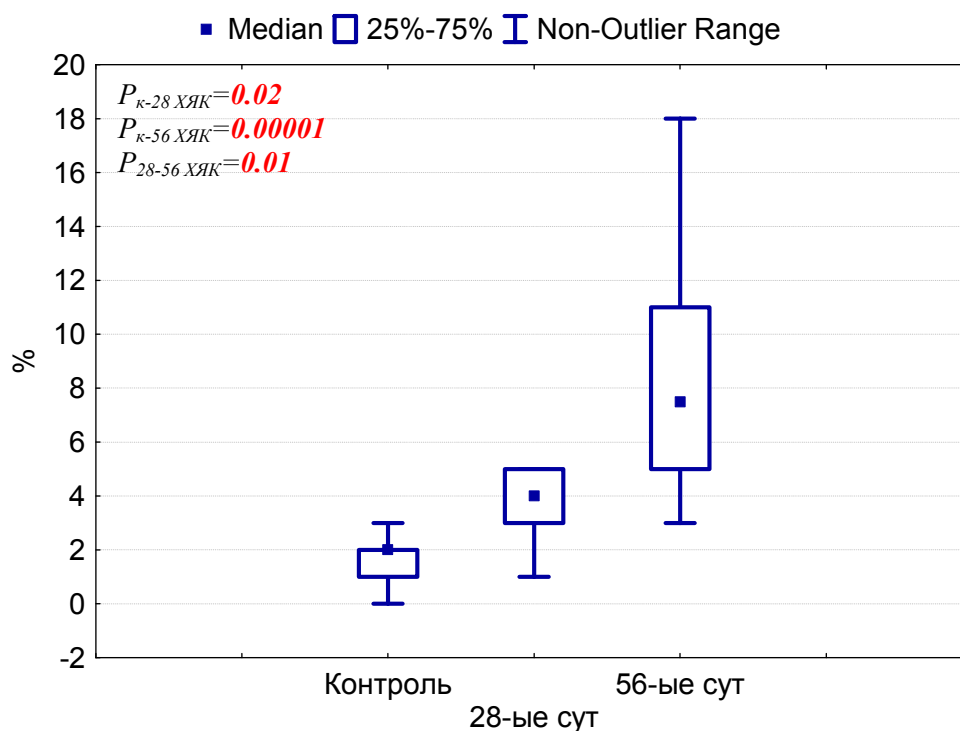


Рис.82. Объемная плотность ПАЛМ-зоны селезенки у половозрелых самцов мышей С57Вl/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

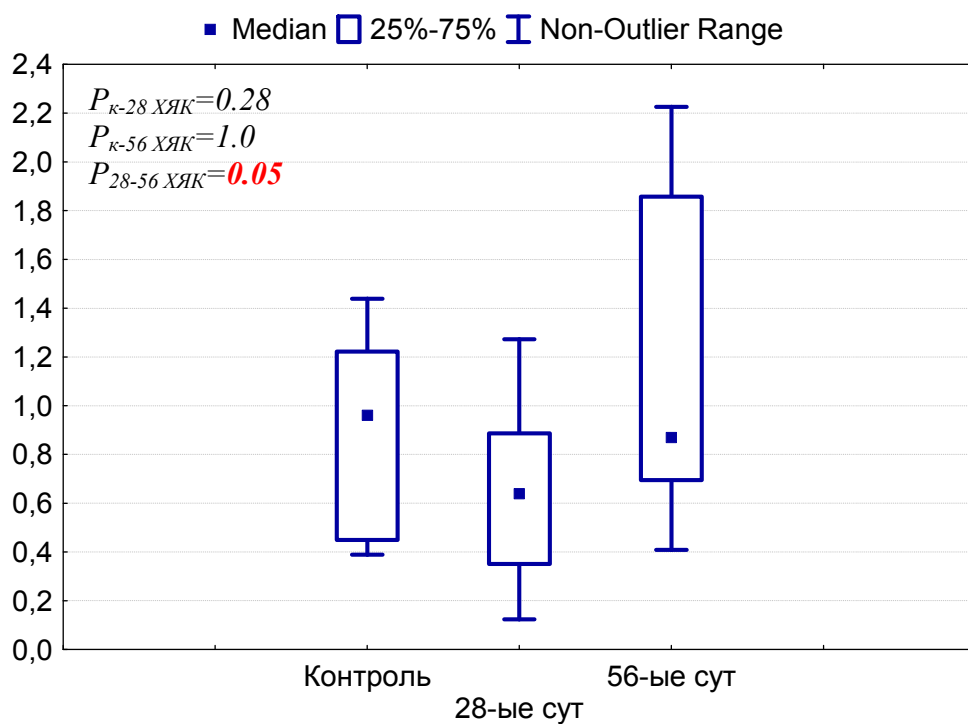


Рис.83. Индекс отношения объемной плотности белой пульпы селезенки к красной у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита

3.2.6. Морфофункциональная характеристика брыжеечных лимфатических узлов

Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов

При морфологическом исследовании брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 контрольной группы реактивные изменения не выявлены.

При морфологическом исследовании брыжеечных лимфатических узлов половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим колитом на 28-е и 56-е сутки выявлено, что наружная кора и паракортикальная зона расширены, плотно заселены лимфоцитами (рис. 84 А, 85 А). В мозговом слое большое количество макрофагов, лимфоцитов, ретикулярных клеток (рис. 84 В, 85 В). При хроническом язвенном колите на 56-е сутки в мозговых тяжах определялось большое количество плазмоцитов. Краевой и мозговые синусы расширены, количество клеточных элементов в них увеличено, и они представлены лимфоцитами и макрофагами с преобладанием последних. В оба срока хронического язвенного колита при окраске по методу Ниссля в краевом и мозговых синусах брыжеечных лимфатических узлов выявлялись метахроматически окрашенные гранулы декстрансульфата натрия (рис. 84 Г, 85 Г).

Таким образом, у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при хроническом язвенном колите в оба срока его развития по данным морфологического анализа выявляется гиперплазия В и Т зон, выраженная макрофагальная реакция в синусах. В поздний срок развития хронического язвенного колита в мозговых тяжах выявляется большое количество плазмоцитов.

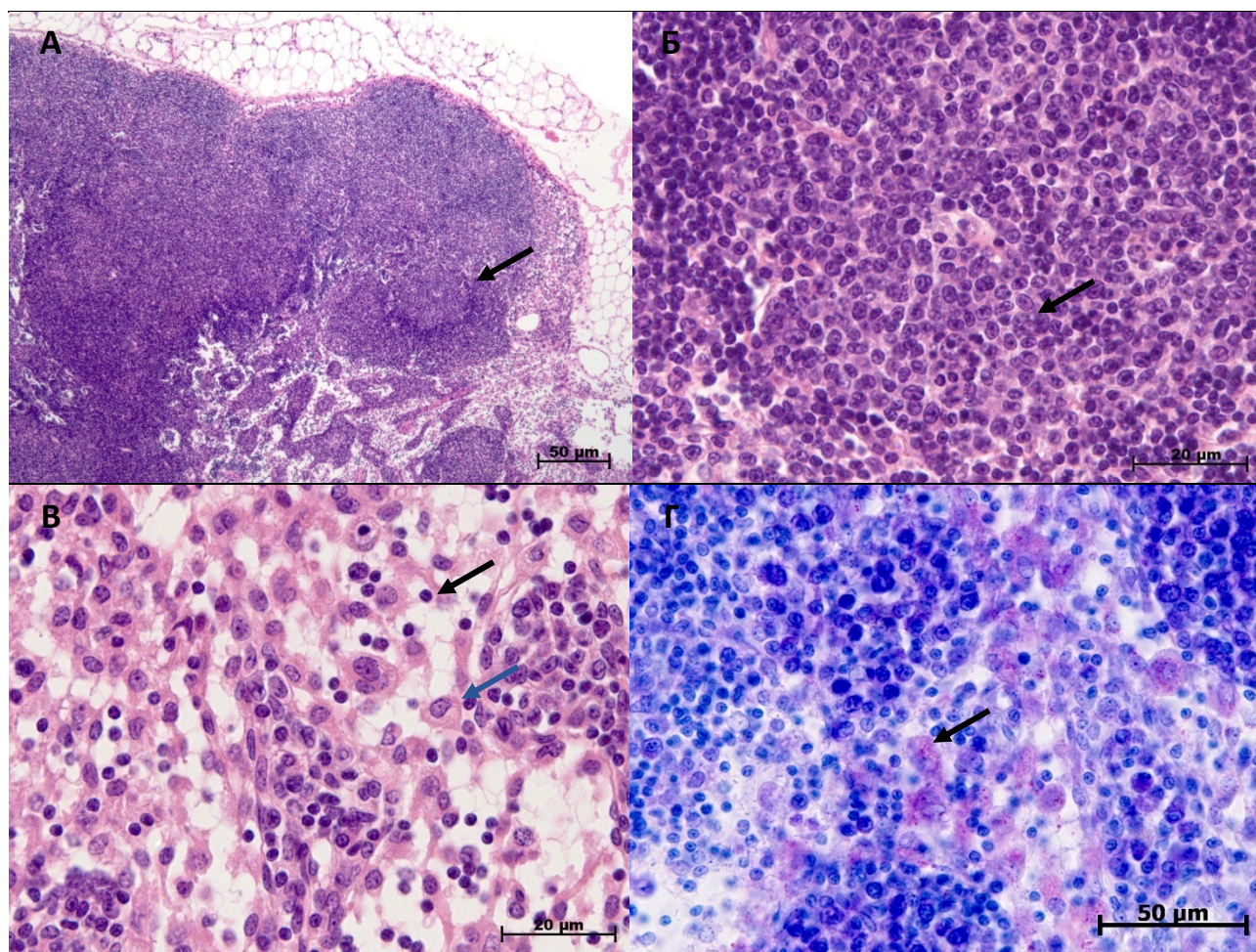


Рис. 84. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 28-е сутки эксперимента. А – гиперплазия коркового слоя, лимфоидные узелки с широкими светлыми центрами (черная стрелка); Б– широкий светлый центр лимфоидного узелка с лимфобластами (черная стрелка); В– в просветах мозговых синусов количество клеток резко увеличено, выявляются лимфоциты (черная стрелка) и макрофаги (синяя стрелка), макрофаги преобладают. Г – в мозговых синусах макрофаги, содержащие метакроматически окрашенные гранулы декстрансульфата натрия (черная стрелка). Окрашка гематоксилином и эозином (А-В); окраска по методу Ниссля (Г)

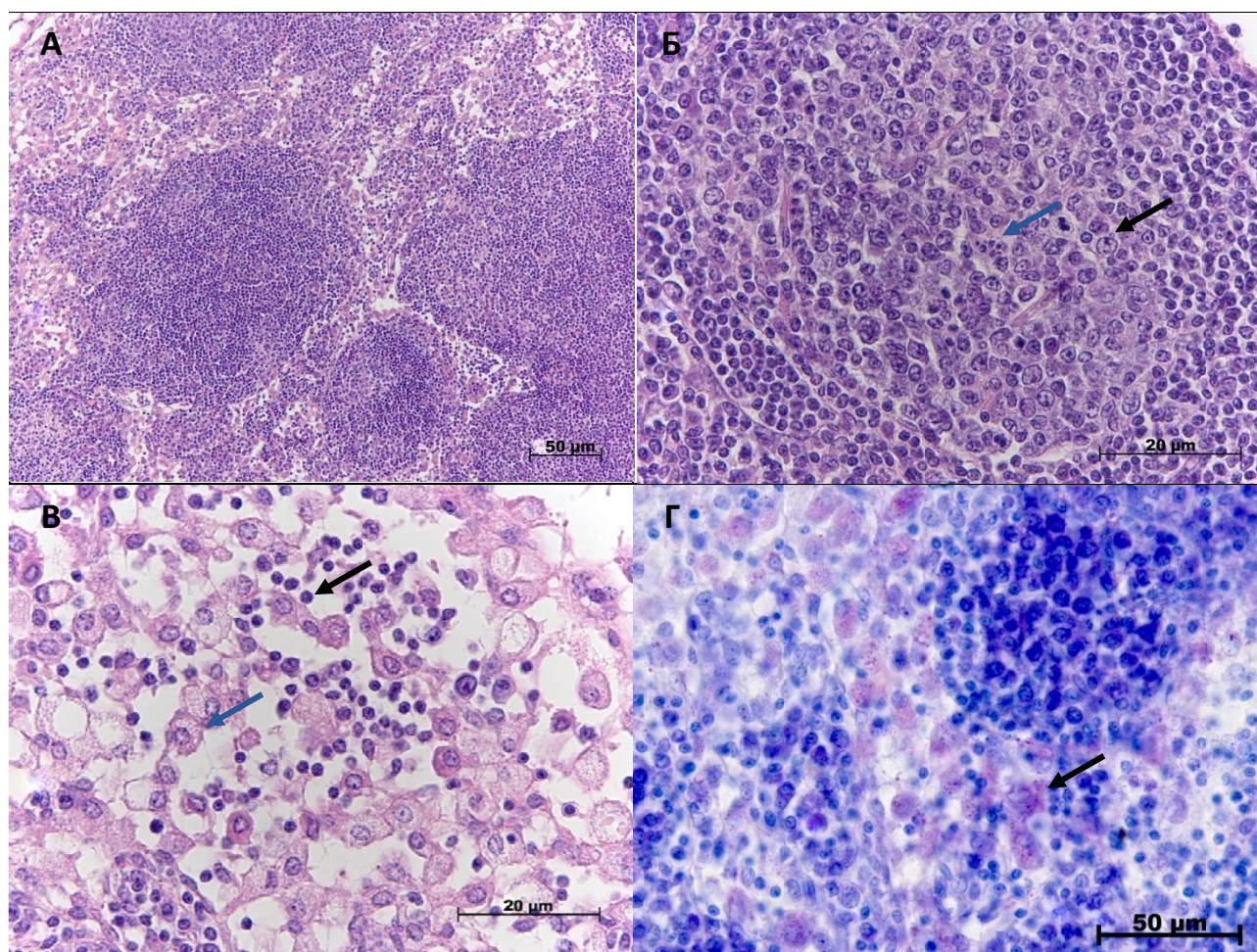


Рис. 85. Морфологическая характеристика брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с хроническим язвенным колитом на 56-е сутки эксперимента. А – гиперплазия коркового слоя; Б– светлый центр лимфоидного узелка с лимфобластами (черная стрелка), определяются многочисленные гибнущие клетки (синяя стрелка); В– в просветах мозговых синусов количество клеток увеличено, выявляются лимфоциты (черная стрелка) и «пенистые» макрофаги (синяя стрелка), макрофаги преобладают; Г – в мозговых синусах макрофаги, содержащие метахроматически окрашенные гранулы декстрансульфата натрия (черная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином (А-В); окраска по методу Ниссля (Г)

Субпопуляционный состав лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах

По данным проточной цитофлуориметрии при хроническом язвенном колите на 28-е сутки показатели субпопуляционного состава лимфоцитов не отличались от контрольной группы (табл. 24).

По сравнению с контролем при хроническом язвенном колите на 56-е сутки в брыжеечных лимфатических узлах уменьшалось относительное содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов и повышалось абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-, $CD3^+CD19^+$ В- и $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 24, рис. 86-89).

При хроническом язвенном колите на 56-е сутки по сравнению с 28-и сутками в брыжеечных лимфатических узлах ниже относительное содержание $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, выше относительное и абсолютное число $CD3^+CD19^+$ В-лимфоцитов, а также количество $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторных Т-лимфоцитов (табл. 24, рис. 86, 88, 89).

Таблица 24

Субпопуляционный состав лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей С57Вl/6 контрольной группы и в разные сроки хронического язвенного колита (Ме (25%-75%))

Показатели \ Группы		Контрольная	Хронический язвенный колит 1% ДСН		P
			28-е сутки	56-е сутки	
Лимфоциты	10 ⁶ /мл	19,44 (15,61; 20,48)	17,17 (14,2; 23,9)	32,53 (23,03; 42,17)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,36$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,22$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,1$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ Т-хелперы	% от лф*	34.20 (29.0; 37.60)	34,8 (32,8; 35,7)	21,0 (18,0; 25,8)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,75$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,03$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,01$
	10 ⁶ /мл	5.33 (4.52; 5.86)	5,8 (5,1; 8,1)	7,5 (4,1; 11,3)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,54$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,42$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,06$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ цитотоксические Т-лимфоциты	% от лф	25.37 (21.70; 26.40)	27.45 (25.7; 28,5)	23,9 (23,8; 27,1)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,32$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,89$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,61$
	10 ⁶ /мл	3.96 (3.38; 4.12)	4,52 (4,2; 6,3)	8,5 (5,4; 12,4)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,35$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,01$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,41$
CD3 ⁺ CD19 ⁺ В-лимфоциты	% от лф	36.46 (36.10; 37.10)	32,9 (31,3; 35,7)	40,2 (38,6; 52,6)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,62$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,21$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,007$
	10 ⁶ /мл	5.69 (5.63; 5.79)	5.98 (4.4; 7.4)	16,3 (12,6; 17,1)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,89$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,007$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,05$
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ регуляторные Т-лимфоциты	% от Тх [#]	5.40 (5.40; 5.52)	5,82 (1,8; 6,1)	14,7 (13,8; 14,9)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,76$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,06$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,17$
	10 ³ /мл	267.46 (146.8; 316.9)	319,7 (146,2; 504,6)	1120,9 (580,5; 1660,7)	$P_{к-28 \text{ ХЯК}}=0,89$ $P_{к-56 \text{ ХЯК}}=0,04$ $P_{28-56 \text{ ХЯК}}=0,08$

Условные обозначения: * Лф – лимфоциты; [#]Тх – Т-хелперы

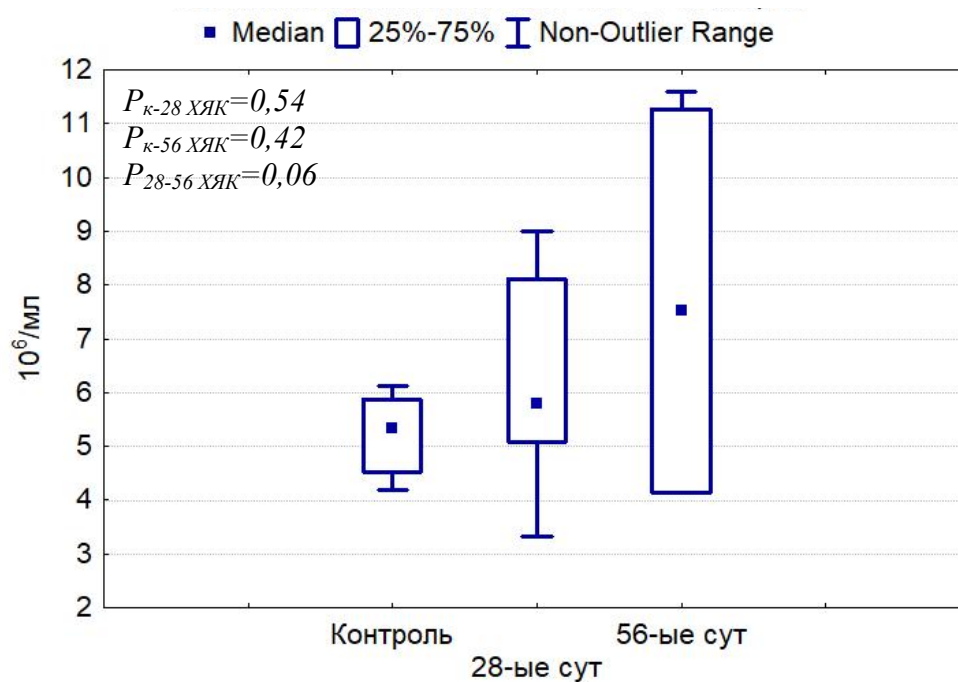


Рис. 86. Абсолютное количество $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

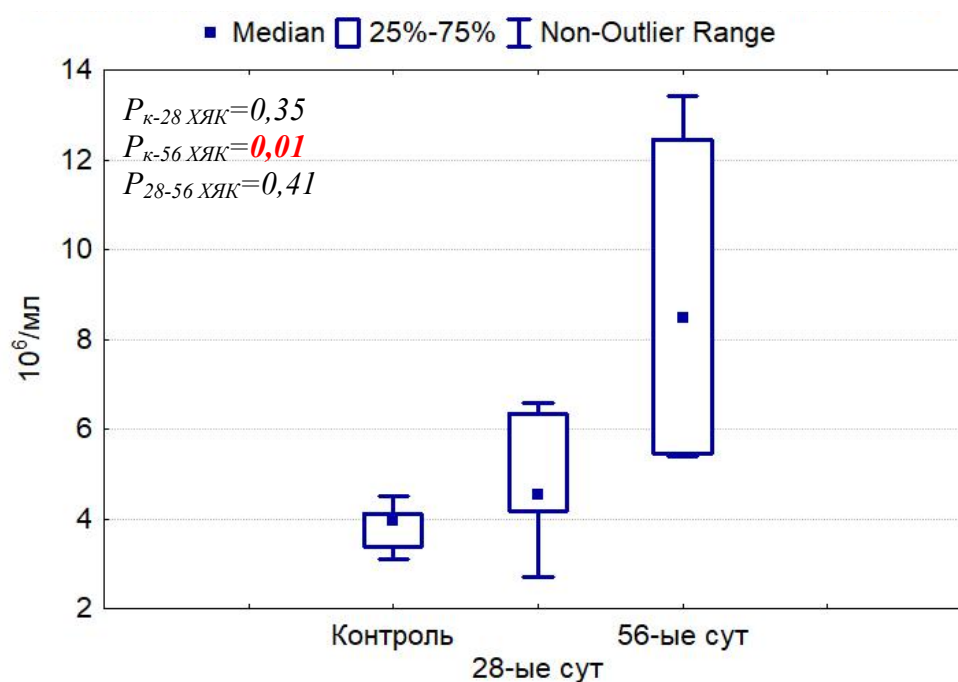


Рис. 87. Абсолютное количество $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

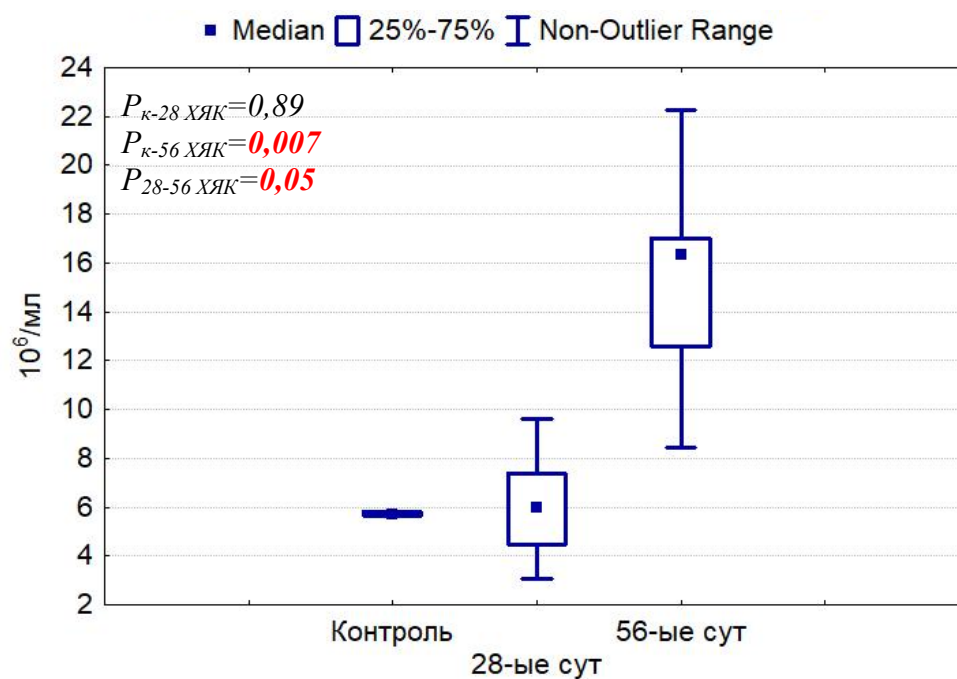


Рис. 88. Абсолютное количество $\text{CD3}^+\text{CD19}^+$ В-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

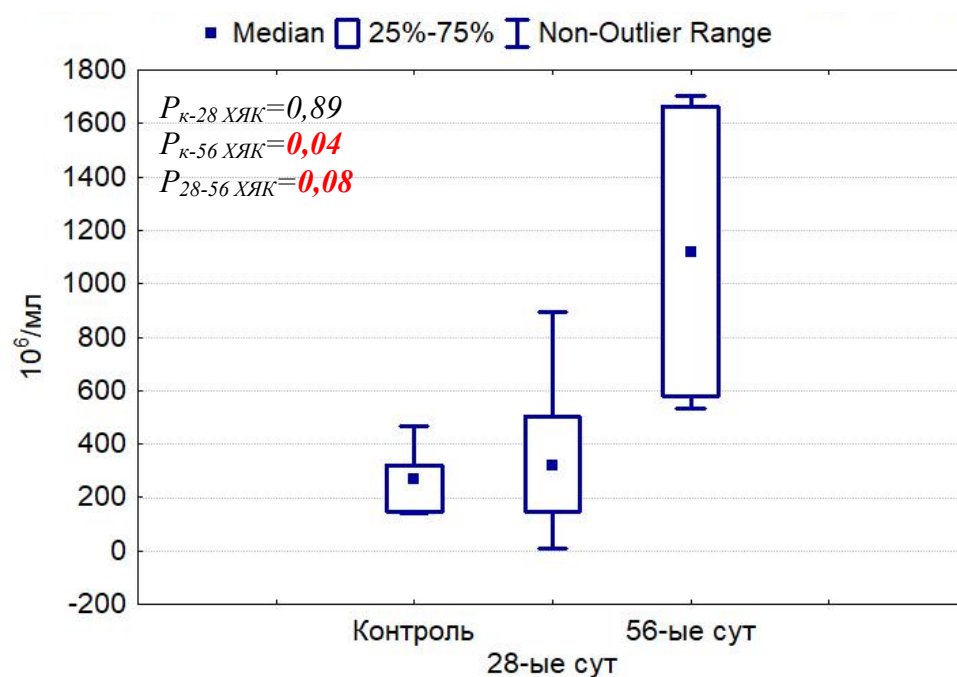


Рис. 89. Абсолютное количество $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ регуляторных Т-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у животных контрольной группы и в разные сроки развития хронического язвенного колита

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Работа посвящена изучению изменений морфофункционального состояния органов иммунной системы при разной тяжести острого и в разные сроки хронического язвенного колита у половозрелых самцов мышей C57Bl/6.

Острый язвенный колит моделировали по I. Okayasu (1990), хронический язвенный колит по S. Melgar (2005) в модификации, путем перорального введения декстрансульфата натрия мышам линии C57Bl/6.

На модели острого катарально-язвенного колита, индуцированного 1% раствором ДСН, нами изучены морфофункциональные изменения органов иммунной системы: тимуса, селезенки, брыжеечных лимфатических узлов и локального компартмента иммунной системы – ободочной кишки.

На 7-е сутки потребления 1% раствора ДСН у половозрелых мышей линии C57Bl/6 развивается острый катарально-язвенный колит с язвенным процессом, который по нашим данным, занимает 11% от длины ободочной кишки, в слизистой оболочке и подслизистой основе выявлена воспалительная инфильтрация лимфоцитами, единичными нейтрофилами и плазмócитами.

По данным литературы при остром катарально-язвенном колите воспалительный процесс в ободочной кишке сочетается с системными проявлениями воспалительного ответа, реактивными изменениями в центральных и периферических органах иммунной системы. Острый язвенный колит ассоциирован с преобладанием Th1 типа иммунного ответа, при котором иммунологические и воспалительные реакции инициируются антигенпрезентирующими дендритными клетками и макрофагами, экспрессирующими рецепторы к IL-12 после их антигенной стимуляции. IL-12, в свою очередь, стимулирует дифференцировку наивных CD4⁺ лимфоцитов в Т-хелперы 1 типа и натуральные киллеры, которые секретируют IFN- γ (Kim J. J., 2012).

Нами выявлено, что у животных с острым катарально-язвенным колитом уровень эндотоксина в сыворотке крови составляет 0,3 EU/мл (в международных единицах активности), что в 4 раза выше, чем у животных контрольной группы. Эндотоксин впервые был описан Р. Пфейффером в 1892 году как термостабильный компонент лизата, входящий в состав клеточной мембраны всех грамотрицательных бактерий (Вышегуров Я.Х. и др, 2006), единственной грамположительной бактерией с липополисахаридом является *Listeria monocytogenes* (Smith B. et al., 2009). Основной причиной развития эндотоксинемии является нарушение эпителиального барьера ободочной кишки, но механизм поступления эндотоксина из кишечника в порталный кровоток изучен недостаточно. Взаимодействуя с TLR4-рецепторами, бактериальный эндотоксин – липополисахарид активирует сигнальный путь, связанный с транскрипционным фактором NF- κ B, в результате каскада реакций изменяется экспрессия генов, запускается синтез медиаторов, ферментов и регуляторных молекул воспаления, таких как провоспалительные цитокины, хемокины, индуцибельные формы NO-синтазы (iNOs), циклооксигеназы. Инициации и прогрессированию воспалительного процесса при эндотоксинемии предшествует окислительный стресс, обусловленный интенсивной генерацией супероксид-радикалов (Lund D. et al., 2007). При снижении эффективности антиоксидантной защиты вероятность оксидативного повреждения увеличивается (Takenouchi Y. et al., 2009).

По нашим данным в периферической крови у половозрелых мышей линии C57Bl/6 при катарально-язвенном колите по сравнению с животными контрольной группы снижается в 1,2 раза абсолютное число лейкоцитов, лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов, CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-, относительное содержание CD3⁺CD19⁺ В-лимфоцитов и в 2,2 раза абсолютное и относительное количество CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов. Периферическая кровь является интегрирующей средой, обеспечивающей функциональную связь между органами кроветворения и

органами иммунной системы (Кузнецов С.Л., Пугачев М.К., 2004). Пониженное количество лимфоцитов в крови – лейкопения, при катарально-язвенном колите связана, по-видимому, с частичной гибелью и усилением миграции лимфоцитов через стенку капилляров в ткани органов иммунной системы и очаг воспаления, где они выполняют свои защитные функции. Снижение количества регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови при остром язвенном колите согласуется с результатами исследованиями (YokoуamaY. et al., 2007). Регуляторные Т-лимфоциты являются ключевой субпопуляцией при развитии такой патологии как язвенный колит, но они играют важную роль и в норме, препятствуя развитию воспаления в слизистой оболочке кишечника, ограничивая развитие Т-клеточного ответа на собственные антигены (Быковская С.Н. и др., 2013).

При остром катарально-язвенном колите в тимусе нами выявлена умеренная акцидентальная инволюция с опустошением и уменьшением объемной доли коркового вещества, гиперплазией тимических телец и увеличением среди них телец с отложениями кератогиалина и появлением кистоподобных полостей. Выявленные при морфологическом и морфометрическом исследовании реактивные изменения тимуса характерны для острой фазы воспалительного процесса, индуцированного липополисахаридом (Диатроптов М.Е. и др., 2011). Однако авторы ограничиваются только морфологическим исследованием, оценка субпопуляционного состава лимфоцитов и нелимфоидных клеток не проводилась. Данные литературы об изменении тимуса при экспериментальном остром язвенном колите описаны в работе S. Sasaki и соавт. (2008), в которой авторы выявили снижение массы тимуса у половозрелых мышей C57Bl/6 на 7-е сутки развития язвенного колита, индуцированного декстарансульфатом натрия.

При умеренной акцидентальной инволюции в нашей работе при морфологическом исследовании обнаружена гибель тимоцитов коркового вещества и так называемая картина «звездного неба» – «halo», в которых

определяются фрагменты ядер и макрофаги, по данным проточной цитофлуориметрии выявлено увеличение по сравнению с животными контрольной группы в 1,2 раза содержания Аннексин V⁺ PI⁺ гибнущих по механизму апоптоза клеток тимуса.

В процессе апоптоза фосфатидилсерин, который в норме является компонентом внутреннего слоя плазматической мембраны, появляется на её наружной стороне. В присутствии ионов кальция аннексин V селективно, с высокой аффинностью связывается с фосфатидилсерином, имея при этом очень низкую аффинность к таким фракциям фосфолипидов, как фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и фосфатидилхолин. Такой профиль связывания позволяет использовать аннексин V в качестве высокоспецифичного агента для определения апоптических клеток.

При акцидентальной инволюции тимуса, развивающейся как стереотипная стресс-реакция, гибель Т-лимфоцитов, особенно в корковом веществе, подтверждена большим числом исследователей, кроме этого, авторы наблюдают фагоцитоз макрофагами неизмененных клеток. Биологический смысл лимфоцитолита окончательно не установлен, но, по-видимому, он отражает нарушение процессов селекции Т-лимфоцитов (Диатроптов М.Е. и др., 2011, Косырева А.М., 2016).

Нами впервые исследован субпопуляционный состав лимфоцитов тимуса при его умеренной акцидентальной инволюции. По данным проточной цитофлуориметрии в тимусе снижается в 4 раза общее число лимфоцитов, абсолютное количество CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов, CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т- и CD4⁺CD8⁺ незрелых дубль позитивных лимфоцитов, и минорной популяции тимуса – CD3⁺CD19⁺ В-лимфоцитов.

Снижение числа незрелых дубль позитивных лимфоцитов отражает процессы замедления миграции незрелых тимоцитов из костного мозга и нарушения дифференцировки Т-лимфоцитов. Тимус является органом, в котором осуществляется дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов,

интенсивность этих процессов не зависит ни от количества антигенов, ни от числа лимфоцитов в периферической крови. Кортикальное и мозговое вещество тимуса относительно автономны. Незрелые клетки мигрируют из наружной во внутреннюю часть коркового вещества, а прошедшие дифференцировку тимоциты покидают тимус из внутренней части коркового вещества, минуя мозговое.

Выявленное нами уменьшение числа Т-хелперов, цитотоксических Т- и регуляторных Т-лимфоцитов, по-видимому, связано с усилением процессов апоптоза, показанным нами ранее, нарушением процессов дифференцировки из костномозговых предшественников, торможением дифференцировки из-за уменьшения количества незрелых дубль позитивных лимфоцитов, описанное нами выше, а также усилением их миграции в очаг воспаления (Макарова О.В. и др., 2009). По данным литературы, Т-лимфоциты мозгового вещества являются рециркулирующими, и они поступают из других лимфоидных органов. Из тимуса такие лимфоциты мигрируют через стенки посткапиллярных венул с высоким эндотелием, которые располагаются в мозговом веществе (Хэм А., Кормак Д., 1983).

В мозговом веществе тимуса в норме всегда присутствует некоторое количество В-лимфоцитов, которые мигрируют из крови. Полученные нами данные о снижении абсолютного числа В-лимфоцитов в тимусе, очевидно, отражают уменьшение содержания этой субпопуляции лимфоцитов в периферической крови.

Наряду с оценкой субпопуляционного состава лимфоцитов тимуса при его умеренной акцидентальной инволюции, нами впервые был проведен комплексный анализ его нелимфоидных клеток: морфометрическое исследование разных типов тимических телец, иммуногистохимическая оценка количества и площади тимических телец, состоящих из цитокератин 19 положительных эпителиальных клеток, а также с помощью проточной цитофлуориметрии анализ субпопуляций эпителиальных клеток мозгового и коркового вещества, дендритных клеток и макрофагов.

По данным комплексного морфометрического исследования, на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином и антителами к цитокератину-19, в мозговом веществе тимуса при умеренной акцидентальной инволюции увеличивается количество и площадь тимических телец. Среди них преобладают тельца из 3-7 эпителиальных клеток, появляются тельца в виде кистоподобных полостей.

По данным литературы прошлых лет, тимические тельца представляют терминальный этап дифференцировки эпителиальных клеток тимуса (Зайратьянц О.В., 1998). Сейчас считается, что их количество и размеры служат показателем секреторной активности (Matsui N. et al., 2014). Тимические тельца играют ключевую роль в позитивной селекции, опосредованной дендритными клетками, что в первую очередь необходимо для развития регуляторных Т-лимфоцитов тимуса (Berthelot J.M. et al, 2010).

По данным проточной цитофлуориметрии баланс эпителиальных клеток мозгового и коркового вещества, $CD326^{+}UEA^{+}CD205^{-}$ и $CD326^{+}UEA^{-}CD205^{+}$ соответственно, не изменяется по сравнению с животными контрольной группы.

Эпителиальные клетки тимуса, в том числе тимических телец, синтезируют тимозин, тимопоэтин I и II, тимостимулин, сывороточный тимический фактор, тимусный гуморальный фактор. Различные фракции гормонов оказывают всестороннее дистантное действие на иммунологические процессы, такие как миграция стволовых клеток костного мозга в тимус, дифференцировка и созревание лимфоцитов, влияние на хелперную, супрессорную, цитотоксическую активность Т-клеток (Зайратьянц О.В., 1998).

При умеренной акцидентальной инволюции по сравнению с контролем нами показано увеличение в 3 раза доли тимических телец с отложениями кератогиалина. Появление фибрилл кератина в кератиноцитах тимических телец связано с преобразованием гибнущих эпителиальных клеток в, так называемые, «чешуи». Кератинизация может быть снижена, но не

блокирована ингибиторами трансклутаминазы или каспазы-14 (Galluzzi et al., 2012).

Среди нелимфоидных клеток тимуса при умеренной акцидентальной инволюции нами выявлено снижение содержания $CD45^+CD4^-CD8^-CD11c^+$ дендритных клеток, что может быть следствием их усиленной миграции в периферические органы иммунной системы и очаг воспаления или гибелью, наряду с Т-лимфоцитами коркового и мозгового вещества тимуса.

Дендритные клетки мозгового вещества тимуса несут на своей поверхности собственные антигенные пептиды организма в составе белков главного комплекса гистосовместимости и осуществляют процесс отрицательной селекции созревающих Т-лимфоцитов и, тем самым, участвуют в регуляции центральной ауто толерантности (Kroger C.J. et al., 2017) Снижение их содержания также может влиять на нарушение дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе.

При катарально-язвенном колите у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 в сочетании с оценкой уровня эндотоксина в сыворотке крови, анализом субпопуляций лимфоцитов периферической крови, комплексного изучения центрального органа иммунной системы – тимуса, нами было проведено исследование периферических органов иммунной системы, таких как селезенка и брыжеечные лимфатические узлы, а также анализ субпопуляционного состава лимфоцитов в локальном компартменте иммунной системы – ободочной кишке и брыжеечных лимфатических узлах.

По данным морфологического исследования в селезенке при катарально-язвенном колите реактивных изменений не выявлено. У мышей селезенка в норме в постнатальном периоде является как органом иммунной системы, так и кроветворным органом, в котором образуются клетки лимфоидного, эритроидного и гранулоцитарного рядов, а так выявляются мегакариоциты. Отсутствие выраженных изменений в строении функциональных зон селезенки, по-видимому, связано с тем, что через нее

проходит вся циркулирующая кровь и концентрация в ней антигенов из очага воспаления относительно низкая.

Из-за небольшого размера брыжеечных лимфатических узлов невозможно провести полную качественную, а также морфометрическую оценку их функциональных Т-и В-зон. По данным морфологического исследования в брыжеечных лимфатических узлах при остром катарально-язвенном колите выявлена гиперплазия коркового вещества и выраженная макрофагальная реакция в синусах.

По данным литературы выраженная реакция лимфатических узлов, располагающихся вблизи очага воспаления, обусловлена антигенами, прямо попадающими в них через лимфу. Гиперплазия В-зон и увеличение количества клеточных элементов в синусах характерны для острого воспалительного процесса (Weiss L.M., O'Malley D., 2013).

В макрофагах синусов брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с острым язвенным колитом обнаружен декстрансульфат натрия, который являясь высокомолекулярным соединением углеводной природы, выступает как активатор макрофагов, дендритных клеток и В-лимфоцитов. Активация указанных клеток полисахаридами, выражается в усилении процессов пролиферации и дифференцировки, а также повышении цитотоксической и фагоцитарной активности, за счет продукции GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), провоспалительных цитокинов $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN}\beta 2$ и экспрессии молекул адгезии CD11c, CD18, CD14, CD54 (KimJ.Y. et al., 2007).

По данным проточной цитофлуориметрии при катарально-язвенном колите в брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с контролем уменьшается количество лейкоцитов, лимфоцитов, $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ Т-хелперов, $\text{CD3}^-\text{CD19}^+$ В-лимфоцитов, возрастает число $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов. Наши данные об изменении субпопуляционного состава лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах у мышей с острым

язвенным колитом по сравнению с контрольной группой согласуются с результатами A.Nakansson и соавт. (2013).

В локальном компартменте иммунной системы в ободочной кишке по данным проточной цитофлуориметрии среди исследованных субпопуляций лимфоцитов и макрофагов нами выявлено повышение в 4,5 раз содержания регуляторных Т-лимфоцитов. Это согласуется с результатами клинических работ, проведенных на биопсийном материале, полученном у больных язвенным колитом. По литературным данным при воспалительных заболеваниях кишечника в толстой кишке отмечается повышение содержания регуляторных Т-лимфоцитов в собственной пластинке слизистой оболочки, что рассматривается авторами как один из дополнительных критериев диагностики язвенного колита (Holmén N. et al., 2006; Тертычный А.С. и др., 2010; Wang Y. et al., 2011).

На настоящий момент известны две субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов, естественные, они дифференцируются в тимусе под действием TSLP, и индуцированные, которые дифференцируются в периферических компартментах иммунной системы, таких как брыжеечные лимфатические узлы и ободочная кишка под действием TGFb (Shen Z. et al., 2018) По данным литературы, в кишечнике регуляторные Т-лимфоциты в норме ограничивают развитие Т-клеточного ответа на аутоантигены (Быковская С.Н. и др., 2013), кроме того, эта субпопуляция лимфоцитов участвует в контроле воспалительных процессов в толстой кишке (Hori S. et. al., 2003). В патогенезе язвенного колита важная роль принадлежит $CD4^+CD25^+$ регуляторным Т-лимфоцитам, которые оказывают цитокин-независимое супрессорное действие, подавляя пролиферацию эффекторных Т-лимфоцитов (DiPaolo R.J. et al., 2005; Yu T.Q. et al., 2007).

Выявленные при остром катарально-язвенном колите морфофункциональные изменения в органах иммунной системы можно трактовать с позиции транзиторного вторичного иммунодефицита, который развивается на фоне острых воспалительных и инфекционных заболеваний

(Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Новиков Д.К. и соавт., 2011; Justiz Vaillant A.A., Qurie A., 2018). По данным литературы, для транзиторного вторичного иммунодефицита характерно снижение содержания в периферической крови субпопуляций Т-лимфоцитов, включая Т-хелперы, гипертрофия функциональных зон лимфатических узлов (Понякина Н.Д., Лебедев К.А., 2003), что и выявлено нами у половозрелых самцов мышей С57В1/6.

В отличие от других исследователей нами охарактеризованы не только субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и морфологические изменения лимфатических узлов, но и оценен субпопуляционный состав лимфоцитов и нелимфоидных клеток тимуса, субпопуляционный состав лимфоцитов лимфатических узлов и очага воспаления – ободочной кишки, это позволило более полно охарактеризовать морфофункциональные изменения при транзитном вторичном иммунодефиците.

Таким образом, транзиторный вторичный иммунодефицит характеризуется: *в периферической крови* снижением количества всех субпопуляций Т-лимфоцитов; умеренной острой акцидентальной инволюцией *тимуса*, гибелью лимфоцитов, гиперплазией и инволюцией тимических телец; гиперплазией *брыжеечных лимфатических узлов*, со снижением содержания в них Т-хелперов и В-лимфоцитов; повышением содержания регуляторных Т- и В-лимфоцитов *в ободочной кишке*.

Оценка морфофункциональных изменений центральных и периферических органов иммунной системы, а также её локального компартмента – ободочной кишки, при тяжелом течении воспалительного процесса проведена на модели острого фибринозно-язвенного колита, индуцированного 5% раствором ДСН.

Острый фибринозно-язвенный колит у половозрелых мышей линии С57В1/6 характеризуется обширным язвенным процессом, который по нашим данным занимает 65% от длины ободочной кишки, на поверхности язв и в сосудах слизистой оболочки ободочной кишки определяются

очаговые отложения масс фибрина и скопления лейкоцитов, выраженная воспалительная инфильтрация слизистой оболочки ободочной кишки и ее подслизистой основы.

Инициальные механизмы развития воспалительного процесса при фибринозно-язвенном колите, индуцированном 5% ДСН, связаны с действием декстрана и ассоциированных с ним молекул, в результате чего происходит изменение физико-химических свойств слизи, адгезия просветной микрофлоры к эпителиальной выстилке (Smith P. et al., 2012), структурные нарушения мембранных белков плотных контактов: окклюдина и клаудинов 1, 3, 4, 5 (Perse M. et al., 2012). На 3-4 сутки потребления ДСН нарушается баланс процессов пролиферации и гибели эпителиальных клеток (Mennigen R. et al., 2009), что приводит к изъязвлению слизистой оболочки, повышению проницаемости эпителиального барьера и способствует проникновению ДСН в слизистую оболочку ободочной кишки, где он фагоцитируется макрофагами (Kawada M. et al., 2007; Laroui H. et al., 2012).

Нами показано, что при развитии фибринозно-язвенного колита уровень эндотоксина в сыворотке крови составляет 0,8 EU/мл, что в 10 раз выше, чем у животных контрольной группы и в 2,5 раза по сравнению с животными с катарально-язвенным колитом.

Ведущей причиной развития эндотоксинемии является массивное поступление в системный кровоток бактериальных эндотоксинов (Сахно Л. А. и соавт., 2009), источниками которых могут быть сапрофитные и патогенные аэробные и анаэробные грамотрицательные микроорганизмы кишечника, а также их массовая гибель на фоне нарушения целостности кишечника (Салахов И. М. и соавт., 1998). При остром фибринозно-язвенном колите вследствие нарушения эпителиального барьера происходит транслокация микроорганизмов в слизистую оболочку ободочной кишки, и в ней развивается острый инфекционно-воспалительный процесс с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией, альтеративными эрозивно-язвенными изменениями (Абдулаева С. О. и соавт., 2013; Smith P. et al., 2012).

Воспалительные изменения, развивающиеся в ободочной кишке при фибринозно-язвенном колите сочетаются с системными проявлениями воспаления и активацией механизмов врожденного и приобретенного иммунитета. По данным литературы у мышей линии C57Bl/6 с тяжелым ДСН индуцированным колитом выявляется повышение уровня воспалительных маркеров – белка амилоида А сывороточного, провоспалительных TNF- α , IL-1b, INF-g, IL-16 и противовоспалительных цитокинов – TGFb, IL-10 (Kawada M. et al., 2007). Оценка нарушений иммунологических реакций и системных проявлений воспалительного процесса может проводиться не только по продукции цитокинов, но и по субпопуляционному составу лимфоцитов периферической крови.

По нашим данным в периферической крови у половозрелых мышей линии C57Bl/6 при фибринозно-язвенном колите по сравнению с животными контрольной группы снижается: в 2 раза абсолютное число лейкоцитов, в 2,3 раза лимфоцитов, в 1,7 раза CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов, в 1,2 раза цитотоксических Т-, в 2,6 раз В- и регуляторных Т-лимфоцитов, и повышается в 2,5 раза относительное содержание регуляторных Т-лимфоцитов.

Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при фибринозно-язвенном колите также обусловлены сочетанием таких процессов, как пролиферация лимфоцитов в органах иммунной системы, гибель и миграция в очаг воспаления. По данным литературы, Т-лимфоциты и их субпопуляции регулируют иммунный ответ на чужеродные антигены и контролируют гомеостаз, снижение их количества свидетельствует об иммунологической недостаточности. Количество В-лимфоцитов в периферической крови один из ключевых показателей гомеостаза, поэтому отклонение его величины от нормальной является важным критерием иммунопатологии, а недостаточность В-лимфоцитов в периферической крови ведет к тяжелым иммунодефицитам (Кишкун А.А., 2009). При тяжелых воспалительных и инфекционных заболеваниях, наряду с

общеклиническими изменениями, в периферической крови регистрируют резкое снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, иммунорегуляторного индекса, что свидетельствует о выраженном клеточном иммунодефиците (Дунаевская С.С., 2013). Кроме того, признаком общей иммунодепрессии у больных с тяжелыми гнойно-септическими осложнениями принято считать устойчивую лимфопению, ассоциированную с одновременным уменьшением относительного количества $CD3^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови (Козлов В. К., Винницкий Л. И., 2005).

В механизмах развития тяжелого острого язвенного колита важную роль играют Т-регуляторные и Т-эффекторные лимфоциты. Показано, что регуляторные Т-лимфоциты проявляют супрессорную активность *in vitro*, ингибируя пролиферацию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (Yu T.Q. et al., 2007). Однако, данные по оценке субпопуляций лимфоцитов периферической крови у пациентов с диагностированным язвенным колитом противоречивы и основаны на недостаточно репрезентативных группах пациентов по полу, возрасту и используемым для лечения лекарственными препаратами, а экспериментальные исследования иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови у мышей при ДСН индуцированном язвенном колите не проводились.

Нами впервые проведено комплексное исследование тимуса при тяжелом остром фибринозно-язвенном колите. По данным морфологического исследования выявлена выраженная акцидентальная инволюция, характеризующаяся резким опустошением в 5,7 раз коркового вещества с инверсией слоев, обширной гибелью тимоцитов коркового вещества, мозговое вещество опустошено и представлено, главным образом, эпителиальными клетками. По данным проточной цитофлуориметрии, при выраженной акцидентальной инволюции повышается в 1,8 раз количество $AnnV^+PI^-$ гибнущих клеток. По сравнению с контролем в 9 раз снижается абсолютное количество лимфоцитов, в 6,6 раз $CD3^+CD4^+$ Т-хелперов, в 5 раз $CD3^+CD8^+$ цитотоксических Т-, в 2,7 раз относительное содержание и в 22

раза абсолютное число незрелых $CD4^+CD8^+$ дубль позитивных лимфоцитов, и в 10 раз минорной популяции $CD3^-CD19^+$ В-лимфоцитов.

Развивающаяся в тимусе выраженная акцидентальная инволюция является стереотипным реактивным процессом, который развивается при тяжелых патологических стрессах и воспалительных заболеваниях, и сопровождается снижением количества всех исследуемых нами субпопуляций лимфоцитов за счет их активной миграции и гибели, что в сочетании с данными по периферической крови может свидетельствовать о развитии декомпенсированного вторичного иммунодефицита.

Механизмы гибели лимфоцитов в тимусе при тяжелых инфекционных и воспалительных заболеваниях изучены недостаточно. По данным литературы, апоптотическая гибель лимфоцитов тимуса усиливается при увеличении содержания в сыворотке крови уровня глюкокортикоидов, например, кортикостерона (Savino W., 2006). Известно, что стероидные гормоны оказывают влияние на тимоциты через соответствующие рецепторы, экспрессирующиеся на их поверхности (Herold M.J. et al., 2006). Наиболее чувствительны к действию глюкокортикоидов незрелые дубль позитивные лимфоциты $CD4^+CD8^+$, содержание которых в тимусе по нашим данным снижается в 22 раза. Для таких незрелых тимоцитов показана активация каспаза-зависимого внутриклеточного каскада, приводящая к их апоптозу (Wang D. et al., 2006). В то время как в зрелых Т-лимфоцитах $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ активирован CD28-зависимый внутриклеточный каскад, который подавляет транскрипцию Bcl-X(L) – генов апоптоза, в результате чего дифференцированные тимоциты становятся устойчивыми к воздействию глюкокортикоидов (vandenBrandt J. et al., 2004). Помимо кортикостерон-зависимого апоптоза тимоцитов важную роль в индукции процессов их гибели играют провоспалительные цитокины, такие как TNF- α и IFN- γ , уровень продукции которых при инфекционно-воспалительных заболеваниях увеличивается, в том числе при эндотоксиновом шоке (Маркина А.А., Кондратьева И.А., 2013). Эти данные были подтверждены

исследованиями, в которых авторы показали, что при введении эндотоксина экспериментальным животным и добровольцам, у последних отмечался лихорадка, тахикардия и системные симптомы воспаления, которые совпадали по времени с пиком TNF- α в сыворотке крови (Suffredini A.F. et al., 1995), а в более ранних работах было продемонстрировано, что повышение TNF- α в сыворотке крови коррелирует с гибелью пациентов от граммотрицательного сепсиса (Marano M.A. et al., 1990). В литературе представлены данные о том, что высокий уровень TNF- α может приводить к снижению количества двойных позитивных лимфоцитов даже при инкубации тимоцитов с антагонистами глюкокортикоидов (Pozzesi N. et al., 2014). Кроме того, липополисахариды и энтеротоксин *E. coli* оказывают прямое негативное влияние на клетки тимуса (Tsuji T. et al., 2000). По нашим данным, при тяжелом остром фибринозно-язвенном колите уровень эндотоксина повышается в 10 раз по сравнению с животными контрольной группы. Эндотоксин, является одним из основных лигандов рецепторов TLR4, таким образом осуществляется ответ клеток организма на липополисахарид граммотрицательных бактерий (Конев Ю.В., Лазебник Л.Б., 2011). Механизмы гибели лимфоцитов в тимусе при увеличении уровня эндотоксина связаны с активацией TLR4 на их поверхности, которое приводит к индукции адаптерной молекулы MyD88 (myeloid differentiation factor 88), в результате чего MyD88 взаимодействует с доменом смерти (DD) молекулы IRAK-4, которая фосфорилирует киназу IRAK-1, тем самым активируя TRAF-6 (TNF Associated factor 6). Убиквитинирование TRAF-6 и протеинкиназы TAK-1 (TGF- β activated kinase 1) приводит к активации ядерного фактора транскрипции NF- κ B (Абатуров А.Е., 2012; Лебедева Е.С. и соавтр., 2018; Ruckdeschel K., Pfaffinger G. 2004).

При выраженной акцидентальной инволюции по данным проточной цитофлуориметрии нами впервые показано, повышение в 5,5 раз относительного количества и абсолютного числа CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-лимфоцитов, содержания в 3 раза F4/80⁺ макрофагов, в 10

раз $CD45^+CD4^-CD8^-CD11c^+$ дендритных и в 4,3 раза $CD326^+UEA^+CD205^-$ эпителиальных клеток мозгового вещества. По данным морфологического исследования выявлена гиперплазия тимических телец, в 1,7 раз повышается их площадь и в 4 раза количество тимических телец, состоящих из цитокератин 19 положительных клеток.

По-видимому, увеличение количества регуляторных Т-лимфоцитов в тимусе, в первую очередь обусловлено их устойчивостью к апоптозу, в том числе за счет экспрессии транскрипционного фактора FOXP3 (Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П., 2016). Кроме того, при гиперплазии тимических телец повышается содержание секретируемого ими цитокина TSLP – тимического стромального лимфопоэтина (Быковская С.Н. и др., 2013). TSLP активирует $CD11c^+$ дендритные клетки, которые экспрессируют CD80, CD86 и индуцируют пролиферацию и дифференцировку тимических $CD4^+CD8^-CD25^-$ Т-хелперов в $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ регуляторные Т-лимфоциты. По нашим данным, наряду с увеличением числа регуляторных Т-лимфоцитов, в тимусе выявлена гиперплазия тимических телец и повышение содержания дендритных и эпителиальных клеток мозгового вещества. При иммуногистохимическом исследовании зарубежными авторами показано, что $CD25^+CTLA4^+$ (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) регуляторные Т-лимфоциты мозгового вещества тимуса ассоциированы с активированными и/или зрелыми дендритными клетками и TSLP (Watanabe N. et al, 2005).

Увеличение при выраженной акцидентальной инволюции в тимусе содержания макрофагов, фагоцитирующих гибнущие тимоциты, может быть связано с увеличением числа гибнущих клеток.

При остром фибринозно-язвенном колите у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 в сочетании с оценкой уровня эндотоксина в сыворотке крови, анализом субпопуляций лимфоцитов периферической крови, а также комплексного изучения центрального органа иммунной системы – тимуса, нами впервые было проведено исследование периферических органов иммунной системы, таких как селезенка и брыжеечные лимфатические узлы,

а также анализ субпопуляционного состава лимфоцитов в регионарном и локальном компартментах иммунной системы – брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке.

По нашим данным, в селезенке у животных с тяжелым фибринозно-язвенным колитом выявлено усиление мегакариоцитарной реакции, стерта гистологическая структура за счет резкой в 5,4 раза редукции белой пульпы, со снижением в 9 раз объемной доли лимфоидных узелков. Выявленные нами при морфологическом и морфометрическом исследовании изменения селезенки являются стереотипными, они развиваются в ответ на острые воспалительные и инфекционные процессы разной тяжести характеризуются угнетением иммуногенеза, активацией функций кроветворения (Барта И., 1976; Писарев В.Б. и соавт., 2009; Татарко С.В., 2014).

Селезенка играет важнейшую роль в обеспечении адекватного иммунного ответа, осуществляя антигензависимую дифференцировку В- и Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов в плазмочиты и накопление клеток памяти (Арлашкина О.М. и соавт., 2016). Данные, полученные при гистологическом исследовании селезенки, в сочетании с результатами субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови и тимусе свидетельствует о развитии декомпенсированного вторичного иммунодефицитного состояния при тяжелом остром фибринозно-язвенном колите.

При фибринозно-язвенном колите при морфологическом исследовании в брыжеечных лимфатических узлах выявлены реактивные изменения, гиперплазия В- и Т-зон, увеличение количества плазматических клеток в мозговых тяжей, выраженная макрофагальная реакция в синусах. В макрофагах синусов брыжеечных лимфатических узлов обнаружен декстрансульфат натрия.

Как при остром катарально-язвенном колите, так и при его более тяжелой форме – фибринозно-язвенном, в лимфатических узлах выявлена

гиперплазия В-зон и увеличение количества клеточных элементов в синусах, что характерно для острого воспалительного процесса (Вылков И.Н., 1975; Weiss L.M., O'Malley D., 2013). Гиперплазия Т- и В-зон лимфатических узлов, выявленная нами при морфологическом исследовании, по-видимому, является следствием миграции незрелых клеток из периферической крови и увеличением содержания резидентных клеток с измененным фенотипом, а также дифференцировкой В-лимфоцитов в плазмоциты (Rogler G. et al., 1997).

По данным проточной цитофлуориметрии при фибринозно-язвенном колите в брыжеечных лимфатических узлах по сравнению с контролем снижается в 3 раза количество лейкоцитов и $CD3^{+}CD4^{+}$ Т-хелперов, в 2 раза лимфоцитов и $CD3^{+}CD8^{+}$ цитотоксических Т-лимфоцитов. Абсолютное количество $CD3^{+}CD19^{+}$ В-лимфоцитов не изменяется по сравнению с контролем, в то время как их относительное содержание снижается в 2 раза. Нами выявлено повышение абсолютного числа в 5 раз и относительного содержания в 2 раза $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ регуляторных Т-лимфоцитов.

Уменьшение содержание субпопуляций лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах при остром язвенном колите согласуется с экспериментальными данными, полученными A.Nakansson и соавт. (2015) и T.Q.Yu и соавт. (2007), и является следствием увеличения уровня эндотоксина в сыворотке крови (Chow J.C. et al., 1999), а также повышения содержания в брыжеечных лимфатических узлах регуляторных Т-лимфоцитов, которые, как было уже описано, оказывают ингибирующее действие на эффекторные клетки и снижают пролиферацию $CD4^{+}CD25^{-}$ Т-лимфоцитов (Lord J.D. et al., 2015; Powrie F., 2014). Увеличение содержания регуляторных Т-лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах обусловлено сочетанием нескольких процессов. В первую очередь, миграцией в них натуральных и индуцированных регуляторных Т-лимфоцитов из периферической крови и ободочной кишки (Yu T.Q. et al., 2007), а также усилением дифференцировки натуральных регуляторных Т-

лимфоцитов непосредственно в лимфатических узлах, осуществляемой дендритными клетками, активированными TSLP, продуцируемым эпителиальными клетками мозгового вещества тимуса и эпителием ободочной кишки. Остается открытым вопрос, являются ли индуцированные регуляторные Т-лимфоциты также супрессорами в отношении эффекторных Т-лимфоцитов (Walker M.R. et al., 2003; Allan S.E. et al., 2007). Таким образом, вполне возможно, что наблюдаемые при остром язвенном колите регуляторные Т-лимфоциты являются просто активированными Т-лимфоцитами, лишенными ингибирующей активности (Lord J.D. et al., 2015).

Кроме того, показано, что липополисахарид грамотрицательных бактерий, являющийся основным индуктором воспалительных реакций, усиливает экспрессию TLR на поверхности дендритных клеток, взаимодействующих с микробиотой. Было высказано предположение, что лиганды TLR также способствуют рекрутированию и/или пролиферации регуляторных Т-лимфоцитов (Heimesaat M.M. et al., 2007).

При фибринозно-язвенном колите по данным проточной цитофлуориметрии в суспензии клеток, полученных из ободочной кишки, повышается содержание в 2,8 раза Т-хелперов, в 21 раз В-лимфоцитов, в 40 раз макрофагов, уменьшается в 8 раз количество цитотоксических Т-лимфоцитов. Выявленное нами увеличение содержания эффекторной субпопуляции Т- и В-лимфоцитов в ободочной кишке свидетельствует о выраженных воспалительном процессе в ее стенке, нарушениях эпителиального барьера, антигенной и бактериальной стимуляции из-за распространенного язвенного процесса. Макрофаги ободочной кишки играют важную роль в воспалении слизистой оболочки. Выявленное нами увеличение содержания макрофагов в стенке ободочной кишки при фибринозно-язвенном колите согласуются с данными литературы, и исследованиями экспрессии CD11b и CD11c макрофагами ободочной кишки, в которых показано увеличение этих показателей при язвенном колите (Rogler G. et al., 1997).

По нашим данным, количество регуляторных Т-лимфоцитов в ободочной кишке при фибринозно-язвенном колите не изменяется по сравнению с животными контрольной группы, и оно в 3 раза ниже, чем при катарально-язвенном колите. По данным литературы, регуляторные Т-лимфоциты являются ключевым компонентом иммунной регуляции воспаления в слизистых оболочках (Lord J.D. et al., 2015). Выявленный нами тяжелый острый язвенный колит с распространенным фибринозно-язвенным процессом, тяжелой эндотоксинемией соответствует фульминантному колиту у человека, и сопровождается развитием декомпенсированного вторичного иммунодефицита в сочетании с низким уровнем регуляторных Т-лимфоцитов в ободочной кишке, что возможно свидетельствует о нарушении миграции и дифференцировки регуляторных Т-лимфоцитов. По данным литературы, у людей с мутацией гена FOXP3, развивается тяжелый колит (Bennett C.L. et al., 2001; Wildin R.S. et al., 2001).

Таким образом, нами впервые установлено, что у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 с фибринозно-язвенным колитом, индуцированным 5% ДСН, на фоне тяжелой эндотоксинемии развивается декомпенсированный вторичный иммунодефицит. Декомпенсированный вторичный иммунодефицит был описан Е.С. Белоусовым в 1992 году как одна из форм вторичных иммунодефицитов, при котором наблюдается генерализация инфекций, вызванных условно патогенной флорой.

В настоящей работе декомпенсированный вторичный иммунодефицит характеризуется *в периферической крови* снижением в 2 раза лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-, в 2,5 раза В- и регуляторных Т-лимфоцитов; *в тимусе* – выраженной острой акцидентальной инволюцией с увеличением в 1,8 раз гибнущих клеток, резким опустошением в 5,6 раз коркового вещества, инверсией слоев, гиперплазией тимических телец, снижением общего числа лимфоцитов, В-, цитотоксических Т-, незрелых дубль позитивных лимфоцитов, Т-хелперов, повышением содержания нелимфоидных клеток тимуса, таких как макрофаги, дендритные и

эпителиальные клетки мозгового вещества; в селезенке определяется резкая в 5,4 раз редукция белой пульпы, замещение ее красной и выраженная мегакариоцитарная реакция; в брыжеечных лимфатических узлах выявлены реактивные изменения, гиперплазия В и Т зон, плазматизация мозговых тяжей, выраженная макрофагальная реакция в синусах, снижение количества лейкоцитов, лимфоцитов, В-лимфоцитов, содержания Т-хелперов, но повышение числа регуляторных Т-лимфоцитов; в очаге воспаления – ободочной кишке – повышение содержания Т-хелперов, В-лимфоцитов, макрофагов, уменьшение количества цитотоксических Т-лимфоцитов.

Острый воспалительный процесс в толстой кишке у половозрелых мышей линии C57Bl/6 через несколько недель после окончания приема декстрансульфата натрия хронизируется (Perse M., Cerar A., 2012) и характеризуется преобладанием реакции адаптивного иммунитета, иммунный ответ поляризуется преимущественно по Th2 типу (Tsaprouni L.G. et al., 2011).

Для исследования морфофункциональных изменений органов иммунной системы в динамике развития хронического воспаления, нами были смоделированы два срока хронического язвенного колита. Животные обеих экспериментальных групп одновременно начали потреблять 1% раствор ДСН в течение 5 суток, затем, по истечению 23 суток потребления питьевой воды, часть животных была выведена на 28-е сутки эксперимента. Часть животных получала 1% раствор ДСН повторно на 11 – 15-ые и 21 – 26-ые сутки, спустя 30 суток от момента последнего потребления ДСН, на 56-е сутки животные были выведены из эксперимента.

Механизм развития хронического воспалительного процесса связан преимущественно с поляризацией иммунного ответа по Th2 типу (Tsaprouni L.G. et al., 2011) и повышенной продукцией IL-2, IL-4, IL -5, IL-6, IL -10, IL-13 (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). Т-хелперы 2-го типа дифференцируется, главным образом, под действием IL-4 из CD4⁺ Т-лимфоцитов, а экспрессия гена IL-4 опосредована фактором транскрипции

STAT6. STAT6 содержит SH2 домен, компактный глобулярный домен, взаимодействует с белками, содержащими фосфорилированный остаток тирозина в определенной аминокислотной последовательности; функцией данного домена является направление фермента к субстрату и облегчение фермент-субстратного взаимодействия. Затем STAT фосфорилируется ассоциированной с ним JAK киназой и проникает в ядро, где индуцирует транскрипцию генов. Следует отметить, что НК клетки, способные продуцировать IL-4, не требуют активации транскрипционного фактора STAT6, видимо, он необходим для запуска дифференцировки T_H2 в целом, а не только для продукции IL-4. IL-4 продуцируется дендритными клетками, T-хелперами второго типа, цитотоксическими T-лимфоцитами и тучными клетками под действием TSLP. TSLP активирует дендритные клетки, которые, по принципу положительной обратной связи, активируют иммунный ответ преимущественно по T_H2 типу (Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008). Известно, что уровень продукции IL-2 коррелирует с количеством регуляторных T-лимфоцитов в тимусе и периферических лимфоидных органах (Chinen T. et al., 2016).

При хроническом язвенном колите на 28-е и 56-е сутки его развития морфологические изменения ободочной кишки были сходными. Выявлены острые язвы с реэпителизацией и регенераторные изменения, а также нарушения гистоархитектоники крипт. Воспалительные изменения в криптах сочетались с фиброзом слизистой оболочки и увеличением числа лимфоидных фолликулов в стенке ободочной кишки, что согласуется с результатами M. Per̃se, A. Cerar (2012).

По сравнению с контролем на 56-е сутки развития хронического язвенного колита в 4 раза повышается уровень эндотоксина в сыворотке крови, на 28-е сутки эксперимента этот показатель не отличается от контроля. Это отражает более выраженные, на 56-е сутки развития хронического язвенного колита, нарушения целостности эпителиальной

выстилки кишечника, а также усиление процессов транслокации микроорганизмов (Сахно Л. А. и соавт., 2009).

При хроническом язвенном колите на 56-е сутки развития в периферической крови нами отмечено снижение по сравнению с контрольной группой в 1,2 раза содержания Т-хелперов и увеличение в 3,5 раз регуляторных Т-лимфоцитов. Хронический язвенный колит на 28-е сутки по субпопуляционному составу лимфоцитов не отличается от контрольной группы. Увеличение количества регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови при хроническом язвенном колите показано как у мышей, так и у человека (Быковская С.Н. и др., 2013). J. Maul с соавт. (2005) показали, что при обострении язвенного колита в периферической крови у больных количество $CD4^{+}CD25^{high}FOXP3^{+}$ регуляторных Т-лимфоцитов уменьшается, а во время ремиссии – увеличивается. Эти данные согласуются с нашими результатами. Таким образом, определение содержания регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови может быть одним из критериев диагностики обострения и ремиссии язвенного колита у человека.

Увеличение численности популяции регуляторных Т-лимфоцитов также поляризует баланс Тх1/Тх2 в сторону Тх2 типа иммунного ответа (ChenX., 2010) и отражает развитие компенсаторных реакций иммунной системы, направленных на подавление воспаления. При хроническом колите регуляторные Т-лимфоциты супрессируют функции эффекторных Т-лимфоцитов и реципрокное равновесие между ними восстанавливается.

В тимусе при хроническом язвенном колите выявлена гиперплазия коркового вещества и эпителиальных клеток, более выраженная на 56-е сутки развития. Реактивные изменения тимуса – гиперплазия его коркового вещества чаще всего ассоциирована с миастенией гравис, но также наблюдается в случае аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и склеродермия (Berthelot J.M., le Goff B., Maugars Y., 2010).

На 28-е сутки уменьшается содержание цитотоксических Т-лимфоцитов, увеличивается – эпителиальных клеток мозгового вещества, дендритных клеток, уменьшается количество эпителиальных клеток мозгового вещества. На 56-е сутки развития хронического язвенного колита в тимусе по сравнению с контролем увеличивается содержание эпителиальных клеток мозгового вещества, уменьшается – эпителиальных клеток коркового вещества и макрофагов.

Выявленные при морфологическом и морфометрическом исследовании изменения тимуса свидетельствуют о восстановлении коры за счет активации процессов пролиферации и дифференцировки тимоцитов, что характерно, как показано Макаровой О.В. и соавт. (2012), для хронической фазы воспалительного процесса при подкожном введении липополисахарида с частицами сефарозы.

В селезенке при хроническом язвенном колите на 28-е и 56-е сутки нами выявлена гиперплазия Т-зависимой ПАЛМ-зоны, более выраженная на 56-е сутки. Изменения показателей объемной доли структурно-функциональных зон селезенки косвенно отражает активацию Т-клеточного звена иммунитета, что связано с суммацией процессов миграции лимфоидных клеток из костного мозга в периферические органы иммунной системы (Трунова Г.В. и др., 2011). Биологический смысл перераспределения лимфоидных клеток заключается в усилении антиген-специфической иммунной защиты от патогенных микроорганизмов и, очевидно, это связано с транслокацией микроорганизмов через стенку ободочной кишки в кровь. Прямое отношения к изменениям структурно-функциональных зон селезенки воздействие декстрансульфатом натрия не имеет, так как в клетках селезенки он не выявляется.

В брыжеечных лимфатических узлах в оба срока развития хронического язвенного колита выявлена выраженная гиперплазия коры и паракортикальной зоны, плазматизация мозговых тяжей, выраженная макрофагальная реакция в синусах. При хроническом язвенном колите на 56-

е сутки по сравнению с контролем уменьшается относительное содержание Т-хелперов и повышается абсолютное количество цитотоксических Т-, В- и регуляторных Т-лимфоцитов. Хронический язвенный колит на 28-е сутки по субпопуляционному составу лимфоцитов не отличается от контрольной группы, за исключением регуляторных Т-лимфоцитов, число которых повышается.

Выявленная нами макрофагальная реакция в синусах брыжеечных лимфатических узлов и стенке ободочной кишки характерна для хронического воспалительного процесса (Weiss L.M., O'Malley D., 2013). В пенистых макрофагах синусов у половозрелых самцов мышей C57Bl/6 при хроническом язвенном колите обнаружены гранулы декстрансульфата натрия, что, по всей вероятности наряду с транслокацией бактерий, играет ключевую роль в их поляризации по Th2-M2 типу и хронизации воспалительного процесса (Зуева Е.П. и др., 2010).

Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов брыжеечных лимфатических узлов у половозрелых мышей C57Bl/6 при хроническом язвенном колите, по сравнению с острым колитом, отражает поляризацию иммунного ответа преимущественно по Th2 типу с увеличением содержания В лимфоцитов и подавлением выраженности альтеративных и воспалительных процессов, обусловленных эффекторными клетками – цитотоксическими Т-лимфоцитами.

В ободочной кишке при хроническом язвенном колите на 28-е и 56-е сутки по сравнению с контролем повышается содержание Т-хелперов, В-лимфоцитов. На 28-е сутки также увеличивается содержание макрофагов. В оба срока развития хронического язвенного колита содержание регуляторных Т-лимфоцитов, после резкого повышения их содержания в 40 раз на 7 сутки развития язвенного колита, восстанавливается до контрольных значений.

L. Wang с соавт. (2015) в эксперименте на модели декстраниндуцированного язвенного колита показали, что между уровнем содержания В- и регуляторных Т-лимфоцитов существует реципрокные

регуляторные взаимодействия. При адоптивном переносе В-лимфоцитов тяжесть проявлений колита уменьшалась и восстанавливалось количество регуляторных Т-лимфоцитов у генетически модифицированных мышей дефицитных по В-лимфоцитам. (Wang L. et al., 2015).

По данным литературы при развитии хронического, рецидивирующего инфекционно-воспалительного процесса вторичный иммунодефицит приобретает форму компенсированного (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999), вне зависимости от обнаружения поломок иммунной системы с помощью количественных и функциональных тестов, описанных ранее (Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Понякина Н.Д., Лебедев К.А., 2003; Сетдикова Н.Х. и соавт., 2006; Новиков Д.К. и соавт., 2011; Симонова А. В., Лебедева И.С., 2012).

Таким образом, в ранние и поздние сроки развития хронического язвенного колита на фоне реакций адаптивного иммунитета с преобладанием Th2 типа иммунного ответа, развивается компенсированный вторичный иммунодефицит, который морфологически характеризуется лимфоидно-плазмоцитарной инфильтрацией собственной пластинки слизистой оболочки, гиперплазией функциональных зон тимуса, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов, более выраженной в поздние сроки развития хронического язвенного колита.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При катарально-язвенном колите развивается умеренная острая акцидентальная инволюция тимуса со снижением в нем содержания Т-лимфоцитов, гиперплазия лимфатических узлов и повышение содержания регуляторных Т- и В-лимфоцитов в ободочной кишке, что свидетельствует о формировании транзиторного вторичного иммунодефицита.

При тяжелом фибринозно-язвенном колите выраженная острая акцидентальная инволюция тимуса со снижением в нем всех субпопуляций лимфоцитов, за исключением регуляторных Т-лимфоцитов, гиперплазией мозговых эпителиальных клеток, редукцией белой пульпы селезенки, гиперплазии лимфатических узлов и повышением в них числа регуляторных Т-лимфоцитов, что соответствует фульминантному колиту у человека и сопровождается развитием декомпенсированного вторичного иммунодефицита.

В оба срока развития хронического язвенного колита в тимусе развивается гиперплазия коркового вещества и мозговых эпителиальных клеток, в селезенке и лимфатических узлах гиперплазия функциональных зон, что характерно для компенсированного вторичного иммунодефицита.

Разработанные модели вторичного иммунодефицитного состояния при остром и хроническом язвенном колите – транзиторного, компенсированного и декомпенсированного, целесообразно использовать для изучения механизмов иммунных нарушений этого и других инфекционно-воспалительных заболеваний у человека и доклинической оценки эффективности иммуотропных лекарственных препаратов.

6. ВЫВОДЫ

1. При остром катарально-язвенном колите развивается транзиторный вторичный иммунодефицит, который характеризуется:

- снижением количества всех субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови;
- умеренной острой акцидентальной инволюцией тимуса, гибелью лимфоцитов, гиперплазией и инволюцией тимических телец;
- гиперплазией брыжеечных лимфатических узлов, со снижением содержания в них Т-хелперов и В-лимфоцитов;
- повышением содержания регуляторных Т- и В-лимфоцитов в ободочной кишке.

2. При остром фибринозно-язвенном колите выявлен декомпенсированный вторичный иммунодефицит, характеризующийся:

- снижением числа Т- и В-лимфоцитов в периферической крови;
- выраженной острой акцидентальной инволюцией тимуса с резким опустошением и инверсией слоев, снижением содержания лимфоцитов за счет их гибели и миграции, повышением – макрофагов, дендритных и эпителиальных клеток мозгового вещества, гиперплазией тимических телец;
- резкой редукцией белой пульпы селезенки;
- гиперплазией брыжеечных лимфатических узлов, уменьшением количества Т-хелперов, цитотоксических Т-, В-лимфоцитов, повышением – регуляторных Т-лимфоцитов;
- повышением содержания Т-хелперов, В-лимфоцитов, макрофагов, снижением цитотоксических Т-лимфоцитов в ободочной кишке.

3. При хроническом язвенном колите в ранние и поздние сроки развития выявлен компенсированный вторичный иммунодефицит, который характеризуется:

- хронической акцидентальной инволюцией тимуса с гиперплазией эпителиальных клеток мозгового вещества;
- гиперплазией периартериальных лимфоидных муфт селезенки;
- гиперплазией функциональных зон и синусными реакциями брыжеечных лимфатических узлов;
- повышением содержания Т-хелперов и В-лимфоцитов в ободочной кишке.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

1. БЛУ – брыжеечные лимфатические узлы
2. ДСН – декстрансульфат натрия
3. ПАЛМ – периартериальные лимфоидные муфты
4. Ann – аннексин (Annexin)
5. CTLA – антигенцитотоксического Т-лимфоцита (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen)
6. DSS – декстрансульфат натрия (Dextran Sodium Sulfate)
7. FITC – алуоресцеин изотиоцианат (Fluorescein Isothiocyanate)
8. FOXP3 – транскрипционный фактор (Forkhead Box Protein3)
9. GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)
10. HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (Human Leucocyte Antigens)
11. IFN – интерферон (Interferon)
12. IL – интерлейкин (Interleukin)
13. LAL – лизат амебоцитов Limulus (Limulus Amebocyte Lysate)
14. LPS – липополисахарид (Lipopolysaccharide)
15. MALT – лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)
16. MHC – главный комплекс гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex)
17. NF-κB – ядерный фактор каппа-цепи В-лимфоцитов (Nuclear Factor of κ-chain B-lymphocytes)
18. NK-клетки – естественная киллерная клетка (Natural Killer)
19. PAMP – патогенассоциированные молекулярные паттерны, образы патогенности (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
20. PAR – суперсемейство интегральных мембранных рецепторов, сопряженных с G-белками (Protease-Activated Receptor)

- 21. PBS – фосфатно-солевой буфер (Phosphate Buffered Saline)
- 22. PE – фикоэритрин (Phycoerythrin)
- 23. PI – пропидий йодид (Propidium Iodide)
- 24. sIgA – секреторный иммуноглобулин А (Secretory Immunoglobulin A)
- 25. TCR – антиген распознающий рецептор Т-лимфоцитов (T-Cell Receptor)
- 26. TEC – тимусные эпителиальные клетки (Thymic Epithelial Cell)
- 27. TGF – трансформирующий фактор роста (Transforming Growth Factor)
- 28. Th – Т-хелпер (T-helper)
- 29. TLA – тимусный лейкоемический антиген (Thymus Leukemia Antigen)
- 30. TLR – Toll-подобные рецепторы (Toll-Like-Receptors)
- 31. TNF – фактор некроза опухоли (Tumor Necrosis Factor)
- 32. TREC – Т-рецепторные эксцизионные кольца (T-cell Receptor Excision Circle)
- 33. TSLP – тимический стромальный лимфопоэтин (Thymic Stromal Lymphopoietin)
- 34. UEA I – агглютинин улитки (Lectins: Ulex Europaeus Agglutinin I)

8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров А.Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 4. Внутриклеточные сигнальные пути TLR // Теоретическая медицина. – 2012. – № 8(43). – С. 163-167.
2. Абдулаева С.О., Хомякова Т.И., Симонова Е.Ю., Цветков И.С., Добрынина М.Т., Макарова О.В., Яцковский А.Н. Сравнительная морфологическая, бактериологическая и иммунологическая характеристика индуцированного декстрансульфатом натрия острого язвенного колита у мышей BALB/c и C57Bl/6 // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2013. – № 4. – С. 27-33.
3. Арлашкина О.М., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н. Морфология селезенки потомства крыс с вторичным иммунодефицитом // Acta Medica Eurasica. – 2016. – № 4. – С. 36-40.
4. Ахриева Х.М., Тертычный А.С., Маев И.В., Зайратьянц О.В. Классификация и морфологическая диагностика язвенного колита и болезни Крона // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2017. – № 3 (23). – С. 4-15.
5. Барта И. Селезенка. Будапешт: АН Венгрии. – 1976. – 264 с.
6. Белоусова Е.А. Язвенный колит и болезнь Крона. Т.: Триада. – 2002. – 128 с.
7. Бондаренко В.М. Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2007. – 300 с.
8. Буторова Л.И., Калинин А.В. Лапина Т.Л. О роли антимикробных пептидов в механизмах врожденного иммунитета кишечника человека. // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2004. – №3. – С.2-9

9. Быковская С.Н., Карасев А.В., Лохонина А.В., Клейменова Е.Б. Анализ Т-регуляторных клеток CD4+CD25+FOXP3+ при аутоиммунных заболеваниях // Молекулярная медицина. – 2013. – № 3. – С. 20-27.
10. Васильев А.А. Клиника и хирургическое лечение неспецифического язвенного колита. М.: Медицина. – 1967. – 233 с.
11. Вылков И.Н. Патология лимфатических узлов // ДИ «Медицина и физкультура». – 1975. – 304 с.
12. Вышегуров Я.Х., Закирова Д.З., Расческов А.Ю., Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин как облигатный фактор патогенеза эндогенных иридоциклитов и эндофтальмитов неясной этиологии. ЗАО «КДО-тест». Монография. – 2006. – 133 с.
13. Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Академия. – 2004. – 528 с.
14. Гариб Ф.Ю., Ризопулу А.П. Стратегия иммунной эвазии патогенов: супрессия иммунного ответа путем активирования Т-регуляторных клеток хозяина // Иммунология. – 2016. – № 37 (1). – С. 35-45.
15. Диатроптов М.Е., Макарова О.В., Серебряков С.Н., Трунова Г.В., Малайцев В.В. Морфофункциональные изменения иммунной системы мышей BALB/с и С57В1/6 при воздействии низкой дозы липополисахарида // Иммунология. – 2011. – № 3. – С. 135-138.
16. Дунаевская С.С. Роль иммунной системы в оценке тяжести тяжелого острого панкреатита // Кубанский научный медицинский вестник. – 2013. – № 3 (138). – С. 59-61.
17. Зайратьянц О.В. Глава 2. Вилочковая железа и аутоиммунные болезни в книге Харченко В.П. Болезни вилочковой железы. М.: Триада-Х. – 1998. – С. 17-59.
18. Золотова Н.А. Структурная и функциональная характеристика муцинов // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2014. – № 1(9). – С. 66-72.
19. 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 C57Bl/6 при остром и хроническом декстраниндуцированном колите // Цитокины и воспаление. – 2015. – 2(14). – С. 70-76.
20. Золотова Н.А., Кирюхин С.О., Хочанский Д.Н., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Экспериментальная модель хронического колита: морфологическая характеристика // Архив патологии. – 2014. – 1(8). С. 50-54.
 21. Зуева Е.П., Лопатина К.А., Разин Т.Г., Гурьев А.М. Полисахариды в онкологии // Печатная мануфактура. – 2010. – С. 23-25.
 22. Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. Спб.: Сотис. – 1996. – 270 с.
 23. Капулер Л.Л. Патологоанатомические изменения толстой кишки при неспецифических воспалительных заболеваниях кишечника. Под ред. Воробьева Г.И., Халифа И.Л. М. Миклош. – 2008. – С. 71-105.
 24. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. Спб.: Фолиант. – 2008. – 552 с.
 25. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 800 с.
 26. Козлов В. К., Винницкий Л. И. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса // Общая реаниматология. –2005. – № I (4). –С. 65-76.
 27. Конев Ю.В., Лазебник Л.Б. Эндотоксин (ЛПС) в патогенезе атеросклероза // Гастроэнтерология. – 2011. – № 11. – С. 15-26.
 28. Круглякова Л.В., Нарышкина С.В., Сулима М.В., Солуянова И.П., Решетникова Л.К. Хроническая обструктивная болезнь легких и дисбактериоз кишечника // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 47. – С.103-110.
 29. Кузнецов С.Л., Пугачев М.К. Лекции по гистологии, цитологии и эмбриологии. Учебное пособие – М.: Медицинское информационное агентство. – 2004. – 432 с.

30. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Гараева А.Я., Чулкина М.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И. Кооперативное взаимодействие сигнальных путей рецепторов TLR4, TLR9 И NOD2 в макрофагах мыши // Иммунология. – 2017. – № 39(1). – С. 4-11.
31. Лусс Л.В., Мартынов-Радущинский А.А. Вторичная иммунная недостаточность. Всегда ли нужны иммуномодуляторы? // Медицинский совет. – 2014. – № 2. – С. 40-45.
32. Лусс Л.В. Место иммуномодуляторов в общеклинической практике. Когда, кому, зачем? // Аллергология. – 2015. – № 7 (108). – С. 5-10.
33. Макарова О.В., Диатроптов М.Е., Серебряков С.Н., Малайцев В.В., Богданова И.М. Морфофункциональные изменения иммунной системы мышей BALB/c и C57Bl/6 при хроническом бактериальном грамотрицательном эндотоксикозе // Архив патологии. – 2012. – № 74 (3). – С. 43-48.
34. Макарова О.В., Яблонская А.М., Михайлова Л.П., Яглова Н.В., Солдаитов Д.И. Индивидуальные различия реакций органов-мишеней и иммунной системы при экспериментальном эндотоксикозе // Архив патологии. – 2009. – № 71 (4). – С. 37-41.
35. Маркина А.А., Кондратьева И.А. Исследование защитных свойств биополимеров углеводной природы *Shigella Sonnei* на моделях эндотоксического шока // Вестник Московского Университета. Сер. 16 Биология. – 2013. – № 2. – С. 12-15.
36. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медгиз. – 1961. – 343 с.
37. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Новикова В.И. Иммунодефицитные инфекционные болезни // Медицинские новости. – 2011. – №5. – С. 1-10.
38. Писарев В. Б., Григорьева Н. В., Поройская А. В. Морфологическая диагностика поражения селезенки, лимфатических узлов и тимуса вирусом лихорадки западного Нила // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2009. – № 1. – С. 22-24.

39. Понякина И.Д., Лебедев К.А. Классификация типов и причин иммунной недостаточности // Физиология человека. – 2003. – № 3. – С. 110-116.
40. Рабсон А., Ройт А., Делвз П. Основы медицинской иммунологии. М.: Мир. – 2006. – 320 с.
41. Райкис Б.Н., Пожарская В.О., Казиев А.Х. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией. Учебное пособие. М.: Триада-Х. – 2002. – 352 с.
42. Решетникова Л.К., Нарышкина С.В., Круглякова Л.В., Сулима М.В. Состояние иммунного статуса при хронической обструктивной болезни легких, ассоциированной с дисбактериозом кишечника // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – № 52. – С.41-46.
43. Руш К., Петере У. Кишечник - центр управления иммунной системой // Биологическая медицина. – 2003. – № 3. – С. 4-9.
44. Салахов И. М., Ипатов А. И., Конев Ю. В., Яковлев М.Ю. Современные аспекты патогенеза эндотоксического шока // Успехи соврем. биологии. – 1998. – № 118 (1). – С. 33–49.
45. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: Джангар. – 2000. – 184 с.
46. Сахно Л. А., Сарнацкая В. В., Масленный В. Н., Юшко Л. А., Корнеева Л.Н., Коротич В.Г., Николаев В.Г. Сравнительная оценка способности энтеросорбентов различной природы связывать бактериальные эндотоксины // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.– 2009. – № 2. – С. 168-172.
47. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М.: Наука. –1960. – 255 с.
48. Сетдикова Н.Х., Латышева Т.В., Пинегин Б.В., Ильина Н.И. Иммунодефициты: принципы диагностики и лечения. М.: Фармарус принт. – 2006. – 19 с.
49. Симонова А.В., Лебедева И. С. Инновационные методы диагностики и лечения вторичных иммунодефицитных состояний // Лечащий врач. – 2012. – № 4. – С. 1-9.

50. Стяжкина С.Н., Варганов М.В., Третьяков Е.В. Морфологические изменения слизистой оболочки тонкого кишечника под влиянием энтеральной иммунокоррекции и энтерального питания у пациентов с асептическим панкреонекрозом. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №1. – С. 14-18.
51. Татарко С.В. Морфофункциональное состояние селезенки при разных по течению и этиологии видах воспаления // Теоретическая и экспериментальная медицина. – 2014. – №2-3 (63-64). – С. 50-56.
52. Тертычный А.С., Андреев А.И., Гертох Г., Гебоэс К. Участие регуляторных Т-клеток в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника у детей // Детская гастроэнтерология. – 2010. – Том 7. – №1 (15). – С. 27.
53. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Никитина К.Е., Волынская Е.И. Воспалительные заболевания кишечника: на перекрестке проблем // Практическая медицина. – 2012. – № 3(58). – С.17-22.
54. Трунова Г.В., Макарова О.В., Диатроптов М.Е., Богданова И.М., Михайлова Л.П., Абдулаева С.О. Морфофункциональная характеристика иммунной системы мышей линии BALB/c и C57Bl/6 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 151(1). – С. 112-115.
55. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Вторичные иммунодефициты: клиника, диагностика, лечение // Иммунология. – 1999. – № 1. – С. 14-17.
56. Хэм А., Кормак Д. Гистология. Пер. с англ. – М.: Мир. – 1983. – Т.2. – 254 с.
57. Шумейко Н.С. Становление и возрастные преобразования основных структурных компонентов вилочковой железы человека // Дисс. канд. мед. наук. М. – 1979.
58. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – С. 379-495.

59. Abramson J., Anderson G. Thymic Epithelial Cells // *Annu. Rev. Immunol.* – 2017. – №26 (35). – P. 85-118. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052320.
60. Abreu M.T., Fukata M., Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease // *J Immunol.* – 2005. – №174. – P. 4453–4460.
61. Allan S.E., Crome S.Q., Crellin N.K., Passerini L., Steiner T.S., Bacchetta R. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production // *Int Immunol.* – 2007. – №19 (4). – P. 345–354.
62. Ando T., Hatsushika K., Wako M., Ohba T., Koyama K., Ohnuma Y., Katoh R., Ogawa H., Okumura K., Luo J., Wyss-Coray T., Nakao A. Orally administered TGF-beta is biologically active in the intestinal mucosa and enhances oral tolerance // *J Allergy Clin Immunol.* – 2007. – №120 (4). – P. 916-923.
63. Bazdar D.A., Sieg S.F. Interleukin-7 Enhances Proliferation Responses to T-Cell Receptor Stimulation in Naïve CD4+ T Cells from Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons // *Journal of Virology.* – 2007. – №81 (22). – P. 12670-12674.
64. Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3 // *Nat Genet.* – 2001. – №27(1). – P. 20 –21.
65. Berthelot J.M., le Goff B., Maugars Y. Thymic Hassall's corpuscles, regulatory T-cells, and rheumatoid arthritis // *Semin Arthritis Rheum.* – 2010. – № 39(5). –P. 347-355.
66. Bouma G., Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease // *Nat Rev Immunol.* – 2003. – № 3. –P. 521–533.
67. Brandtzaeg P. Compartmentalized migration of mucosal B cells: normal dichotomy and disease-associated alterations // *Cell Adhesion Molecules in Health and Disease.* – 2003. –P. 99-114

68. Carlos R.V., Ligia Y.S. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil // *Arq.Gastroenterol.* – 2009. – №46 (1). – P. 20-25.
69. Carpenter A.C., Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus // *Nat Immunol.* – 2010. – №11 (8). – P. 666-673.
70. Chen X., Subleski J.J., Hamano R., Howard O.M., Wilttrout R.H., Oppenheim J.J. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood // *Eur J Immunol.* –2010. – №40(4). –P. 1099-1106.
71. Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes // *Nat Rev Immunol.* – 2011. – №11(7). –P. 445-456.
72. Chinen T., Kannan A.K., Levine A.G., Fan X., Klein U., Zheng Y., Gasteiger G., Feng Y., Fontenot J.D., Rudensky A.Y. An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function // *Nat Immunol.* – 2016. – № 17(11). – P. 1322-1333.
73. Cho J.H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases // *Nat Rev Immunol.* – 2008. – №8(6). –P. 458-66.
74. Chow J.C., Young D.W., Golenbock D.T. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction // *J Biol Chem.* –1999. – №274. –P. 10689–10692.
75. Delves P.J., Roitt I.M. The immune system. First of two parts // *N Engl J Med.* –2000. – № 343 (1). –P. 37-49.
76. Deplancke B., Gaskins H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer // *Am J Clin Nutr.* – 2001. – №73(6). – P. 1131S-1141S.
77. DiPaolo R.J., Glass D.D., Bijwaard K.E., Shevach E.M. CD4CD25 Tcells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells // *J Immunol.* – 2005. – №175. –P. 7135–7142.

78. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection // *Nature*. – 1998. – №396 (6712). –P. 690-695.
79. Elenkov I.J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance // *Ann N Y Acad Sci*. – 2004. –№ 1024. – P. 138-146.
80. Es J.H., Geest N., Born M., Clevers H., Hassan B.A. Intestinal stem cells lacking the Math1 tumour suppressor are refractory to Notch inhibitors // *Nat Commun*. –2010. – №17(1). –P. 18.
81. Faria A.M., Weiner H.L. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications // *Adv Immunol*. –1999. – №73. –P. 153-264.
82. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. – 2010. – №2(1). – P. 1-14.
83. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 // *Cell Death Differ*. –2012. – №19(1). – P. 107-120.
84. Gangadharan D., Lambolez F., Attinger A., Wang-Zhu Y., Sullivan B.A., Cheroutre H. Identification of pre- and postselection TCR α beta+ intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus // *Immunity*. – 2006. – № 25(4). – P. 631-641.
85. Gerseemann M., Wehkamp J., Stange E.F.. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease // *J Intern Med*. – 2012. – № 271(5). – P. 421-428.
86. Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, Boyd R. Thymic generation and regeneration // *Immunol Rev*. – 2003. –№195. –P. 28-50.

87. Glebov O.K., Rodriguez L.M., Nakahara K., Jenkins J, Cliatt J., Humbyrd C.J., DeNobile J, Soballe P., Simon R., Wright G., Lynch P., Patterson S., Lynch .H, Gallinger S., Buchbinder A., Gordon G., Hawk E., Kirsch I.R. Distinguishing Right from Left Colon by the Pattern of Gene Expression // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2003.– № 12 (8). P. 755-762
88. Hakansson A., Tormo-Badia N., Baridi A., Xu J., Molin G., Hagslätt M.L., Karlsson C., Jeppsson B., Cilio C.M., Ahrne S. Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice // *Clin Exp Med*. –2015. –№15. – P. 107-120.
89. Halstensen T.S., Farstad I.N., Scott H., Fausa O., Brandtzaeg P. Intraepithelial TcR alpha/beta+ lymphocytes express CD45RO more often than the TcR gamma/delta+ counterparts in coeliac disease // *Immunology*. – 1990. –№71 (4). –P. 460-466.
90. Haraldsen G., Sollid L.M., Bakke O., Farstad I.N., Kvale D., Norstein J., Stang E., Brandtzaeg P. Major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by human intestinal endothelial cells // *Gastroenterology*. – 1998. – №114(4). – P. 649-656.
91. Heimesaat M.M., Fischer A., Siegmund B. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4 // *PLoS ONE*. 2007. *doi: 10.1371/journal.pone.0000662*.
92. Herold M.J., McPherson K.G., Reichardt H.M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function // *Cell Mol Life Sci*. – 2006. – № 63(1). – P. 60-72.
93. Holmén N., Lundgren A., Lundin S., Bergin A.M. et al. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity // *Inflamm. Bowel. Dis.*– 2006.– №12.– P.447-456.
94. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FOXP3 // *Science*. – 2003. – №299. – P. 1057–1061.

95. Izcue A., Coombes J.L., Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation // Immunological Reviews. – 2006. – № 212. – P. 256–271
96. Jensen K.D, Su X., Shin S., Li L., Youssef S., Yamasaki S., Steinman L., Saito T., Locksley R.M., Davis M.M., Baumgarth N., Chien Y.H. Thymic selection determines $\gamma\delta$ T cell effector fate: antigen-naïve cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon γ // Immunity. – 2008. – № 29. –P. 90–100.
97. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J., Enk A.H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood // J Exp Med. – 2001. – № 4;193(11). –P. 1285-1294.
98. Kato Y, Morikawa A, Sugiyama T, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, Yokochi T. Role of tumor necrosis factor- α and glucocorticoid on lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis of thymocytes // FEMS Immunol Med Microbiol – 1995. – №12 (3-4). – P.195-204.
99. Kawada M., Arihiro A., Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease // World J Gastroenterol. – 2007. – №13 (42). – P. 5581-5593.
100. Kendall M. Thymus. Anatomy. In: Surgery of the Thymus // Ed. by J. C. Givel. Berlin, Springer. –1990. –P. 19-27.
101. Khor T.O., Huang M.T., Prawan A., Liu Y., Hao X., Yu S., Cheung W.K., Chan J.Y., Reddy B.S., Yang C.S., Kong A.N. Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer // Cancer Prev. Res. (Phila). –2008. M № 1. –P. 187–191.
102. Kim J. J. Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD // J Vis Exp. – 2012. – № 1(60).– P. 1-6

103. Kim Y.S., Ho S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress // *Curr Gastroenterol Rep.* – 2010. – №12 (5). – P. 319-330.
104. Kim J.Y., Yoon Y.D., Ahn J.M., Kang J.S., Park S.K., Lee K., Song K.B., Kim H.M., Han S.B. Angolan isolated from *Angelica gigas* Nakai induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 // *Int Immunopharmacol.* – 2007. – № 7(1). – P. 78-87.
105. Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights // *Exp Anim.* – 2000. – №49 (1). – P. 9–15.
106. Klein L., Kyewski B., Allen P.M., Hogquist K.A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see // *Nat Rev Immunol.* – 2014. – №14 (6). – P. 377–391.
107. Krieken J.H., Velde J. Immunohistology of the human spleen: an inventory of the localization of lymphocyte subpopulations // *Histopathology.* – 1986. – № 10(3). – P. 285-294.
108. Kristin H. The Thymus – What's new? // *Histopathology.* – 1989. – P. 537-548.
109. Kroger C.J., Spidale N.A., Wang B., Tisch R. Thymic Dendritic Cell Subsets Display Distinct Efficiencies and Mechanisms of Intercellular MHC Transfer // *J Immunol.* – 2017. – № 198 (1). – P. 249-256.
110. Kruglov A.A., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Winsauer C., Prepens S., Seleznik G.M., Eberl G., Littman D.R., Heikenwalder M., Tumanov A.V., Nedospasov S.A. Nonredundant function of soluble LT α 3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis // *Science.* – 2013. – № 342 (6163). – P. 1243-1246.
111. Kubera M., Basta-Kaim A., Holan V., Simbirtsev A. Effect of mild chronic stress, as a model of depression, on the immunoreactivity of C57BL/6 mice // *Int. J. Immunopharmacol.* – 1998. – №20. – P. 781–789.

112. Lakatos L., Lakatos P.L. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease increasing in Eastern Europe // *Postgrad Med J.* – 2006. – №82. – P. 332-337.
113. Laroui H., Ingersoll S.A., Liu H.C., Baker M.T., Ayyadurai S., Charania M.A., Laroui F., Yan Y., Sitaraman S.V., Merlin D. Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain-Length Fatty Acids in the Colon // *PLoS ONE.* – 2012. *doi: 10.1371/journal.pone.0032084*
114. Lee Y.H., Williams A., Hong C.S., You Y. Senoo M., Saint-Jeannet J.P. Early development of the thymus in *Xenopus laevis* // *Dev Dyn.* – 2013. – № 242(2). – P. 164–178.
115. Leishman A.J., Gapin L., Capone M., Palmer E., MacDonald H.R., Kronenberg M., Cheroutre H. Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8 α α (+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides // *Immunity.* – 2002. – №16(3). – P. 355-364.
116. Li J., Nishizawa K., An W., Hussey R.E., Lialios F.E., Salgia R., Sunder-Plassmann R., Reinherz E.L. A cdc15-like adaptor protein (CD2BP1) interacts with the CD2 cytoplasmic domain and regulates CD2-triggered adhesion // *The EMBO Journal.* – 1998. – № 17(24). – P. 7320-7336.
117. Liang H., Baudouin C., Labbe A., Riancho L., Brignole-Baudouin F. Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) reactions to antiglaucoma prostaglandins with or without BAK-preservative in rabbit acute toxicity study // *PLoS One.* – 2012. – № 7(3).
118. Linden M., Ward J.M., Cherian S. Hematopoietic and Lymphoid Tissues // *Comparative Anatomy and Histology A Mouse and Human Atlas.* – 2012. – P. 309-325.
119. Liu Y.J., Zhang J., Lane P.J., Chan E.Y., MacLennan I.C. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens // *Eur J Immunol.* – 1991. – № 21(12). – P. 2951-2962.

120. Lord J.D., Shows D.M., Chen J., Thirlby R.C. Human Blood and Mucosal Regulatory T Cells Express Activation Markers and Inhibitory Receptors in Inflammatory Bowel Disease // PLoS One. – 2015.– 10(8): e0136485. *doi:10.1371/journal.pone.0136485*.
121. Lund D., Chu Y., Brooks R. Effects of a common human gene variant of extracellular superoxide dismutase on endothelial function after endotoxin in mice // J. Physiol. – 2007. – № 584. – P. 583—590.
122. Macpherson A.J., Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria // Science. – 2004. – № 303. –P. 1662–1665.
123. Marano M.A., Fong Y., Moldawer L.L., Wei H., Calvano S.E., Tracey K.J., Barie J.S., Manogue K., Cerami A., Shires G.t.G., Lowry S.F. Serum cachectin/tumor necrosis factor in critically // Surg. Gynecol. Obstet. –1990. – № 170. –P. 32-38.
124. Matsui N., Ohigashi I., Tanaka K., Sakata M., Furukawa T., Nakagawa Y., Kondo K., Kitagawa T., Yamashita S., Nomura Y., Takahama Y., Kaji R. Increased number of Hassall's corpuscles in myasthenia gravis patients with thymic hyperplasia // J Neuroimmunol. – 2014. – № 269(2). –P. 56-61.
125. Matter K., Balda M.S. SnapShot: Epithelial Tight Junctions // Cell. – 2014. – № 157(4). – P. 992-992.
126. Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2005. – № 6. – P. G1328–G1338.
127. 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). –P. G1140–G1149.

128. Meunier M., Bazeli R., Feydy A., Drape J.L., Kahan A., Allanore Y. Incomplete thymic involution in systemic sclerosis and rheumatoid arthritis // *Joint Bone Spine*. – 2013. – № 80(1). – P. 48-51.
129. Mudter J., Neurath M.F. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance // *Inflamm. Bowel Dis*. –2007. – № 13. –P. 1016– 1023.
130. Murakami M., Honjo T. Involvement of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity // *Immunol Today*. – 1995. – № 16(11).№ P. 534-539.
131. Murphy K. // *Janeway's Immunobiology*. Garland Science. – 2012. – P. 37-65, 335-465.
132. Múzes G., Molnar B., Tulassay Z., Sipos F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases // *World J Gastroenterol*. – 2012. – № 18(41). – P. 5848-5861.
133. Nagamura-Inoue T., Tamura T., Ozato K. Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells // *Int Rev Immunol*. – 2001. – № 20(1). –P. 83-105.
134. Neutra M.R., Mantis N.J., Kraehenbuhl J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues // *Nat Immunol*. – 2001. – № 2. – P. 1004–1009.
135. Newberry R.D., Lorenz R.G. Organizing a mucosal defense // *Immunol Rev*. – 2005. – № 206. – P. 6-21.
136. Ni J., Chen S.F., Hollander D. Effects of dextran sulfate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes // *Gut*. – 1996. – № 39(2). – P.234-241.
137. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice // *Gastroenterology*. – 1990. – № 98(3). –P.694-702.
138. Ortega-Cava C.F., Ishihara S., Rumi M.A., Kawashima K., Ishimura N., Kazumori H., Udagawa J., Kadowaki Y., Kinoshita Y. Strategic

- compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut // *J Immunol.* – 2003. – № 170(8). – P. 3977-3985.
139. Otto H. Pathologie des Thymus // *Spezielle Pathologische Anatomie.* – 1984. – P. 13-17.
 140. Papenfuss T.L., Cesta M.F. Chapter 2. Spleen// *Immunopathology in Toxicology and Drug Development.* – 2017. – V. 2. P. 37-57.
 141. Park L.S., Martin U., Garka K., Gliniak B., Di Santo J.P., Muller W., Largaespada D.A., Copeland N.G., Jenkins N.A., Farr A.G., Ziegler S.F., Morrissey P.J., Paxton R., Sims J.E. Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor // *J Exp Med.* – 2000. – № 4;192(5). – P. 659-670.
 142. Perse M., Cerar A. Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks // *J Biomed Biotechnol.* – 2012. – *ID718617.* –P.13.
 143. Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses // *Ann N Y Acad Sci.* – 2004. – № 1029. – P. 132–141.
 144. Pozzesi N., Fierabracci A., Thuy T.T., Martelli M.P., Liberati A.M., Ayroldi E., Riccardi C., Delfino D.V. Pharmacological modulation of caspase-8 in thymus-related medical conditions // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2014. – № 351(1). – P. 18-24.
 145. Rescigno M. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria // *Nat Immunol.* – 2001. – № 2. – P. 361–367.
 146. Ritter M., Sauvage C., Cotmore S. The human thymus microenvironments: in vivo identification of thymic nurse cells and other antigenically distinct subpopulations of epithelial cells // *Immunol.* – 1981. – P. 439-416.
 147. Rogler G., Andus T., Aschenbrenner E. Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease // *Eur J Gastroenterol Hepatol.* – 1997. – № 9. – P. 893–899.

148. Rosai J. // Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 9th Edition. – 2004. –P. 1878-1896, 2019-2026.
149. Ruckdeschel K., Pfaffinger G., Haase R., Sing A., Weighardt H., Häcker G., Holzmann B., Heesemann J. Signaling of Apoptosis through TLRs Critically Involves Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter Inducing IFN- β , but Not MyD88, in Bacteria-Infected Murine Macrophages // J Immunol. – 2004. –№ 173 (5). –P. 3320-3328.
150. Sakaguchi S. Naturally arising FOXP3-expressing CD25CD4 regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self // Nat Immunol. –2005. – № 6. – P. 345–352.
151. Sasaki S., Ishida Y., Nishio N., Ito S., Isobe K. Thymic involution correlates with severe ulcerative colitis induced by oral administration of dextran sulphate sodium in C57BL/6 mice but not in BALB/c Mice // Inflammation. – 2008. – 31 (5).– P. 1-6.
152. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases // PLoS Pathog. – 2006. – № 2(6): e62.
153. Savino W., Mendes-da-Cruz D.A., Lepletier A. Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease // Nat Rev Endocrinol. – 2016. – № 12. – P. 77–89.
154. Seed B. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2// Nature. – 1987. – № 4;329(6142). – P. 840-842.
155. Shah D,K., Zúñiga-Pflücker J.C. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development // J Immunol.–2014. – № 1;192(9). – P 4017-4023.
156. Shen Z., Zhu C., Quan Y., Yang J., Yuan W., Yang Z., Wu S., Luo W., Tan B., Wang X. Insights into Roseburia intestinalis which alleviates experimental colitis pathology by inducing anti-inflammatory responses // J Gastroenterol Hepatol. – 2018. doi: 10.1111/jgh.14144.
157. Smith P., Siddharth J., Pearson R., Holway N., Shaxted M., Butler M.,Clark N.,Jamontt J.,Watson R.P.,Sanmugalingam D.,Parkinson S.J. Host Genetics

- and environmental factors regulate ecological succession of the mouse colon tissue-associated microbiota// PLoS ONE. – 2012. – № 7(1). 30273.
158. Stein H., Bonk A., Tolksdorf G., Lennert K., Rodt H., Gerdes J. Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas // J Histochem Cytochem. – 1980. – № 28(8). – P.746-760.
159. Suffredini A.F., Reda D., Banks S.M., Tropea M., Agosti J.M., Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF- α receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration // J. Immunol. – 1995. – № 155. –P. 5038-5045.
160. Takenouchi Y., Kobayashi T., Matsumoto T. Gender differences in age-related endothelial function in the murine aorta // Atherosclerosis. – 2009. –№ 206. – P. 397—404.
161. Theede K., Dahlerup J.F., Fallingborg J., Hvas C.L., Kjeldsen J., Munck L.K., Nordgaard-Lassen I. Biologic therapy in inflammatory bowel disease // Dan Med J. – 2013. – № 60(6):B4652.
162. Trasher J.D., Greulich R.C. The duodenal progenitor population. III. The progenitor cell cycle of principal, goblet and paneth cells // J Exp Zool. – 1966. – №161(1). – P. 9-19.
163. Trigg M.E. Immune function of the spleen // South Med J. – 1979. – №72(5). – P. 593-599.
164. Trivedi P.P., Jena G.B. Ulcerative colitis-induced hepatic damage in mice: Studies on inflammation, fibrosis, oxidative DNA damage and GST-P expression // Chem. Biol. Interact. –2012. – №201 (3). –P. 19–30.
165. Tsaprouni L.G., Ito K., Powell J.J., Ian M. Adcock, Punchard N. Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases // J Inflamm. – 2011. – №8 (1). –P.1-13.
166. Ueno H., Banchereau J., Vinuesa C.G. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice // Nat Immunol. – 2015. – №16 (2). – P. 142–152.

167. Vaillant A.J., Qurie A. Immunodeficiency. Creighton University School of medicine. – 2018.
168. Van den Brandt J., Wang D., Kwon S.H., Heinkelein M., Reichardt H.M. Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo // *Genesis*. – 2004. – № 39(2). – P. 94-9.
169. Verma N., Ahuja V., Paul J. Profiling of ABC Transporters During Active Ulcerative Colitis and In Vitro Effect of Inflammatory Modulators // *Dig Dis Sci*. –2013.– №58 (8). – P. 2282-92.
170. Voso M.T., Burn T.C., Wulf G., Lim B., Leone G., Tenen D.G. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1994. – №91(17). – P. 7932-7936.
171. Walker M.R., Kasprowicz D.J., Gersuk V.H., Benard A., Van L.M., Buckner J.H. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+ // *J Clin Invest*. – 2003. – №112(9). – P. 1437–43.
172. Wang D, Muller N, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells // *J Immunol*. – 2006. – №176(3). – P. 1695-702.
173. Wang Y., Liu X.P., Zhao Z.B., Chen J.H. et al. Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease // *J. Dig. Dis*. – 2011. –№12. – P.286-294.
174. Wannemuehler M.J., Kiyono H., Babb J.L., Michalek S.M., McGhee J.R., Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction // *J. Immunol*. – 1982. – №129. – P. 959–965.
175. Watanabe N., Wang Y.H., Lee H.K., Ito T., Wang Y.H., Cao W., Liu Y.J. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus // *Nature*. –2005. – №436 (7054). – P. 1181-1185.
176. Weiss L.M., O'Malley D. Benign lymphadenopathies // *Modern Pathology*. – 2013. – № 26. – P. 88–96.

177. Wendelsdorf K., Bassaganya-Riera J., Hontecillas R., Eubank S. Model of colonic inflammation: immune modulatory mechanisms in inflammatory bowel disease // *J Theor Biol.* – 2010. – №264(4). – P. 1225-1239.
178. Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy // *Nat Genet.* – 2001. – №27(1). – P. 18–20.
179. Xu X., Ge Q. Maturation and migration of murine CD4 single positive thymocytes and thymic emigrants // *Computational and Structural Biotechnology Journal.* – 2014. – №9 (15). – P. 5-9.
180. Yan F., Mo X., Liu J., Ye S., Zeng X., Chen D. Thymic function in the regulation of T cells, and molecular mechanisms underlying the modulation of cytokines and stress signaling (Review) // *Mol Med Rep.* – 2017. – №16 (5). – P. 7175-7184.
181. Yokoyama Y., Fukunaga K., Fukuda Y., Tozawa K., Kamikozuru K., Ohnishi K., Kusaka T., Kosaka T., Hida N., Ohda Y., Miwa H., Matsumoto T. Demonstration of low-regulatory CD25^{High}CD4⁺ and high-pro-inflammatory CD28-CD4⁺ T-Cell subsets in patients with ulcerative colitis: modified by selective granulocyte and monocyte adsorption apheresis // *Dig Dis Sci.* – 2007. – № 52(10). – P. 2725-31.
182. Yu T.Q., Saruta M., Avanesyan A., Fleshner R.F., Banham H.A., Papadakis A.K. Expression and functional characterization of FOXP3CD4 regulatory T cells in ulcerative colitis // *Inflammatory Bowel Diseases.* – 2007. – №13 (2). – P. 191–199.
183. Zecchini V., Domaschewicz R., Winton D., Jones P. Notch signaling regulates the differentiation of post-mitotic intestinal epithelial cells // *Genes Dev.* – 2005. – №19(14). – P. 1686-1691.
184. Ziegler S.F., Roan F., Bell D.B., Stoklasek T.A., Kitajima M., Han H. The Biology of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) // *Advances in Pharmacology.* – 2013– №66. – P. 1054-89.