

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БОЛЕЗНИ КРОНА И ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Костина А.А.

*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, e-mail: prof.osikov@yandex.ru*

Во всем мире наблюдается стойкий рост частоты хронических заболеваний кишечника, наиболее тяжелыми и распространенными из которых являются воспалительные заболевания кишечника – болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). Этиология и патогенез БК и ЯК до настоящего времени точно не установлены, а применяемая лекарственная терапия не приводит к излечению и имеет множество побочных эффектов, что ограничивает её использование. В связи с этим важным является дальнейшее изучение патогенеза БК и ЯК, а также разработка и доклиническая апробация новых подходов к диагностике и лечению. Это возможно в условиях экспериментального моделирования БК и ЯК у животных. Цель работы – провести критический анализ данных об известных методах экспериментального моделирования БК и ЯК, индексированных в рецензируемых источниках баз данных Pubmed и Российского индекса научного цитирования за период 2006–2015 гг. Экспериментальная модель ЯК и БК должна быть максимально приближена к ВЗК у человека по клинической, морфологической, иммунологической и гематологической картине. Важными требованиями к моделям являются простота, скорость постановки и низкая стоимость. Выявлено два основных подхода при моделировании ВЗК: с использованием трансгенных животных с нокаутированными генами, продукты которых занимают ключевые позиции в патогенезе (STAT4, STAT73, ИЛ-7, CD40+), а также химически индуцированные модели (декстрана сульфат натрия, тринитробензолсульфоновая кислота, динитробензолсульфоновая кислота, уксусная кислота). Критический анализ экспериментальных моделей ВЗК позволил обозначить наиболее оптимальные подходы – для ЯК модель с 4 % уксусной кислотой, для БК – модель с динитробензолсульфоновой кислотой.

Ключевые слова: болезнь Крона, язвенный колит, воспалительные заболевания кишечника, экспериментальное моделирование.

## EXPERIMENTAL MODELING OF CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS

Osikov M.V., Simonian E.V., Bakeeva A.E., Kostina A.A.

*South State Medical University, Chelyabinsk, e-mail: prof.osikov@yandex.ru*

There is a constant increase of the chronic bowel diseases, especially Crohn's disease (CD) and Ulcerative colitis (UC) all over the world. Etiology and pathogenesis are still unknown and the drug therapy has lots of adverse events, that fact leads to rare use of it. That's why the continuation of the following researches of immunologic aspects of pathogenesis is very important for the development of more effective approaches to the diagnostic and the treatment of the pathologies. That's possible by using different experimental animals' models of UC and CD. Objective is to make a critical analysis of the widely known experimental methods of modeling CD and UC, indexable in refereed sources of Pubmed and Russian science citation index during 2006–2015 years. In addition, the aim is to find out the most reliable experimental model of UC and CD according to the clinical, morphohistological, immunohistochemical and hematological features. There are important requirements to the models, such as simplicity, the quickness and the low cost. There were two main ways of modeling found: the models by using gene knockout mice, its' products have main positions in pathogenesis (STAT4, STAT73, IL-7, CD40+) and the chemically induced models (dextran sulfate natrii, trinitrobenzen sulfonic acid, dinitrobenzene sulfonic acid, acetic acid). Considering all the advantages and disadvantages of the models during the critical analysis, such experimental models as model with using 4 % acetic acid for the UC modeling and a model with using DNBS for the CD modeling were determined.

Keywords: Crohn's disease, ulcerative colitis, inflammatory bowel diseases.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК): язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК) – одна из самых значимых проблем современной гастроэнтерологии. Постоянный рост заболеваемости, инвалидизация населения, а также большая распространенность

подавляющего числа случаев среди трудоспособного населения в возрасте 20–40 лет, делает данную группу заболеваний социально значимой [2]. БК – это рецидивирующее системное воспалительное заболевание, которое может поражать любую часть гастроинтестинального тракта, сопровождаться экстраинтестинальными проявлениями и ассоциированными иммунными нарушениями [16]. ЯК – это хроническое воспалительное заболевание слизистой оболочки толстой кишки неизвестной этиологии с развитием в ней язвенно-некротических изменений, локализованное преимущественно в ее дистальных отделах, поражающее первоначально прямую кишку с последующим распространением в проксимальном направлении и в 10 % случаев захватывающее всю толстую кишку (редко – с рефлюксным леотифлитом); протекает с различными местными и системными осложнениями и внекишечными проявлениями [12].

Распространенность ЯК в мире составляет 4–20 случаев на 100000 населения, в России – 1,7 случаев на 100000 населения. Распространенность БК в мире составляет 2–8 случаев на 100000 населения, в России – 0,3 случая на 100000 населения [1, 2].

Считается, что БК возникает в результате взаимодействия внешних и внутренних факторов. Происходит местное повреждение тканей кишечника и, как следствие, развитие локального воспаления в различных отделах ЖКТ. Генетически детерминированность способности иммунной системы регулировать воспалительные реакции подтверждена установленной связью между системой главного комплекса гистосовместимости (HLA) и БК. Зачастую в основе патогенеза БК лежат иммунные механизмы, которые несут ответственность за состояние эпителиального барьера кишечной стенки. Согласно лимфатической теории, первичные изменения развиваются в лимфатических узлах брыжейки и лимфоидных фолликулов кишечной стенки, что ведет к лимфатическому отеку подслизистого слоя, завершающемуся деструкцией и гранулематозом кишечной стенки [3].

Этиология язвенного колита до конца не изучена. Существует генетическая предрасположенность к НЯК (семейные случаи язвенного колита). Имеются данные о связи НЯК с антигеном DR2 и B27 комплекса гистосовместимости HLA. В патогенезе имеют значение изменения иммуногистологической реактивности, дисбиотические сдвиги, аллергические реакции, генетические факторы, нервно-психические нарушения, большое значение придают аутоиммунизации. Последнее можно подтвердить обнаружением при язвенном колите аутоантител, характером клеточного инфильтрата, который отражает реакцию ГЗТ. Также обнаруживают трофические расстройства в связи с выраженной деструкцией интрамурального нервного аппарата кишки. Активно исследуется роль при ЯК и БК условно-патогенной микрофлоры, которая непрерывно стимулирует иммунную систему кишечника и приводит к возникновению местной аллергической реакции [6, 9, 10, 11, 22].

Отсутствие четких представлений об этиологии и патогенезе ЯК и БК приводит к проблемам в диагностике и в большей степени в лечении ВЗК даже при наличии широкого спектра применяемых лекарственных средств. Течение БК и ЯК приводит к тяжелым осложнениям, в 1,5 раза увеличилась частота формирования патологического процесса в раннем возрасте, появились более тяжелые внекишечные проявления, чаще наблюдается развитие резистентности к традиционной терапии, ранняя инвалидизация пациентов, что требует разработки новых терапевтических подходов [2, 13]. Экспериментальное моделирование патологии человека является актуальной проблемой современной медицины и эффективно используется для разработки новых терапевтических подходов [8]. Для апробации новых лекарственных средств с патогенетически обоснованным механизмом действия возникает необходимость в моделировании ЯК и БК.

**Цель работы** – провести критический анализ данных об известных методах экспериментального моделирования БК и ЯК, индексированных в рецензируемых источниках баз данных Pubmed и Российского индекса научного цитирования за период 2006-2015 гг. Выявить наиболее оптимальную экспериментальную модель ЯК и БК по клинической, морфологической, иммунологической, гематологической картине. Важными требованиями к моделям ЯК и БК являются простота, скорость постановки и низкая стоимость.

**Моделирование ЯК.** Можно выделить два основных подхода при моделировании как ЯК, так и БК.

1. В последние 10–20 лет разработаны экспериментальные модели ВЗК, которые развиваются спонтанно у мышей с определенным генотипом или в результате воздействия на геном (нокаутные, трансгенные мыши) и ассоциированы с утратой иммунной толерантности к аутологичной кишечной микрофлоре.

Утрата компонентов эпителия кишечника (кератин 8-дефицитные мыши), слизи (муцин 2-дефицитные мыши), транспортного белка (мыши с дефицитом гена 1a множественной лекарственной резистентности). ВЗК этой группы развиваются при воздействиях на адаптивную иммунную систему и вызывают активацию эффекторной функции CD4+ Т-лимфоцитов. Одной из таких моделей являются STAT4 трансгенные мыши (STAT4 – фактор транскрипции, который активирует гены иммунного ответа типа Th1 с увеличением продукции IFN- $\gamma$ ). У мышей этой линии после дополнительной активации иммунной системы антигеном гемоцианином через 7–14 дней развивается энтероколит с глубоким трансмуральным воспалением и плотным инфильтратом CD4+ Т-клеток, продуцирующих IFN- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ . Перенос активированных бактериальными антигенами CD4+ Т-клеток этих мышей иммунодефицитным реципиентам вызывал развитие колита.

Другие варианты ВЗК этого типа наблюдаются при стимуляции роста незрелых и зрелых лимфоцитов, их дифференцировки с развитием патогенной эффекторной функции, в частности, при высокой экспрессии ИЛ-7 (ИЛ-7-трансгенные мыши) или лиганда CD40 на лимфоцитах (CD40-лигандтрансгенные мыши), который активирует клетки, несущие рецептор CD40 («наивные» Т-клетки, В-клетки, макрофаги, моноциты) с увеличением продукции провоспалительных цитокинов. В последнем случае развивалось мультиорганное воспаление, включая энтероколит, который воспроизводился при переносе CD4+ Т-клеток от больных мышей [18].

Выключение сигнальных молекул, ведущее к нарушению баланса между про- и противовоспалительными цитокинами (A20-дефицитные мыши, STAT73-/-дефицитные мыши) и др. В течение 5–12 недель у мышей развиваются различные по локализации и тяжести варианты энтероколита или колита с инфильтрацией стенки кишечника иммунокомпетентными клетками (нейтрофилы, CD4+ Т-клетки, В-клетки и др.) и увеличением продукции провоспалительных цитокинов IFN- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-12, хемокинов и их рецепторов [18].

2. Химически индуцированные модели с использованием декстрана сульфата натрия (ДСН), тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) и динитробензолсульфоновой кислоты (ДНБС), 4 % и 10 % уксусной кислоты [14, 15, 20, 23].

Учитывая низкую стоимость и быстроту постановки, химически индуцированные модели являются предпочтительными в экспериментальных исследованиях ВЗК. Безусловно, каждая модель характеризуется рядом ограничений и недостатков наряду с достоинствами и преимуществами, исходя из этого возникает необходимость сравнительного анализа экспериментальных моделей:

2.1. Модель с введением ДСН – одна из наиболее часто используемых при моделировании ЯК у грызунов. Поглощение мышами 3–10 % ДСН, растворенного в питьевой воде, в течение 7–10 дней индуцирует клинические признаки ЯК: потерю веса, кровавую диарею; морфологические признаки: укорочение ободочной кишки, изъязвление слизистой оболочки, уменьшение числа бокаловидных клеток, крипт и их глубины, инфильтрацию лимфоцитами, плазмоцитами и гистоцитами. [15]. Модель достаточно удобна для исследования эффективности лекарственных препаратов, изучения механизмов эпителиальной регенерации, влияния врожденного иммунитета на гомеостаз слизистых оболочек и исследования роли ЯК в развитии интестинальной дисплазии и аденокарциномы.

2.2. Альтернативой использованию ДСН является модель с введением ДНБС. Она подразумевает ректальное введение 100 мг/кг ДНБС, предварительно растворенного в 50 % спирте этиловом, присутствие которого необходимо для улучшения проникновения веществ

через эпителий в собственную пластинку слизистой оболочки кишечника. Данная модель ассоциирована с такими клиническими и морфологическими проявлениями, как кровавая диарея, потеря веса, истончение кишечной стенки, изъязвление слизистой оболочки, уменьшение количества крипт, нейтрофильная инфильтрация. Однако указанные морфологические признаки локализуются преимущественно в дистальном отделе кишечника, что характерно больше для БК, а не для ЯК [15, 19, 23].

2.3. Введение ТНБС при моделировании ЯК очень схоже с моделью с использованием ДНБС. Ректально вводится 100 мг/кг вещества, предварительно растворенного в 50 % спирта этилового. Морфологическая картина модели также более характерна для БК, чем для ЯК [23].

2.4. Следующая модель подразумевает индуцирование ЯК ректальным введением на глубину 8 см 1 мл 4 % уксусной кислоты. Использование уксусной кислоты при моделировании ЯК – один из наиболее широко применяемых методов моделирования. В результате введения уксусной кислоты в полость кишечника наблюдаются клинические признаки: кровавая диарея, потеря веса; морфологические признаки: интенсивный воспалительный ответ, характеризующийся масштабным кровоточением, очаговыми изъязвлениями, истончением кишечной стенки, уменьшением количества крипт, нейтрофильной инфильтрацией [21]. Ректальное введение уксусной кислоты для моделирования ЯК возможно и в 10 % концентрации, но в меньшем объеме – 0,5 мл. В результате наблюдаются клинические признаки интоксикации, диарея с примесью слизи и крови, снижение массы тела животных; морфологические признаки: выраженная гиперемия и отек слизистой оболочки, интенсивные кровоизлияния, многочисленные участки некроза [4].

Однако у рассмотренных нами моделей существует и ряд недостатков:

1. Широкая вариабельность концентраций при пероральном использовании ДСН приводит к невозможности контроля объема поглощенного раствора животными и массы поступившего в ЖКТ ДСН. Это приводит к разнородности повреждений слизистой стенки кишечника по глубине и площади распространения. Следствием является широкий разброс результатов эксперимента.

2. Применение ДНБС и ТНБС воспроизводит клиническую картину ЯК, однако симптомы могут варьировать в зависимости от используемых животных, частоты введения, дозы ДНБС и ТНБС. По всем признакам использование ДНБС и ТНБС лучше воспроизводит БК, а не ЯК [17]. Неоспоримым преимуществом ДНБС и ТНБС по сравнению с ДСН является низкая стоимость.

3. Использование 4 % уксусной кислоты, помимо хорошей воспроизводимости признаков ЯК, удобства и простоты метода, характеризуется доступностью вещества и экономическим преимуществом. Введение 10 % уксусной кислоты приводит к развитию выраженных деструктивных изменений слизистой стенки кишечника, что часто приводит к осложнениям в виде кишечных кровотечений, перфорации стенки и перитониту, что увеличивает частоту летальных исходов.

**Моделирование БК.** Наряду с ЯК БК целесообразно моделировать с использованием химически индуцированных моделей в связи с их доступностью и относительной простотой. Несмотря на схожесть изучаемых патологий, при моделировании БК присутствуют некоторые особенности.

1. Модель с использованием 1–3 % раствора ДСН, растворенного в питьевой воде, поглощаемого животными в течение 7 дней, применима не только для постановки ЯК, но и для БК с характерными клиническими проявлениями: кровавая диарея, потеря веса, морфологическими проявлениями: эрозии слизистой оболочки, уменьшение количества крипт, присутствие большого количества лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов в подслизистой оболочке. Достоинством данной модели является возможность продемонстрировать поверхностные повреждения в острой, хронической стадии и в стадии ремиссии. Однако использование ДНС не позволяет в полной мере воспроизвести морфологические признаки (трансмуральное воспаление и некроз в стенке кишечника) при БК. В этом отношении предпочтительно использование ДНБС или ТНБС [17].

2. Использование ДНБС для моделирования БК подразумевает ректальное введение 15–30 мг вещества, предварительно растворенного в 50 % этаноле через катетер длиной 8 см. Преимуществом является стремительное формирование уже на третьи сутки после введения вещества признаков воспаления, изъязвлений преимущественно в дистальном отделе кишечника, что характерно для БК. Клинические признаки включают потерю веса, кровавую диарею, морфологические признаки – истончение кишечной стенки, изъязвление слизистой оболочки, адгезия кишечника к близлежащим органам (мочевой пузырь), инфильтрация лимфоцитами и нейтрофилами, уменьшение количества крипт, обширный отек в дистальной части кишечника; иммуногистохимически выявляется повышение активности миелопероксидазы в лейкоцитах, инфильтрирующих стенку кишечника. Хотя для всех моделей БК характерно явное проявление разрушений кишечной стенки, Применение ДНБС и ТНБС по сравнению с другими агентами более точно воспроизводит морфологическую картину БК, наблюдаемой у человека. Использование ДНБС в моделировании БК экономически более выгодно в сравнении с ТНБС, что является важным преимуществом при выборе экспериментальной модели [17, 20]. В целом, модель БК с

использованием ТНБС отличается простотой и быстротой проведения эксперимента, может быть использована у разных видов животных (крысы, мыши, свиньи, кролики). Применение ДНБС позволяет более точно рассчитать массу поглощенного вещества, обеспечивает меньший разброс результатов эксперимента, уменьшает разнородность результатов проведенного эксперимента в сравнении с использованием ДНС, а также экономически более выгодно в сравнении с ТНБС [23].

3. ТНБС при моделировании БК вводится ректально в дозе 10 или 30 мг вещества, растворенного в 50 % этаноле, через катетер, длиной 8 см. Максимальный объем вводимого раствора составляет для половозрелой крысы 1 мл. В течение 24, 48, 72 часов после введения вещества наблюдались такие клинические признаки, как потеря веса, кровавая диарея, уменьшение аппетита [5]. Большая потеря веса наблюдалась у животных, которым было введено 30 мг вещества, чем у животных с введением 10 мг [23]. При вскрытии животных на 10 день эксперимента были отмечены морфологические признаки БК: трансмуральное воспаление с макрофагальной инфильтрацией, обширными язвами по всей длине сегмента, контактирующего с веществом (8 см), разрушение тканей; иммуногистохимические признаки: увеличение экспрессии IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ .

Таким образом, наиболее оптимальным подходом для моделирования ЯК является ректальное введение 4 % уксусной кислоты. Наиболее удобным и приемлемым подходом для моделирования БК является ректальное введение ДНБС.

### Список литературы

1. Абдулхаков С.Р., Абдулхаков А.С. Неспецифический язвенный колит: современные подходы к диагностике и лечению // Вестник современной клинической медицины. – 2009. – Т. 2, вып. 1. – С. 32-41.
2. Биологическая терапия воспалительных заболеваний кишечника / В. И. Совалкин [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – №. 3. – С. 83-84.
3. Григорьева Г.А., Мешалкина Н.Ю. Болезнь Крона. – М.: Медицина, 2007. – 184 с.
4. Деркач Н.В., Малоштан Л.Н., Анас Фаттал. Изучение влияния феносина на течение экспериментального язвенного колита у крыс // Медицина и образование в Сибири. – 2015. – №. 3. – С.10.
5. Конович Е.А., Халиф И.Л., Шапина М.В. Иммунопатогенез воспалительных заболеваний кишечника// РЖГТК. – 2013. – Т.23. – № 4. – С.69-78.
6. Морфофункциональное обновление эпителиальных клеток толстой кишки и апудоцитов в патогенезе и прогнозировании течения неспецифического язвенного колита /

- А. М. Осадчук [и др.] // Клиническая медицина. – 2006. – Т. 84, №. 12. – С. 35-39.
7. Неспецифический язвенный колит / Н. Т. Ватугин [и др.] // Архивъ внутренней медицины. – 2015. – №. 4 (24). – С.62.
  8. Осиков М.В., Телешева Л.Ф., Агеев Ю.И. и др. Патофизиологические аспекты изменения и коррекцииврожденного иммунитета при хронической почечной недостаточности // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №. 5. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7450> (дата обращения: 08.08.2016).
  9. Полуэктова Е.А., Ляшенко О.С., Королев А.В. Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2014. – № 5. – С. 42–53.
  10. Рахимова О.Ю., Юрков М.Ю., Митрофанова И.П., Пайзуллаева З.К. Воспалительные заболевания кишечника // Комаров Ф.И., Рапопорт С.И., ред. Руководство по гастроэнтерологии. – М., 2010. – С. 379-408.
  11. Халиф И.Л. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический язвенный колит и болезнь Крона): клиника, диагностика и лечение. – М.: Миклош, 2008.
  12. Циммерман Я.С. Классификация основных гастроэнтерологических заболеваний и синдромов. – 3-е изд. – Пермь: ПГМА, 2012.
  13. Язвенный колит и болезнь Крона у детей: новые подходы к лечению / Э.Н. Федулова [и др.] // Медицинский альманах. – 2008. – №.5. – С. 160.
  14. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium / Ibrahim A. [et al.] // Clin. Nutr. – 2011. – №. 30. – P. 678-687.
  15. Barnett M. Animal Models of Colitis: Lessons Learned, and Their Relevance to the Clinic / M. Barnett, A. Fraser // Ulcerative Colitis – Treatments, Special Populations and the Future. – 2011. – No.2. – P. 161–165.
  16. Baumgart D.C., Sandborn W.J. Crohn's disease // Lancet. – 2012. – №. 380. – P. 590–605.
  17. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis/ Alex, P. [et al.] // Inflamm. Bowel Dis. – 2009. – Vol.15, No.3. – P. 341-352.
  18. Inflammatory Bowel Disease, ed. by SR Targan et al. – UK.: Wiley-Blackwell, 2010. – Ch. 11. – P. 157–170.
  19. Investigation of two models of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats / Marinov V.[et al.] // Trakia Journal of Sciences. – 2015. – Vol. 13, Suppl. 2. – P. 49-54.
  20. Minaiyan M. Effects of extract and essential oil of Rosmarinus officinalis L. on TNBS-induced colitis in rats. / M. Minaiyan, A. Ghannadi, P. AfsharipourMahzouni // Res Pharm Sci. –



2011. – No. 6. – P. 13-21.

21. Morampudi, V. DNBS/TNBS Colitis Models: Providing Insights Into Inflammatory Bowel Disease and Effects of Dietary Fat./ V. Morampudi [et al.] // J. Vis. Exp. – 2014. – №. 84.URL: <http://www.jove.com/video/51297/dnbsnbs-colitis-models-providing-insights-into-inflammatory-bowel> (дата обращения: 06.08.2016).

22. Novel features of the rat model of inflammatory bowel disease based on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced acute colitis / Szalai Z.[et al.] //Acta Biologica Szegediensis. – 2014. – Vol. 58(2). – P. 127-132.

23. Sotnikova R. Efficacy of quercetin derivatives in prevention of ulcerative colitis in rats / R. Sotnikova, V. Nosalova, J. Navarova // Interdisciplinary Toxicology. – 2013. – Vol. 6(1). – P. 9-12.