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

На правах рукописи

#### Тихонов Евгений Александрович

# ВОЗРАСТНАЯ СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА, ИММУННОЙ И ЭНТЕРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У КРЫС ВИСТАР

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

#### **ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научные руководители д.м.н., профессор О.В. Макарова д.б.н., профессор В.А. Голиченков

### ОГЛАВЛЕНИЕ

Введ	ение	4
1.Обзор ли	тературы	12
1.1.	Анатомия и гистофизиология ободочной кишки у крыс	13
1.2.	Микрофлора ободочной кишки	16
1.3.	Пренатальное развитие ободочной кишки	17
1.4.	Постнатальное развитие ободочной кишки	18
1.5.	Изменения состава просветной микрофлоры в разные пер	иоды пост-
	натального развития	21
1.6.	Гистофизиологическая характеристика секреторных клеток	ободочной
	кишки	23
1.7.	Пренатальное развитие секреторных клеток эпителиально	й выстилки
	ободочной кишки	26
1.8.	Возрастные изменения секреторных клеток в разных отдел	ах ободоч-
	ной кишки	28
1.9.	Морфофункциональная характеристика локальной иммунн	ой системы
	ободочной кишки	31
1.10.	Пренатальное развитие локальной иммунной системы	ободочной
	кишки	33
1.11.	Постнатальное развитие локальной иммунной системы	ободочной
	кишки	34
1.12.	Морфофункциональная характеристика энтеральной нервн	ой системы
	ободочной кишки	36
1.13.	Пренатальное развитие энтеральной нервной системы	ободочной
	кишки	39
1.14.	Постнатальное развитие энтеральной нервной системы	ободочной
	кишки	41
2. Материалы и методы50		
2.1	Общая характеристика материала	50
2.2	Методы исследования	51

3. Результа	ты собственных исследований58
3.1	Возрастные изменения структур стенки ободочной кишки
3.2	Морфологическая характеристика эпителиального барьера ободочной
	кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
3.3	Возрастные изменения локальной иммунной системы ободочной
	кишки
3.4	Возрастные изменения гистоархитектоники межмышечного нервного
	сплетения в разных отделах ободочной кишки у крыс Вистар90
4. Обсужде	ение результатов исследования99
Заклі	очение116
Выво	рды118
Спис	ок литературы

#### **ВВЕДЕНИЕ**

#### Актуальность темы исследования

Постнатальное развитие желудочно-кишечного тракта и одного из его отделов толстой кишки - характеризуется структурными изменениями всех оболочек – слизистой, подслизистой основы, мышечной, а также иммунной и энтеральной нервной систем. Литературные сведения о возрастных изменениях толстой кишки у разных видов лабораторных животных фрагментарны и не систематизированы [34, 39, 97]. Необходимость исследования структурных компартментов ободочной кишки в разные возрастные периоды определяется тем, что в ряде работ показана связь многих заболеваний человека, таких как аутизм, болезнь Альцгеймера, Паркинсона, атеросклероз, депрессия, сахарный диабет, ожирение, воспалительные заболевания кишечника со структурно-функциональными нарушениями толстой кишки и изменением состава колонизирующей ее микрофлоры [49, 91, 102]. Кроме того, в последние десятилетия для коррекции состава микрофлоры у людей разных возрастных групп – от новорожденных до стариков – широко используются препараты микробного происхождения – пробиотики, пребиотики, симбиотики и др. Доклиническая оценка этих препаратов проводится, главным образом, на крысах, поэтому необходимо изучение морфофункциональных изменений обо у этого вида лабораторных животных в процессе постнатального развития.

#### Степень разработанности темы исследования

По сравнению с другими органами желудочно-кишечного тракта толстая кишка, функцией которой является абсорбция воды и формирование каловых масс, максимально заселена микрофлорой. Микрофлора, колонизирующая толстую кишку, играет важную роль в регуляции перистальтики, секреции, всасывания, синтезе биологически активных веществ [60]. При нарушении барьерных свойств слизистой оболочки толстой кишки бактерии могут транслоцироваться во внутреннюю среду организма и приводить к развитию воспалительного процесса — острого или хронического колита [6].

Функционирование толстой кишки в физиологических условиях зависит от состояния эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем. Эпителиальный барьер ободочной кишки образован слизью, микрофлорой и эпителиальной выстилкой [60]. Выполняющая функцию иммунной защиты неинкапсулированная лимфоидная ткань ободочной кишки представлена одиночными и агрегированными лимфоидными узелками, диффузно рассеянными межэпителиальными лимфоцитами [20]. Регуляция моторной и секреторной функции ободочной кишки осуществляется энтеральной нервной системой, состоящей двух сплетений - межмышечного и подслизистого [47].

Слизистая оболочка ободочной кишки у новорожденных крыс представлена «ворсинко-подобными структурами» [95]. По сравнению с новорожденными в препубертатном возрастном периоде у крыс происходит увеличение линейных размеров ободочной кишки, формирование крипт, структур иммунной системы, нервных отростков межмышечного нервного сплетения, колонизация желудочно-кишечного тракта бактериальной микрофлорой [70, 126]. Структурные и функциональные особенности проксимального и дистального отделов ободочной кишки у препубертатных, половозрелых и старых крыс в сравнительном аспекте не изучены.

Данные литературы о возрастных изменениях состава просветной микрофлоры в ободочной кишки крыс в литературе отсутствуют.

Эпителиальная выстилка толстой кишки образована колоноцитами и секреторными клетками — бокаловидными и энтероэндокринными. Бокаловидные клетки ободочной кишки секретируют муцины, которые являются основными структурными компонентами кишечной слизи. В зависимости от биохимических свойств концевых участков муцины делятся на нейтральные и кислые, а кислые - на сульфатированные и сиаломуцины [66]. Известно, что у новорожденных крыс в ободочной кишке преобладают сульфатированные и сиаломуцины [98]. Региональные различия и цитофизиологические особенности бокаловидных клеток в период новорожденности у крыс не изучены. У мышей в препубертатном периоде в проксимальном отделе ободочной кишки увеличивается доля нейтральных муцинов, а в

дистальном — не изменяется [51, 116]. У половозрелых крыс бокаловидные клетки в проксимальном отделе ободочной кишки продуцируют, в основном, нейтральные и сиаломуцины, а в дистальном — нейтральные, сульфатированные и сиаломуцины [86]. В этот возрастной период в бокаловидных клетках дистального отдела ободочной кишки выше содержание кислых муцинов, а в проксимальном — нейтральных [19]. По сравнению с половозрелыми у старых крыс отмечено снижение численности бокаловидных клеток [121], но региональные отличия числа этих клеток и содержания в них разных муцинов у старых крыс не изучены.

Около 95% энтероэндокринных клеток в ободочной кишке у человека и лабораторных животных секретируют серотонин, который стимулирует абсорбцию, перистальтику и ускоряет транзит содержимого кишечника [35]. Показано, что у половозрелых крыс количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате кишки выше в проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным [92]. В литературе отсутствуют данные о количестве энтероэндокринных клеток и содержании серотонина в разных отделах ободочной кишки у новорожденных, препубертатных и старых крыс.

Лимфоидная ткань кишечника, выполняющая функцию иммунной защиты, представлена в стенке толстой кишки одиночными и агрегированными лимфоидными узелками [20]. Данные о количестве агрегированных лимфоидных узелков, их площади и числе узелков в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у новорожденных и препубертатных крыс в литературе отсутствуют. У старых крыс структурно-функциональная оценка агрегированных лимфоидных узелков в разных отделах ободочной кишки не проводилась.

Энтеральная нервная система — собственная нервная система желудочно-кишечного тракта - является одним из отделов автономной нервной системы [48]. Известно, что нервная сеть кишечника, представленная двумя крупными сплетениями — межмышечным и подслизистым, у крыс в период новорожденности не сформирована [47]. Сравнительное исследование гистоархитектоники межмышечного

нервного сплетения у новорожденных в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки ранее не проводилось. К препубертатному возрастному периоду у крыс межмышечное нервное сплетение организовано в сеть, которая состоит из ганглиев, соединенных так называемыми «межганглионарными трактами» [124]. По сравнению с периодом новорожденности в препубертатном периоде в ганглиях увеличивается число нейронов и глиальных клеток [81]. Однако остаются неизученными изменения площади, числа ганглиев и их клеточного состава в разных отделах ободочной кишки. Данные литературы об изменении площади и числа ганглиев в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у половозрелых крыс отсутствуют. По сравнению с половозрелыми у старых крыс число ганглиев межмышечного нервного сплетения в ободочной кишки не изменяется, а общее число нейронов и глиальных клеток в них снижается [100]. Однако сведения об изменении площади ганглиев, их клеточного состава в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки отсутствуют.

Таким образом, представленные в литературе сведения о морфофункциональных изменениях ободочной кишки и ее отделов в постнатальном онтогенезе у крыс являются неполными и не систематизированными.

**Цель исследования -** охарактеризовать структурную организацию эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп.

#### Задачи исследования

- 1. Охарактеризовать морфологические изменения ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
- 2. Исследовать состав просветной микрофлоры у крыс Вистар разных возрастных групп

- 3. Определить цитофизиологические особенности бокаловидных клеток в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
- 4. Выявить возрастные изменения популяции энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у крыс Вистар
- 5. Оценить гистофизиологические особенности агрегированных лимфоидных узелков ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар
- 6. Выявить возрастные изменения гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения в разных отделах ободочной кишки у крыс Вистар

**Объект и предмет исследования** — эпителиальный барьер, локальный компартмент иммунной и нервной систем ободочной кишки, их возрастные изменения.

**Теоретической и методологической базой** диссертационного исследования являются научные работы и методические разработки отечественных и зарубежных авторов, посвященные возрастным изменениям эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем ободочной кишки.

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

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

#### Научная новизна

Впервые установлено, что в постнатальном развитии у крыс рост линейных размеров ободочной кишки от новорожденного до препубертатного возрастного периода сопровождается выраженными структурными изменениями эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем, состава бактериальной микрофлоры.

Выявлены возрастные и региональные цитофизиологичекие особенности бокаловидных клеток ободочной кишки. Во всех возрастных группах в дистальном отделе по сравнению с проксимальным их численность больше. В проксимальном отделе

содержание кислых муцинов в бокаловидных клетках снижается к периоду половой зрелости, а нейтральных – к старости.

В процессе постнатального развития у крыс впервые охарактеризован состав основных таксонов просветной микрофлоры, и показано, что он устанавливается у половозрелых животных и сохраняется у старых.

Численность популяции энтероэндокринных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки у крыс увеличивается с возрастом, что коррелирует с повышением содержания серотонина в ободочной кишке и периферической крови. В проксимальном отделе у препубертатных, половозрелых и старых животных энтероэндокринных клеток больше, чем в дистальном, а у новорожденных региональные различия отсутствуют.

С возрастом у крыс увеличивается площадь агрегированных лимфоидных узелков; в дистальном отделе ободочной кишки она выше, чем в проксимальном, и в них больше число лимфоидных узелков.

Сеть межмышечного нервного сплетения у крыс в период от новорожденности до препубертатного становится более разреженной. С возрастом увеличиваются размеры ганглиев, число глиальных клеток в них, а также толщина внутримышечных нервных отростков, но количество последних снижается.

#### Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в работе теоретические данные расширяют и систематизируют существующие представления о возрастных морфологических изменениях ободочной кишки у крыс и могут быть использованы в качестве базовых при планировании и проведении исследований по структурным особенностям индивидуального развития желудочно-кишечного тракта у человека и лабораторных животных. Результаты работы могут быть использованы для разработки новых доказательных подходов к доклинической оценке эффективности бактериальных препаратов с учетом возрастных особенностей, а также включены в программы преподавания на кафедрах биологических и медицинских вузов.

#### Методология и методы исследования

Методологически работа построена на принципах системного анализа комплекса данных. В работе использованы следующие методы: морфологические, анатомические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, иммунофлуоресцентные, морфометрические, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, полимеразная цепная реакция в реальном времени, статистические методы.

#### Положения, выносимые на защиту

- 1. В постнатальном онтогенезе у крыс Вистар наиболее значимые структурнофункциональные изменения ободочной кишки наблюдаются в период от новорожденности до препубертатного.
- 2. В период новорожденности, в отличие от незрелой иммунной и нервной систем, эпителиальный барьер сформирован число бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке и содержание в них сульфомуцинов и сиаломуцинов соответствует другим возрастным периодам, а количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в кишке и крови минимальное
- 3. В препубертатный период в ободочной кишке формируются крипты, структуры межмышечного нервного сплетения, в его ганглиях возрастает число глиальных клеток. По сравнению с другими возрастными периодами количество агрегированных лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки максимальное.
- 4. В периоды половой зрелости и старости отмечаются функциональные изменения эпителиального барьера в бокаловидных клетках снижается содержание муцинов, наиболее устойчивых к действию бактериальных гликозидаз. Состояние иммунной и нервной систем в эти возрастные периоды не изменяется по сравнению с препубертатными животными.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них, воспроизводимостью результатов, использованием совре-

менных адекватных методов исследования, корректным применением статистических методов анализа, критическим анализом результатов исследования в сопоставлении с актуальными литературными данными.

**Материалы диссертации доложены:** на Всероссийской научной конференции «Экологические аспекты морфогенеза» (Воронеж, 2015), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2016), международной конференции «PhD Scientific Days 2017» (Будапешт, 2017).

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

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 научных работ, из них 5 - статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук. 3 публикации - в материалах конференций и съездов.

**Внедрение результатов работы.** Материалы диссертационного исследования используются в преподавании на кафедре эмбриологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 15 российских и 119 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 27 рисунками.

#### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ВОЗРАСТНЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ЧЕЛОВЕКА И ЛАБОРАТОРНЫХ

#### животных

Толстая кишка является одним из важнейших органов желудочно-кишечного тракта и ее морфология подробно изучена у человека и лабораторных животных. Толстая кишка у человека состоит из слепой кишки, червеобразного отростка, ободочной кишки (восходящей, поперечной, нисходящей), сигмовидной и прямой, которая заканчивается анальным отверстием [4]. Червеобразный отросток и сигмовидная кишка у крыс отсутствуют [45]. По данным В. Іасореtta et al. [62], проксимальный «правый» (восходящий, поперечный) и дистальный «левый» (нисходящий) отделы ободочной кишки у млекопитающих отличаются по происхождению, структурным и функциональным характеристикам.

Непереваренные остатки химуса попадают из тонкой кишки в слепую. В ободочной кишке происходит всасывание воды и электролитов из химуса, что приводит к формированию каловых масс [4]. Моторная функция толстой кишки включает проталкивание ее содержимого в каудальном направлении и удаление из организма каловых масс. Этому процессу способствует лубрикант — слизь, секретируемая бокаловидными клетками. В толстой кишке переваривается клетчатка, бактерии синтезируют биологически активные вещества, которые всасываются из просвета в кровь. Через слизистую оболочку толстой кишки выделяется ряд токсических веществ. В эпителиальной выстилке ободочной кишки энтероэндокринные
клетки в ответ на стимулы из внешней и внутренней среды организма выделяют
биогенные амины и пептидные гормоны. Лимфоидная ткань кишечника (gutassosiated lymphoid tissue, GALT), выполняющая функцию иммунной защиты,
представлена в стенке толстой кишки одиночными и агрегированными лимфоидными узелками, межэпителиальными лимфоцитами.

#### 1.1. Анатомия и гистофизиология ободочной кишки у крыс

Данные по анатомии и гистофизиологии ободочной кишки у крыс представлены лишь в нескольких работах [13, 60, 68]. Длина ободочной кишки составляет у крысы и человека 9-11 см и 1,5 м соответственно [60, 68]. Время транзита ее содержимого варьирует у крыс от 5,8 до 15,6, а у человека - от 8 до 72 часов [60]. Кислотность (рН) содержимого ободочной кишки у крыс достигает 6,2, у человека – 6,4, а у мыши – 5,0 [60, 68].

В работе В.М. Петренко [13] описана анатомия ободочной кишки у крыс и указано, что она напоминает «растянутую спираль», образованную 2 петлями — вентральной и дорсальной. В ободочной кишке определяются три части — восходящая (проксимальная), поперечная (медиальная) и нисходящая (дистальная). Длинная и изогнутая восходящая кишка занимает большую часть вентральной ветви ободочной кишки и проходит среди петель тонкой кишки. Короткая и почти прямая поперечная часть подвешена на брыжейке к головке и телу поджелудочной железы. Нисходящая часть представляет дорсальную ветвь ободочной кишки. Сигмовидная кишка у крыс отсутствует и только намечается как слабый вентральный изгиб при переходе ободочной кишки в расширение прямой. Слепая кишка у крысы не имеет червеобразного отростка и представлена изогнутым конусом, тело слепой кишки лежит поперечно на вентральной поверхности петель тонкой кишки [13].

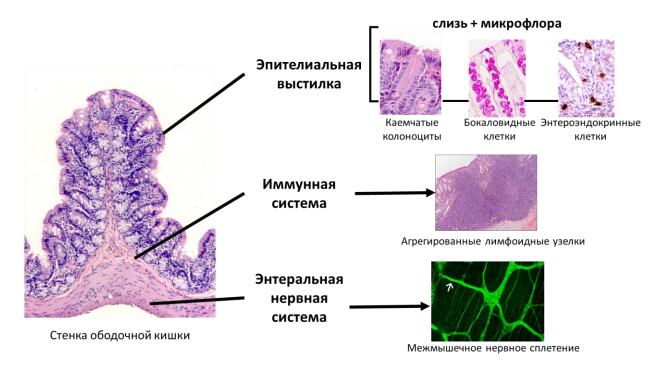


Рисунок 1. Структура стенки проксимального отдела ободочной кишки

Стенка ободочной кишки на всем протяжении образована слизистой оболочкой, подслизистой основой, мышечной и серозной оболочками [4]. В проксимальном отделе ободочной кишки слизистая оболочка и подслизистая основа образуют складки, увеличивающие поверхность ободочной кишки. В дистальном отделе ободочной кишки складки отсутствуют. В обоих отделах слизистой оболочки ободочной кишки содержатся глубокие крипты с узким просветом (рис. 1). По данным В. Іасореtta et al. [62], число крипт у человека и лабораторной крысы больше в проксимальном отделе ободочной кишки, а их глубина - в дистальном.

Слизистая оболочка ободочной кишки у млекопитающих состоит из трех слоев: эпителия, собственной пластинки слизистой оболочки, и мышечной пластинки [87]. Эпителиальная выстилка ободочной кишки представлена одним слоем цилиндрических клеток, среди которых основными типами являются всасывающие колоноциты, бокаловидные и энтероэндокринные клетки [87]. Эпителиоциты связаны между собой комплексом межклеточных контактов, поддерживающих целостность эпителиальной выстилки и препятствующих парацеллюлярному транспорту макромолекул и бактерий. Апикальная поверхность всасывающих колоноцитов — преобладающего типа клеток, образующих выстилку люминальной поверхности

кишки, покрыта плотным слоем гликокаликса, состоящего из трансмембранных гликопротеинов, выполняющих защитную и сенсорную функции. Бокаловидные клетки продуцируют слизь, образующую 2 слоя на поверхности эпителиальной выстилки. Внутренний слой слизи не проницаем для бактерий, внешний — служит субстратом для прикрепления и питания комменсальной микрофлоры [87, 104].

Собственная пластинка слизистой оболочки состоит из расположенной под эпителием рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой содержатся фиброциты, фибробласты, лимфоциты и единичные гистиоциты [4]. В собственной пластинке слизистой оболочки находятся нервные волокна и многочисленные капилляры, оплетающие крипты, а также лимфоидные узелки, которые часто проникают в подслизистую основу, а лимфоциты — в эпителий. Сеть капилляров в проксимальном отделе ободочной кишки многослойная, а в дистальном — однослойная, что связано с большей абсорбцией воды и повышенным транспортом электролитов в проксимальном отделе по сравнению с дистальным [114].

Мышечная пластинка ободочной кишки представлена двумя слоями гладкомышечных клеток. Внутренний (циркулярный) слой образован преимущественно циркулярно расположенными гладкими миоцитами. В наружном (продольном) слое миоциты ориентированы продольно или косо по отношению к оси кишки. Мышечные клетки в этом слое лежат более рыхло, чем во внутреннем [4].

Подслизистая основа - волокнистая соединительная ткань с многочисленными эластическими и коллагеновыми волокнами - содержит лимфатические узелки, элементы подслизистого нервного (Мейсснера), венозного и лимфатического сплетений [4]. Кровоснабжение проксимального и дистального отделов ободочной кишки осуществляется через верхнюю и нижнюю брыжеечную артерии соответственно [62].

Мышечная оболочка ободочной кишки образована двумя слоями гладкой мышечной ткани - внутренним (циркулярным) и наружным (продольным), между которыми располагается прослойка соединительной ткани, содержащая сосудистое

и межмышечное нервное сплетения [14]. Мышечная ткань ободочной кишки формирует так называемый гладкомышечный синцитий, который состоит из гладких миоцитов, интерстициальных клеток Кахаля и эфферентных нервных волокон [8]. Интерстициальные клетки Кахаля осуществляют пейсмейкерную функцию и играют важную роль в моторике ободочной кишки. Межмышечное нервное сплетение представлено ганглиями, состоящими из нейронов, глиальных клеток, и нервных волокон, образованных аксонами нейронов и глиальными клетками [14].

Серозная оболочка представлена тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и выстлана мезотелием.

#### 1.2. Микрофлора ободочной кишки

Микрофлора во многом определяет морфофункциональное состояние иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой ободочной кишки, участвует в регуляции моторики, секреции и всасывания, а также ответственна за выработку биологически активных веществ - нейромедиаторов, витаминов, короткоцепочечных жирных кислот [91]. В проксимальном отделе ободочной кишки в 8 раз выше, чем в дистальном содержание короткоцепочечных жирных кислот, образующихся в результате ферментативных реакций, а микробных метаболитов больше в дистальном отделе [62].

Состав кишечной микрофлоры у крыс близок к таковому у человека. У крыс, также как у человека, преобладают 4 основных таксона бактерий: *Proteobacteria* и *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroides* [80, 103].

Важными представителями таксона Firmicutes являются Bacilli и Clostridia, Lactobacillales и Clostridiales, Lactobacillus, Clostridium, Enteroccocus и Blautia [74]. Внутри таксона Bacteroides преобладают Bacteroidia, Bacteroidales, Bacteroides и Prevotella. В таксоне Proteobacteria — Gammaproteobacteria, Enterobacteriaceaeles, Morganella, а в таксоне Actinobacteria — Actinobacteria, Bifidobacteriales, Bifidobacterium [74].

Показан эффект дисбиотических изменений на состояние толстой кишки. У гнотобиотических мышей с нокаутом по гену, который кодирует ИЛ-10, при колонизации кишечника монокультурой *Enterococcus faecalis* развивается колит в «левом» дистальном отделе ободочной кишки, а колонизация таких мышей монокультурой *Escherichia coli* вызывает острый колит в «правом» проксимальном отделе ободочной кишки [131].

#### 1.3. Пренатальное развитие ободочной кишки

В процессе пренатального развития желудочно-кишечного тракта у всех позвоночных животных происходит преобразование кишечной трубки в сложно устроенный комплекс из полых органов (пищевод, желудок, тонкая и толстая кишка) и их производных (поджелудочная и щитовидная железы, легкие, печень) [1].

Желудочно-кишечный тракт является производным трех зародышевых листков: энто-, мезо- и эктодермы. Материал энтодермы участвует в формировании эпителиальной выстилки полых органов; мезодерма образует гладкомышечный слой, а эпителий ротовой полости и прямой кишки являются производными эктодермы [110].

Ранние этапы пренатального развития желудочно-кишечного тракта у большинства позвоночных сходны, но лучше всего они изучены у курицы [1, 22]. К концу гаструляции передняя часть куриного зародыша начинает приподниматься над желтком, образует карманообразное выпячивание (головную кишку). По мере развития зародыша увеличивается длина головной кишки. Аналогичным образом на противоположном конце зародыша формируется задняя кишка. Затем передняя и задняя кишки смыкаются и образуют кишечную трубку. Материал кишечной трубки формирует эпителий желудочно-кишечного тракта. Мезенхима желудочно-кишечного тракта состоит из клеток-производных боковой пластинки мезодермы. Клетки нервного гребня мигрируют вдоль стенки кишки и образуют ганглии энтеральной нервной системы [23].

По источнику развития желудочно-кишечный тракт у млекопитающих можно условно разделить на переднюю, среднюю и заднюю кишки. Из передней кишки формируются глотка, пищевод, желудок; из средней - тонкая кишка, проксимальный отдел ободочной кишки, а из задней - дистальный отдел ободочной кишки и прямая кишка [110].

#### 1.4. Постнатальное развитие ободочной кишки

Постнатальное развитие ободочной кишки сопровождается увеличением ее линейных размеров, формированием слизистой оболочки, колонизацией бактериальной микрофлорой, формированием иммунной и энтеральной нервной систем [38, 61].

Изучение ободочной кишки в период новорожденности проводилось у человека и лабораторных животных [38, 95, 134]. В этот возрастной период ободочная кишка у человека и крысы характеризуется наименьшей длиной, шириной просвета, толщиной ее стенки [31, 38]. Однако, у крыс по сравнению с человеком структуры ободочной кишки окончательно не сформированы [38]. У новорожденных крыс в слизистой оболочке ободочной кишки формируются так называемые «ворсинко-подобные структуры» («villus-like structure»), которые исчезают к препубертатному возрастному периоду [38, 130, 134]. Эти «структуры» у новорожденных крыс обнаруживаются только в проксимальном отделе ободочной кишки и их роль связана с повышенной абсорбцией воды и питательных веществ из просвета кишки [95]. Мышечная пластинка слизистой оболочки у новорожденных крыс, в отличие от человека, не выражена [38]. В подслизистой основе у человека в этот возрастной период выявляются многочисленные агрегированные лимфоидные узелки, ганглии энтеральной нервной системы [30, 118]. В отличие от человека у крыс подслизистый слой ободочной кишки в этот возрастной период не содержит агрегированных лимфоидных узелков, энтеральная нервная система не сформирована [68]. Мышечная оболочка ободочной кишки у новорожденных крыс, в отличие

от человека, не разделена на слои, и состоит из недифференцированных клеток мезенхимы [112].

Данные литературы об отличиях проксимального и дистального отделов ободочной кишки у крыс в период новорожденности не содержат информации о толщине слизистой оболочки, собственной пластинки слизистой оболочки, мышечной оболочки в проксимальном отделе по сравнению с дистальным.

Изучение ободочной кишки в препубертатном возрастном периоде проводилось у человека, крысы и собаки [38, 86, 127]. В этот возрастной период у человека и крыс наблюдается интенсивный рост ободочной кишки, который сопровождается увеличением ее длины, ширины просвета ободочной кишки, толщины ее стенки [86]. По сравнению с новорожденными у крыс в препубертатном возрастном периоде происходит колонизация кишечника бактериальной микрофлорой, значительно увеличивается толщина слизистой оболочки, количество крипт и их глубина [38]. По сравнению с дистальным в проксимальном отделе ободочной кишки много складок [123]. Данные литературы о взаимосвязи количества крипт и их глубины в препубертатном возрастном периоде у крыс отсутствуют. В подслизистой основе у крыс выявляются агрегированные лимфоидные узелки, сеть подслизистого нервного сплетения уже сформирована [78]. В литературе отсутствуют сведения об изменении толщины мышечной оболочки у крыс в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у препубертатных крыс, но известно, что у собак в этот период увеличение толщины мышечной оболочки обусловлено возрастанием числа гладких миоцитов и их размеров [127].

По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых крыс ободочной кишки находится в состоянии регулярной моторики, устойчивого функционального состояния иммунной системы [60]. Данные литературы о морфологических изменениях разных отделов ободочной кишки у крыс в период половой зрелости отсутствуют.

Морфологические исследования ободочной кишки в период старости проводились на аутопсийном материале у человека, крыс и собак [24, 27]. По сравнению с

половозрелыми у старых крыс ободочной кишки функционирует на фоне снижения защитной функции иммунной системы, замедления моторики. В этот возрастной период увеличивается толщина мышечной оболочки у крыс и собак [24, 27]. По данным цитофизиологического исследования, показано, что гладкие миоциты ободочной кишки у старых крыс (32 месяца) сокращаются в 2 раза хуже, чем у половозрелых (12 месяцев) животных [27, 73]. По данным гистохимического окрашивания пикросириусом красным с детекцией в поляризованном свете установлено, что в мышечной оболочке ободочной кишки у старых крыс выше содержание коллагеновых и эластических волокон, что снижает сократимость стенки кишки [27]. В литературе отсутствуют данные морфологических исследований о структурных особенностях проксимального и дистального отделов ободочной кишки у старых крыс.

Таким образом, известно, что у новорожденных крыс в слизистой оболочке ободочной кишки формируются и вскоре исчезают так называемые «ворсинко-подобные структуры» («villus-like structure»). Мышечная пластинка слизистой оболочки в этот возрастной период не выражена. Данные литературы об отличиях проксимального и дистального отделов ободочной кишки у крыс в период новорожденности не содержат информации о толщине слизистой оболочки, собственной пластинки слизистой оболочки, мышечной оболочки в проксимальном отделе по сравнению с дистальным. Известно, что в препубертатном возрастном периоде у крыс происходит увеличение линейных размеров ободочной кишки, формирование слизистой оболочки, колонизация желудочно-кишечного тракта бактериальной микрофлорой, формирование иммунной и энтеральной нервной систем. Однако, в литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи числа крипт и их глубины в слизистой оболочке, о толщине мышечной оболочки в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у препубертатных крыс. По данным литературы, у половозрелых крыс ободочной кишки находится в состоянии регулярной моторики, устойчивого состояния иммунной системы. Данные литературы о морфологических изменениях разных отделов ободочной кишки у крыс в этот возрастной период отсутствуют. Известно, что у старых крыс ободочной кишки функционирует на фоне снижения защитной функции иммунной системы, замедления моторики. В этот возрастной период у крыс увеличивается толщина мышечной оболочки ободочной кишки, снижается ее сократительная способность. Однако, отсутствуют данные литературы об изменениях толщины слизистой оболочки, собственной пластинки слизистой оболочки, мышечной оболочки в проксимальном отделе по сравнению с дистальным у крыс в период старости.

## 1.5. Изменения состава просветной микрофлоры в разные периоды постнатального развития

Толстая кишка и, в особенности, ее отдел - ободочная кишка - характеризуется наибольшим количеством и разнообразием бактерий в организме. Изучение состава просветной микрофлоры в разные периоды постнатального развития проводилось у человека, свиней, собак и мышей [32, 91, 126].

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени было показано, что у детей, рожденных в результате естественных родов в меконии преобладают бактерии Lactobacillus, Prevotella и Atopobium, а у рожденных при помощи кесарева сечения - Staphylococcus [91]. Методом подсчета числа колоний просветной микрофлоры ободочной кишки у новорожденных свиней было показано, что в период новорожденности происходит замена аэробных бактерий и факультативных анаэробов (колиморфных бактерий) на облигатных анаэробов (Clostridium spp.) [117]. Тем же методом установлено, что у новорожденных собак породы Бигль наименьшее число колоний Lactobacilli и Bacteroides [32].

По сравнению с новорожденными у людей в препубертатном возрастном периоде состав фекальной микрофлоры не изменяется [32, 91]. В течение подсосного периода у свиней в составе просветной микрофлоры ободочной кишки появляются другие анаэробы, включая *Bifidobacteria*, *Eubacteria*, *Fusobacteria*, *Propionobacteria*, анаэробные *Streptococcus*, но снижается число колоний *Clostridia* [117]. У пре-

пубертатных собак повышается количество колоний *Lactobacilli* и *Bacteroides*, а количество *Enterobacteriaceae* — не изменяется [32]. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени было показано, что у гнотобиотических мышей через 2 недели после колонизации желудочно-кишечного тракта бактериальная микрофлора непосредственно контактирует с эпителием ободочной кишки и в ее составе преобладают *Firmicutes*, а через 6 недель — *Bacteroides*, и к этому сроку формируется слой слизи, непроницаемый для бактерий [121].

По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых мужчин снижается количество колоний *Bifidobacteria* и *Clostridia*; а *Bacteroides* - увеличивается [17]. По данным гистохимического исследования в период половой зрелости у мужчин в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным больше толщина слизи и общее количество бактерий [62, 82]. В этот возрастной период у свиней количество колоний *Bacteroides* максимально [117]. У половозрелых собак количество колоний *Enterobacteriaceae* снижается, *Lactobacilli* — увеличивается, а *Bacteroides* — не изменяется [32].

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени было показано, что у лиц пожилого возраста наблюдается снижение числа видов *Bacteroides* и увеличение *Firmicutes*, а также сокращается число видов *Bifidobacteria* у лиц старше 60 лет, когда отмечается возрастное снижение функции иммунной системы [79].

Таким образом, данные литературы о возрастных изменениях состава просветной микрофлоры в ободочной кишки у крыс в литературе отсутствуют. Однако известно, что у человека, свиней и собак эти показатели значительно варьируют, но они не соотнесены с цитофизиологическими особенностями эпителиального барьера и слизи, которая вместе с кишечными бактериями образует биопленку.

### 1.6. Гистофизиологическая характеристика секреторных клеток ободочной кишки

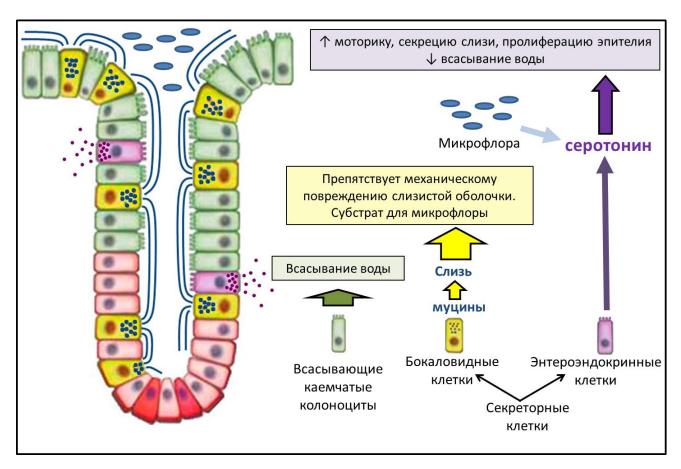


Рисунок 2. Структура эпителиального барьера ободочной кишки

Эпителиальная выстилка ободочной кишки характеризуется наличием секреторных клеток двух типов: бокаловидных и энтероэндокринных клеток, которые являются основным источником слизи, биогенных аминов и пептидных гормонов желудочно-кишечного тракта (рис. 2). Гистофизиологические особенности секреторных клеток в разных отделах ободочной кишки у крысы изучены недостаточно.

Бокаловидные клетки продуцируют слизь, которая препятствует адгезии и инвазии микроорганизмов, служит субстратом для прикрепления и питания комменсальной микрофлоры, выступает в качестве смазки, облегчая прохождение химуса по кишечнику [40]. Основными структурными компонентами слизи являются муцины. Муцины — это высоко гликозилированные гликопротеины, состоящие из белковой оси (апомуцина) и множества О-связанных с ней олигосахаридных цепей

[6]. Характерной особенностью строения муцинов является наличие тандемных повторов с высоким содержанием пролина (P), треонина (T) и серина (S) – PTS-области. Их также называют муциновыми доменами или VNTR (Variable Number Tandem Repeats). Эти регионы в зрелых муцинах обильно О-гликозилированы. Изза обильного гликозилирования муциновые домены приобретают жесткую вытянутую структуру, напоминающую «щетку для бутылок» [66]. По структурно-функциональным особенностям выделяют два типа муцинов: секреторные и мембрано-ассоциированные. Большинство секреторных муцинов характеризуется высокой молекулярной массой, большой долей углеводов (50-80% молекулярной массы), они олигомеризуются и формируют трехмерные сети. Мембранно-ассоциированные муцины встроены в плазматические мембраны клеток и существуют в мономерной форме. Мембранно-ассоциированные муцины содержат трансмембранные домены, сайты расщепления, и участвуют в передаче клеточных сигналов [6]. Именно углеводы определяют основные физико-химические свойства зрелых муцинов [65]. Гликаны муциновых доменов связывают большое количество воды, придавая муцину гелеобразные свойства. На основе биохимических свойств периферических регионов гликанов, муцины делятся на нейтральные и кислые, а кислые на сульфатированные (сульфомуцины) и несульфатированные (сиаломуцины) [6]. В ободочной кишки в физиологических условиях преобладают кислые муцины, которые лучше, чем нейтральные, защищают от бактериальной транслокации, так как первые, особенно сульфатированные, менее подвержены разрушению бактериальными гликозидазами [40].

Слизь формирует 2 слоя: внутренний и внешний [65]. Внутренний слой слизи плотный, не проницаем для бактерий. В дистальном «левом» отделе толстой кишки у человека он имеет толщину около 200-300 мкм, а у крысы и мыши - 100 и 50 мкм соответственно [65]. Внешний слой слизи более рыхлый, обильно заселен бактериями. Он образуется в результате частичной деградации и разрыхления муциновой сети внутреннего слоя слизи. Этот процесс обеспечивается, во многом, собственными протеазами кишечника, и наблюдается у мышей без кишечной микрофлоры, а ингибиторы протеаз предотвращают образование внешнего слоя слизи. Между

внутренним и внешним слоями наблюдается резкая граница. Углеводы муцинов используются комменсальными бактериями в качестве источника питания [65].

Наряду с бокаловидными клетками к секреторным клеткам ободочной кишки относятся энтероэндокринные клетки. Энтероэндокринные клетки – клетки с узкой апикальной частью и широкой базальной, в которой локализованы секреторные гранулы. Они составляют около 1% эпителиальных клеток ободочной кишки. В ответ на стимулы из внешней и внутренней среды организма энтероэндокринные клетки выделяют биогенные амины и пептидные гормоны, реализуя широкий диапазон биологических реакций. Основными типами энтероэндокринных клеток толстой кишки являются ЕС-, L- и D-клетки [57].

Энтерохромаффинные (Enterochromaffine-, EC-) клетки - наиболее распространенный тип энтероэндокринных клеток в желудочно-кишечном тракте. ЕСклетки у человека секретируют до 90-95% серотонина (5-hydroxytryptamine, 5-HT), который поступает в кровь и депонируется тромбоцитами [12]. Серотонин относится к группе биогенных аминов и обладает широким спектром биологических функций. В ободочной кишки он ускоряет перистальтику и стимулирует секрецию слизи, всасывание воды [35]. Синтез серотонина энтероэндокринными клетками происходит из предшественника 5-HTP (5-hydroxitryptophan) при участии фермента триптофан гидроксилазы-1 (tryptophan hydroxylase-1, Tph1). Под действием фермента моноаминооксидазы серотонин в энтероэндокринных клетках и в клетках-мишенях способен метаболизироваться до 5-гидроксииндолилуксусной кислоты (5-hydroxiindolilacetic acid, 5-HIAA) [58]. Наряду с ЕС-клетками значительная часть серотонина в ободочной кишки вырабатывается нейронами энтеральной нервной системы [53]. В исследовании in vitro показано, что некоторые представители бактерий (Enterococcus faecalis, Rhodospirillum rubrum, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus) способны синтезировать серотонин путем декарбоксилирования триптофана [119]. Другие бактерии увеличивают синтез серотонина в энтероэндокринных клетках, повышая в них активность фермента триптофан гидроксилазы-1

(tryptophan hydroxylase-1, Tph1) [131]. В плазме крови у гнотобиотических аутбредных мышей Swiss Webster содержание серотонина в 2,8 раза ниже, чем у конвенциональных [128].

L-клетки — вторые по численности энтероэндокринные клетки толстой кишки. Их количество увеличивается в дистальном направлении, и в прямой кишке они составляют примерно 14% энтероэндокринных клеток. Секреторными продуктами этих клеток являются энтероглюкагоны (глюкагоноподобные пептиды 1 (GLP-1) и 2 (GLP-2), глицентин и оксинтомодулин) и пептид YY [57].

D-клетки встречаются на протяжении всего желудочно-кишечного тракта, в толстой кишке они составляют 3-5% энтероэндокринных клеток. Их основной секреторный продукт — соматостатин — гормон, подавляющий экзокринную функцию и секрецию всех гормонов желудочно-кишечного тракта [57].

### 1.7. Пренатальное развитие секреторных клеток эпителиальной выстилки ободочной кишки

Изучение пренатального развития секреторных бокаловидных клеток проводилось у человека, мышей и крыс [44, 83, 129].

По данным гистохимического исследования было показано, что у человека бокаловидные клетки в ободочной кишки появляются на 14 неделе пренатального развития, и продуцируют исключительно кислые сульфатированные муцины. Позднее (на 23 неделе) появляются бокаловидные клетки, в секрете которых обнаруживаются кислые несульфатированные сиаломуцины [44].

По данным иммуногистохимического исследования было установлено, что у мышей в процессе пренатального развития секреторные бокаловидные и энтероэндокринные клетки эпителия слизистой оболочки ободочной кишки имеют общий энтодермальный источник развития, и являются производными *Math1*-позитивной мультипотентной стволовой клетки в базальном отделе крипт [110]. Выбор направления дифференцировки клетки-предшественника в сторону бокаловидных или энтероэндокринных клеток осуществляется под контролем Notch-сигнального пути.

Транскрипционный фактор Klf4 является маркером дифференцировки бокаловидных клеток, а клеточный фенотип Gfi1/Ngn3/NeuroD соответствует предшественнику энтероэндокринных клеток [83]. В индивидуальном развитии ободочной кишки у мышей первыми появляются пептид YY- (на 15,5 сутки пренатального развития), а затем глюкагон- (16,5 сутки пренатального развития) -иммунореактивные энтероэндокринные клетки. В период 17,5 - 18,5 сутки пренатального развития в ободочной кишке у мышей появляются холецистокинин-, серотонин-, субстанция Р-, секретин-, нейротензин-, гастрин-, и соматостатин - иммунореактивные энтероэндокринные клетки [120].

В индивидуальном развитии бокаловидных клеток у крыс обнаруживаются сначала в дистальном отделе на 19 сутки пренатального развития, а затем в проксимальном — на 20 суток пренатального развития [129]. На 20 сутки пренатального развития в бокаловидных клетках в обоих отделах ободочной кишки преобладают кислые несульфатированные муцины, которые замещаются кислыми сульфатированными муцинами в глубине крипт на 21 сутки пренатального развития. Нейтральные муцины у крыс преобладают в эпителиальной выстилке просвета ободочной кишки к периоду новорожденности [29].

По данным иммуногистохимического исследования энтероэндокринные клетки в ободочной кишки у человека появляются на 8-12 неделе внутриутробного развития, но в проксимальном отделе ободочной кишки они отсутствуют до 10-12 недель [43, 76]. Количество энтероэндокринных клеток у человека непрерывно увеличивается в период интенсивного роста ободочной кишки с 12 по 28 недель пренатального развития [43]. В том же исследовании показано, что во внутриутробном периоде развития у человека количество энтероэндокринных клеток в проксимальном отделе больше, чем в дистальном [43].

### 1.8. Возрастные изменения секреторных клеток в разных отделах ободочной кишки

Бокаловидные клетки продуцируют два слоя слизи: внешний и внутрений. Кишечная слизь состоит из муцинов. По физико-химическим свойствам выделяют

нейтральные, кислые сульфатированные и сиаломуцины [35]. Изучение возрастных изменений бокаловидных клеток в разных отделах ободочной кишки проводилось у человека, крыс и мышей [44, 86].

По данным гистохимического исследования было показано, что у человека в период новорожденности в ободочной кишки преобладает секреция кислых сульфатированных и несульфатированных муцинов [44]. У новорожденных крыс бокаловидные клетки преимущественно секретируют кислые высокосульфатированные и сиаломуцины [29]. Региональные различия бокаловидных клеток и толщины слизи в период новорожденности у крыс не изучены.

У человека препубертатного возрастного периода по сравнению с новорожденными детьми различия по числу бокаловидных клеток и составу муцинов в них отсутствуют [44]. У препубертатных мышей по сравнению с новорожденными в проксимальном отделе ободочной кишки увеличивается доля нейтральных муцинов, а в дистальном — не изменяется [41]. Данные литературы о различиях бокаловидных клеток и толщины слизи в разных отделах ободочной кишки у препубетатных крыс отсутствуют.

По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых мужчин возрастные изменения числа бокаловидных клеток и толщины слизи в ободочной кишки отсутствуют [44]. По данным гистохимического исследования, у человека в дистальном отделе ободочной кишки толщина слизи и количество бактерий больше, чем в проксимальном [82]. У половозрелых крыс по сравнению с препубертатными животными увеличивается толщина слизи, и этот показатель больше в проксимальном отделе, чем в дистальном [86]. Кишечная слизь у половозрелых крыс и мышей в проксимальном отделе ободочной кишки содержит, в основном, нейтральные и кислые сиаломуцины, а в дистальном — нейтральные муцины, кислые сульфатированные и сиаломуцины. Содержание кислых муцинов в бокаловидных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении, а нейтральных клеток у мышей и крыс увеличивается в дистальном направлении и клеток у мышей и крыс учеличивается в дистальном направлении и клеток учеличивается в дистальном направлении и клеток учели и клеток учели и клеток учели и клеток учели и к

ных муцинов, наоборот, снижается [107]. Данные литературы о числе бокаловидных клеток у половозрелых крыс в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки в литературе отсутствуют.

У лиц пожилого возраста по сравнению с половозрелыми мужчинами не изучены изменения числа бокаловидных клеток, состава муцинов в них, толщины слизи в разных отделах ободочной кишки. По сравнению с половозрелыми у старых крыс снижается количество бокаловидных клеток и толщина слизи в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки [86]. Сравнительного исследования региональных различий числа бокаловидных клеток и состава муцинов в них у старых крыс не проводилось.

Таким образом, известно, что у новорожденных крыс в ободочной кишки преобладают кислые сульфатированные и сиаломуцины. Региональные различия бокаловидных клеток и толщины слизи в период новорожденности у крыс не изучены. Данные литературы о различиях бокаловидных клеток и толщины слизи в разных отделах ободочной кишки у препубертатных крыс отсутствуют, однако известно, что у препубертатных мышей в проксимальном отделе ободочной кишки увеличивается доля нейтральных муцинов, а в дистальном — не изменяется. У половозрелых крыс увеличивается толщина слизи, которая в проксимальном отделе ободочной кишки состоит, в основном, из нейтральных и кислых сиаломуцинов, а в дистальном — из нейтральных, кислых сульфатированных и сиаломуцинов. Содержание кислых муцинов в бокаловидных клетках у крыс больше в дистальном отделе ободочной кишки, а нейтральных муцинов — в проксимальном. В литературе отсутствуют данные о числе бокаловидных клеток в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки.

Энтероэндокринные клетки у человека и лабораторных животных продуцируют до 90-95% серотонина, который поступает в кровь и депонируется тромбоцитами [12]. Серотонин относится к группе биогенных аминов и обладает широким спектром биологических функций. В ободочной кишки он ускоряет перистальтику

и стимулирует секрецию слизи, тормозит всасывание воды [35]. Изучение возрастных изменений энтероэндокринных клеток ободочной кишки проводилось у буйволов, опоссумов, крыс и мышей [77].

В период новорожденности у буйволов (water buffalo, подотряд Жвачные) и опоссумов (opossum, класс Сумчатые) энтероэндокринные клетки в ободочной кишки малочисленны [71, 77]. Данные литературы о количестве энтероэндокринных клеток в разных отделах ободочной кишки у новорожденных крыс отсутствуют.

По сравнению с новорожденными у препубертатных буйволов, опоссумов и мышей количество энтероэндокринных клеток ободочной кишки увеличивается [71, 77]. Данные литературы о количестве энтероэндокринных клеток в разных отделах ободочной кишки у препубертатных крыс отсутствуют.

По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых буйволов количество энтероэндокринных клеток в ободочной кишки снижается, а у опоссумов и мышей – продолжает увеличиваться [71, 77]. По данным исследования с применением иммуногистохимического и хроматографического методов установлено, что у половозрелых крыс в проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки выше [92].

По данным иммуногистохимического исследования, у старых мышей по сравнению с половозрелыми больше число энтероэндокринных клеток [69]. Данные литературы о количестве энтероэндокринных клеток в разных отделах ободочной кишки у старых крыс отсутствуют.

Таким образом, в литературе отсутствуют данные о количестве энтероэндокринных клеток и содержании серотонина в разных отделах ободочной кишки у новорожденных, препубертатных и старых крыс, однако известно, что у опоссумов и мышей число этих клеток увеличивается к периоду половой зрелости, а у буйволов - снижается после препубертатного периода. У половозрелых крыс в проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки выше.

## 1.9. Морфофункциональная характеристика локальной иммунной системы ободочной кишки

Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками желудочно-кишечного тракта и одного из его отделов - толстой кишки, содержит иммунокомпетентные клетки, обеспечивающие афферентное (индуктивное) и эфферентное звенья иммунного ответа [15].

Афферентное звено выполняет функцию "первичной обработки" антигенов, поступающих из просвета органа, и их презентации Т-лимфоцитам при помощи главного комплекса гистосовместимости II типа (рис. 3). Оно представлено неинкапсулированной лимфоидной тканью (агрегированными и одиночными лимфоидными узелками), регионарными лимфатическими узлами. Эфферентное звено мукозального иммунного ответа представлено диффузно рассеянными лимфоцитами в слизистой оболочке, включающими все эффекторные субпопуляции клеток — цитотоксические и хелперные Т-лимфоциты, плазмоциты, активированные макрофаги [64]. Цитотоксические Т-лимфоциты локализуются в эпителиальном слое, а остальные эффекторные клетки — в собственной пластинке слизистой оболочки.

Трансэпителиальный транспорт антигенов из просвета ободочной кишки во внутреннюю среду организма осуществляют специализированные М-клетки (Microfold-cells). Эти клетки входят в состав фолликул-ассоциированного эпителия, который выстилает внутреннюю поверхность слизистой оболочки над зонами расположения одиночных или агрегированных лимфоидных узелков. Микроворсинки этих клеток увеличивают площадь поглощающей поверхности. М-клетки лишены слоя слизи, покрывающего другие эпителиальные клетки слизистых оболочек. Маркером М-клеток является рецептор лектина улитки европейской I (Ulex

ешгорецs) — UEAR1. Непосредственно к М-клеткам примыкает купол агрегированных или одиночных лимфоидных узелков — пространство, в котором расположены преимущественно Т- и В-клетки памяти. В состав агрегированных лимфоидных узелков входят лимфоидные узелки, тимусзависимые зоны и участки совместной локализации Т- и В-клеток [94]. Основные отличия агрегированных лимфоидных узелков от лимфатических узлов состоят в отсутствии капсулы и наличии купола агрегированных лимфоидных узелков, расположенного непосредственно под слоем М-клеток. Купол агрегированных лимфоидных узелков содержит дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты, и предназначен для "первичной обработки" антигенного материала [94]. Дендритные клетки поглощают антигены и представляют их Т-лимфоцитам.

Важную роль в защите слизистой оболочки ободочной кишки от кишечных инфекций играет секреторный IgA, который продуцируют плазмоциты собственной пластинки слизистой оболочки ободочной кишки в форме димера. Он попадает в клетки эпителия и высвобождается в просвет кишечника. Секреторный IgA способен осуществлять активацию комплемента, опсонизацию антигенов, препятствует адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам ободочной кишки [94].

В собственной пластинке слизистой оболочки ободочной кишки у мышей и крыс обнаружены небольшие клеточные агрегаты - криптопатчи (cryptopatches), которые состоят из клеток-индукторов (Т-лимфоцитов с фенотипом c-kit+IL7R+Thy1+) и лимфо-гематопоэтических (LFA1+) прогениторных клеток [63]. В процессе развития в зонах локализации клеток-индукторов (Lymphoid-tissue inductor, LTi) образуются лимфоидные узелки [42].

Эфферентный отдел локальной иммунной системы ободочной кишки представлен исключительно диффузной лимфоидной тканью. Ее клеточный состав различается в эпителиальной выстилке и в собственной пластинке слизистой оболочки [15]. Клетки эфферентного звена локальной иммунной системы в эпителиальной выстилке представлены межэпителиальными Т-лимфоцитами, которые относятся к клеткам памяти (активированные лимфоциты). Активация межэпителиальных

лимфоцитов происходит в процессе их созревания в тимусе в присутствии как собственных антигенов организма, так и при контакте с чужеродными антигенами просветной микрофлоры [37]. Присутствие этих клеток обеспечивает защитные иммунные реакции на поверхности слизистых оболочек. Межэпителиальные лимфоциты проявляют чрезмерную цитотоксичность, что может приводить к возникновению и обострению воспалительных заболеваний кишечника. Клеточный состав эфферентного звена локальной иммунной системы в собственной пластинке слизистой оболочки более разнообразный, и представлен В- и Т-лимфоцитами, NK-клетками, макрофагами, дендритными клетками, нейтрофилами, эозинофилами и тучными клетками. Особенность популяции эффекторных В-лимфоцитов подслизистого слоя, а также агрегированных лимфоидных узелков, состоит в преобладании IgA-позитивных клеток [15]. Соотношение субпопуляций Т-клеток в подслизистом слое близко к таковому в крови и лимфатических узлах.

### 1.10. Пренатальное развитие локальной иммунной системы ободочной кишки

В литературе отсутствуют данные о ранних этапах пренатального развития агрегированных лимфоидных узелков в ободочной кишки, но они подробно изучены в тонкой кишке у мыши. Пренатальное развитие агрегированных лимфоидных узелков в тонкой кишке начинается с колонизации ее стенки гематопоэтическими клетками (12,5E). Среди них есть популяция клеток-индукторов лимфоидной ткани  $CD45^+IL7R\alpha^-CD4^-CD3^-CD11c^+$ , которые экспрессируют рецептор тирозинкиназы RET. Взаимодействие этих клеток с RET-лигандом приводит к активации элементов стромы и накоплению клеток-индукторов (hematopoietic-derived lymphoid tissue inducer, LTi). На следующем этапе пренатального развития (15,5-17,5 сутки пренатального развития) взаимодействие трансмембранных молекул  $LT\alpha_1\beta_2$  на клеткахиндукторах с рецепторами  $LT\beta R$  на поверхности стромальных клеток запускает синтез хемокинов, ростовых факторов (IL7, CXCL13 и др.) [20]. Под действием этих сигналов накапливаются клетки-индукторы и формируется самоподдерживающийся зачаток агрегированных лимфоидных узелков [16]. Инактивация генов

СХСL13 и LTβR в экспериментах *in vivo* у мышей препятствует развитию агрегированных лимфоидных узелков. В течение завершающего этапа морфогенеза (17,5 сутки пренатального развития) лимфоциты из периферической крови проникают в развивающийся зачаток агрегированных лимфоидных узелков и заполняют Т- и В-клеточные ниши [63].

### 1.11. Постнатальное развитие локальной иммунной системы ободочной кишки

Неинкапсулированная лимфоидная ткань ободочной кишки представлена агрегированными и одиночными лимфоидными узелками, диффузно рассеянными лимфоидных фоцитами. Индивидуальное развитие агрегированных и одиночных лимфоидных узелков начинается в пренатальном периоде и продолжается в постнатальном. Изучение постнатального развития агрегированных и одиночных лимфоидных узелков в ободочной кишки проводилось у человека, коров, мышей, крыс [3, 20].

По данным анатомического исследования, в период новорожденности у детей обнаруживаются многочисленные агрегированные лимфоидные узелки в ободочной кишки [3]. В этот возрастной период общее число одиночных лимфоидных узелков и плотность их распределения в стенке толстой кишки у грудных детей выше, чем у взрослых в 2,1 и 3,3 раза, соответственно [3]. В период новорожденности у мышей агрегированные лимфоидные узелки в ободочной кишки обнаруживаются в виде скоплений клеток-индукторов лимфоидной ткани CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>RORγ<sup>+</sup> в собственной пластинке слизистой оболочки [20]. Данные литературы о различиях агрегированных лимфоидных узелков в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у новорожденных крыс отсутствуют.

У детей в возрастной группе от 7 до 13 лет количество лимфоидных узелков в толстой кишке постепенно снижается [3]. В подсосном возрастном периоде у мышей в зачатках агрегированных лимфоидных узелков отмечается инфильтрация В-и Т-лимфоцитами, которые сначала располагаются хаотично, а затем формируют В- и Т-клеточные зоны, которые увеличиваются до макроскопически различимых размеров [20]. Данные литературы о количестве агрегированных лимфоидных

узелков в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у людей и лабораторных животных в препубертатный возрастной период отсутствуют.

По сравнению с новорожденными у половозрелых крыс количество одиночных лимфоидных узелков на единицу площади ободочной кишки снижается [86]. У крыс и мышей количество агрегированных лимфоидных узелков и число узелков в них в проксимальном отделе ободочной кишки не отличается от дистального [84, 93]. Встречаются группы людей как с преобладанием агрегированных лимфоидных узелков в проксимальном «правом», дистальном «левом», так и с диффузным их распределением в обоих отделах ободочной кишки [72].

По сравнению с периодом половой зрелости у старых крыс количество агрегированных лимфоидных узелков и их площадь не изменяются [86]. Данные литературы о количестве узелков в агрегированных лимфоидных узелках и их распределение в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у старых крыс отсутствуют.

Таким образом, в литературе отсутствуют данные о количестве агрегированных лимфоидных узелков, их площади и числе узелков в них в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки агрегированных лимфоидных узелков у новорожденных и препубертатных крыс. У старых крыс остается не изученным количество агрегированных лимфоидных узелков и число узелков в них, распределение в обоих отделах ободочной кишки. Однако, известно, что у половозрелых крыс по сравнению с препубертатными животными количество агрегированных лимфоидных узелков в ободочной кишки не изменяется, их средняя площадь увеличивается, а число одиночных лимфоидных узелков на 1 см² ободочной кишки снижается. Количество агрегированных лимфоидных узелков и число узелков в них в проксимальном отделе ободочной кишки не отличается от дистального. У старых крыс количество агрегированных лимфоидных узелков и их площадь не изменяются.

### 1.12. Морфофункциональная характеристика энтеральной нервной системы ободочной кишки

Моторика желудочно-кишечного тракта и одного из его отделов — ободочной кишки, регулируется энтеральной нервной системой, диффузной эндокринной системой и интерстициальными клетками Кахаля [48]. Энтеральная нервная система — собственная нервная система желудочно-кишечного тракта, является одним из отделов автономной нервной системы. По отечественной классификации она входит в состав метасимпатической нервной системы [11].

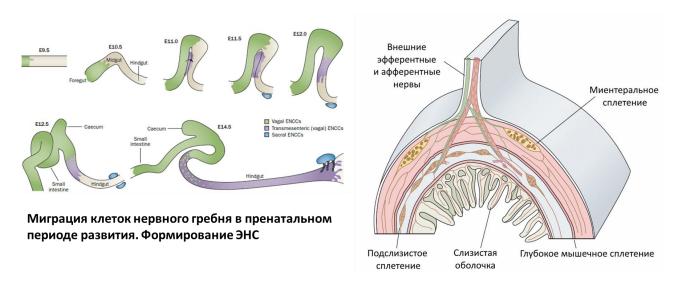


Рисунок 3. Структура энтеральной нервной системы ободочной кишки по [47]

Энтеральная нервная система состоит из ганглиев, содержащих нервные, гли-альные клетки и нервные волокна и представлена двумя крупными сплетениями — межмышечным (Ауэрбаха) и субмукозным (Мейснера) [47].

Оба сплетения представлены ганглиями, состоящими из нейронов, глиальных клеток, и нервными волокнами, образованными аксонами нейронов и глиальных клеток (рис. 3). Межмышечное нервное сплетение располагается между продольным и циркулярным слоями мышечной оболочки, а субмукозное - в подслизистой основе и слизистой оболочке [48].

На светооптическом уровне энтеральные ганглии представляют собой компактные структуры, четко отграниченные от окружающих тканей и состоящие из

нейронов, глиальных клеток и нейропиля. На ультрастуктурном уровне в энтеральных ганглиях выявляются нейроны, окруженные плотно упакованными аксонами, дендритами, и глиальные клетки с небольшим количеством межклеточного вещества. Соединительная ткань и капилляры лежат вне ганглиев [48, 50].

Подобно нейронам центральной нервной системы среди энтеральных нейронов, располагающихся в энтеральных ганглиях, выявляют три основных функциональных типа: афферентные, эфферентные и интернейроны (вставочные) [99]. Афферентные нейроны выполняют сенсорную функцию и среди них преобладают собственные первичные афферентные нейроны. Они функционально тесно связаны с энтероэндокринными клетками (ЕС-клетки), самой многочисленной клеточной популяцией диффузной эндокринной системы. Основной медиатор взаимодействия ЕС-клеток и собственных первичных афферентных нейронов — серотонин. Вставочные нейроны выполняют интегративные функции - получают сенсорную информацию от афферентных нейронов и участвуют в регуляции активности эфферентных нейронов. Эфферентные нейроны являются моторными или секретомоторными нейронами и по типу нейромедиаторов бывают возбуждающими или тормозными [47].

Передача нервного импульса в синапсах энтеральной нервной системы осуществляется нейромедиаторами, число которых составляет свыше 20 [47]. Основным возбуждающим нейромедиатором энтеральной нервной системы является ацетилхолин, а тормозными – NO (монооксид азота), VIP (Vasoactive Intestinal Peptide, вазоактивный интестинальный пептид), АТФ [47]. Многообразие типов нейронов и их связей позволяет энтеральной нервной системе реализовывать сложные рефлекторные акты.

Помимо собственных энтеральных ганглиев и их отростков желудочно-кишечный тракт имеет богатую иннервацию афферентными, в том числе ноцицептивными, и эфферентными волокнами симпатической и парасимпатической нервной системы. Симпатическая нервная система иннервирует кишечник через систему

чревных нервов; парасимпатическая - через блуждающий и тазовые нервы. Волокна тазовых и блуждающего нервов выявляются на уровне миентерального сплетения [85]. Брыжеечные волокна, содержащие симпатические эффекторные аксоны, сопровождают небольшие артерии и ветвятся по их ходу [47]. Симпатическая и парасимпатическая нервная система образуют терминали на нейронах энтеральной нервной системы [47].

Важным клеточным компонентом энтеральной нервной системы являются глиальные клетки. В составе энтеральной нервной системы можно выделить несколько субпопуляций глиальных клеток в зависимости от их морфологической характеристики и расположения относительно слоев кишечной стенки. Это интраганглионарная, интерганглионарная, интрамускулярная и субэпителиальная нейроглия [56]. Наименее изученным клеточным компонентом энтеральной нервной системы являются энтеральные нейрональные прогениторные клетки, они морфологически сходны с глиальными и способны как к глио- так и, возможно, нейрогенезу у взрослых животных и человека [35].

С энтеральной нервной системы тесно ассоциированы интерстициальные клетки Кахаля и энтероэндокринные клетки [48, 55].

В рефлекторной деятельности толстой кишки выявляют миогенную и нейрогенную составляющие. Миогенный компонент представляет собой спонтанные ритмические сокращения, которые регистрируются в виде электрической активности (медленных волн). Медленные волны распространяются по поверхности гладких миоцитов и их частота уменьшается по направлению к дистальному отделу ободочной кишки. Источником и координатором медленных волн являются интерстициальные клетки Кахаля [48, 108]. Медленные волны в толстой кишке самостоятельно не способны вызвать моторный ответ в мышечной оболочке и требуют дополнительной стимуляции (активации) со стороны энтеральной нервной системы.

Большую часть времени толстый кишечник совершает перемешивающие и пропульсивные движения, что обеспечивает абсорбцию жидкости и формирование

твердых каловых масс. Периодически совершаются направленные перистальтические движения, которые продвигает каловые массы в дистальном направлении [99]. Пропульсивные движения толстого кишечника могут быть разделены на два типа: так называемые высокоамплитудные сокращения (high-amplitude propagated contractions), которые перемещают твердое содержимое толстого кишечника в анальном направлении и инициируют акт дефекации, и низкоамплитудные сокращения (low-amplitude propagated contractions), продвигающие газообразное и жидкое содержимое толстого кишечника [21].

## 1.13. Пренатальное развитие энтеральной нервной системы ободочной кишки

Источником развития энтеральной нервной системы является нервный гребень, который образуется в процессе нейруляции из эктодермы и располагается дорзальнее нервной трубки. Энтеральная нервная система проксимального и дистального отделов ободочной кишки развиваются из разных участков нервного гребня (рис. 4). Мигрирующие клетки (нейробласты) вагального участка нервного гребня (на уровне 1-5 пары сомитов) формируют нервную сеть проксимального отдела ободочной кишки. Энтеральная нервная система дистального отдела ободочной кишки формируется из нейробластов вагального и сакрального (дистальнее 28 пары сомитов) участков нервного гребня. У грызунов нейробласты колонизируют проксимальный отдел ободочной кишки в период 9,5-12,5 сутки пренатального развития, а у человека - на 4-6 неделе беременности. Колонизация дистального отдела ободочной кишки у мыши происходит к 14,5-16,5 суткам пренатального развития, а у человека – на 6-7 неделе беременности [52, 67]. У мыши постоянно пролиферирует 1-2% от общего количества нейробластов. Следует отметить, что развитие энтеральной нервной системы у человека и лабораторных животных происходит в ростро-каудальном направлении, и оно затрагивает миграцию клеток нервного гребня, их пролиферацию и дифференцировку в составе межмышечного нервного сплетения. Часть нейробластов мигрирует из межмышечного нервного сплетения через мезенхиму и формирует подслизистое нервное сплетение. У человека оно

формируется к 14 неделе беременности, а у грызунов – в ранние сроки постнатального развития [125].

Нейроны энтеральной нервной системы способны оказывать влияние на развитие других клеток. У мышей при аганглиозе присутствуют интерстициальные клетки Кахаля, но их количество существенно ниже, чем в физиологических условиях [122]. В исследовании *in vitro* было показано, что нейроны способны стимулировать пролиферацию гладких миоцитов [28].

Самым распространенным и хорошо изученным заболеванием, связанным с нарушением развития энтеральной нервной системы, является болезнь Гиршпрунга. Она встречается у одного новорожденного из 5000 и характеризуется наличием аганглионарных участков в стенке толстой кишки. Около 50% случаев болезни Гиршпрунга у человека и аганглиоз толстой кишки у лабораторных животных обусловлены генетическими нарушениями миграции, пролиферации и дифференцировки нейробластов [22, 55]. В процессе миграции нейробласты экспрессируют на клеточной поверхности рецепторные молекулы: рецепторы эндотелинов В-типа (endothelin receptor B-type, ERB), тирозин-киназу С (tyrosine kinase C, TrcC); рецептор глиального нейротрофического фактора-α (GDNF receptor-α, GFRα) и его корецептор RET, рецептор Sonic hedgehog (Shh) и др. Лигандами для этих молекул служат секретируемые клетками мезенхимы ободочной кишки эндотелин-3 (endothelin-3, ET-3), нейротрофин-3 (neurotrophin-3, NT-3), глиальный нейротрофический фактор (glial-derived neurotrophic factor, GDNF) [125]. Эпителиальная выстилка ободочной кишки создает градиент растворимых молекул NT-3, Sonic hedgehog (Shh). Эндотелин-3 (endothelin-3, ET-3) секретируется клетками мезенхимы, переходит в активную форму (ЕСЕ-1, активированный ЕТ-3), и связываются с рецепторами на поверхности нейробластов. У мышей с нокаутом по гену ЕТ-3 снижается локальное содержание молекул внеклеточного матрикса [105]. В процессе развития энтеральной нервной системы белки внеклеточного матрикса (ламинин, коллаген IV типа, тенасцин и фибронектин) регулируют миграцию нейробластов, их пролиферацию и дифференцировку, и служат основой для формирования нервной сети [96]. Мутации генов эндотелинов и их рецепторов встречаются примерно у 10% больных болезнью Гиршпрунга [89]. В исследовании *in vitro* было показано, что градиент GDNF определяет направление миграции нейробластов, способствует их пролиферации и дифференцировке [113]. Мутации генов этого сигнального пути являются самыми частыми и встречаются у 7-25% больных (до 80% больных с тяжелой формой заболевания) [23]. Мутации в генах NT-3 и TrcC приводят к преждевременной дифференцировке нейробластов в нейроны и глиальные клетки, и отсутствию ганглиев в дистальном отделе ободочной кишки [133]. Морфогены из семейства Hedgehog (Sonic hedgehog, Shh; Indian hedgehog, Ihh) стимулируют пролиферацию нейробластов, препятствуют их ранней дифференцировке и миграции в подслизистый слой [46]. Установлено, что мутации в генах некоторых транскрипционных факторов (Рах3, Sox10, Phox2b) способны вызывать аганглиоз всей ободочной кишки у мышей [115].

### 1.14. Постнатальное развитие энтеральной нервной системы ободочной кишки

Постнатальное развитие энтеральной нервной системы является продолжением пренатального этапа, ключевую роль в котором играет миграция клеток нервного гребня с последующей их пролиферацией и образованием нейробластов — клеток-предшественников нейронов и глии [48]. Энтеральная нервная система ободочной кишки представлена сначала межмышечным, а затем и подслизистым нервными сплетениями. Постнатальное развитие энтеральной нервной системы изучено у крыс, мышей и морских свинок [97, 111, 124].

В период новорожденности межмышечное нервное сплетение ободочной кишки у крыс представлено единичными ганглиями [124]. На ультрастуктурном уровне у новорожденных крыс в ободочной кишке преобладают «незрелые» нейроны, которые характеризуются малым количеством цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума и большим - свободных рибосом. В этот период незрелые внутримышечные волокна не содержат везикул с нейромедиаторами [124]. В ганглиях

межмышечного нервного сплетения у новорожденных крыс выявляются единичные NOS- и VIP-иммунореактивные нейроны и их аксоны [81]. В межмышечном нервном сплетении ободочной кишки у новорожденных крыс обнаруживаются единичные, не связанные в сеть глиальные S100b- и GPAP-иммунореактивные клетки [39]. В ганглиях межмышечного нервного сплетения у крыс и мышей обнаружены прогениторные клетки, которые составляют около 4,7% [75, 132]. Данные литературы о различиях гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения проксимального и дистального отделов ободочной кишки у новорожденных крыс отсутствуют.

В подсосный период развития у крыс по сравнению с новорожденными животными снижается соотношение числа нейронов к глии в ганглиях межмышечного нервного сплетения [112]. В первые две недели постнатального развития у крыс число нейронов на площадь ганглиев увеличивается от проксимального отдела ободочной кишки к дистальному, а средний размер тел нейронов, наоборот, снижается [112]. В этот возрастной период у крыс в ганглиях межмышечного нервного сплетения доля нитроэргических нейронов увеличивается в первую неделю постнатального развития, а доля холинэргических нейронов — не изменяется [124]. В подсосном периоде развития у крыс формируется сеть глиальных \$100b- и GPAP-иммунореактивных клеток [39].

К препубертатному возрастному периоду (21-36 сутки постнатльного развития) у крыс энтеральная нервная система организована в сеть, которая состоит из ганглиев, соединенных межганглионарными трактами [124]. По сравнению с подсосным возрастным периодом доля нитроэргических нейронов в ганглиях не изменяется, а доля холинэргических нейронов - увеличивается [124]. В этот возрастной период у крыс увеличивается число NOS- и VIP-иммунореактивных нейронов и их аксонов [81]. В ободочной кишки у крыс к препубертатному возрастному периоду формируется нервная сеть, состоящая из S100b- и GPAP- иммунореактивных гли-

альных клеток [39]. Данные литературы о различиях гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у препубертатных крыс отсутствуют.

По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых морских свинок в ободочной кишки не изменяется площадь HuC/D-иммунореактивных нейронов, а их число на единицу площади мышечной оболочки снижается [97]. В период половой зрелости у морских свинок площадь NOS- иммунореактивных нервных волокон на 1 см длины ободочной кишки становится ниже [97]. У морских свинок в проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным нервная сеть межмышечного нервного сплетения более плотная [50]. По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых крыс количество NOS- и VIP - позитивных нейронов и их аксонов в ганглиях межмышечного нервного сплетения достигает максимальных значений [81]. В проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным у крыс больше число нейронов, но их размер меньше [101, 111]. К периоду половой зрелости у крыс прогениторные клетки в ганглиях межмышечного нервного сплетения отсутствуют [132], у мышей они сохраняются до 4 мес, а затем элиминируются [75]. В ободочной кишки у человека прогениторные клетки сохраняются всю жизнь [88]. Литературные данные об изменении площади и числа ганглиев в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у половозрелых крыс отсутствуют.

Установлено, что у старых морских свинок по сравнению с половозрелыми в межмышечном нервном сплетении ободочной кишки количество нейронов на площадь ганглия и число нейронов на площадь мышечной оболочки не отличаются [97]. При старении у морских свинок увеличивается объемная доля тормозных NOS- и SubP- иммунореактивных нервных волокон [97]. У старых крыс по сравнению с половозрелыми число ганглиев межмышечного нервного сплетения в ободочной кишки не изменяется [109]. По данным гистохимического исследования межмышечного нервного сплетения в ободочной кишки у старых крыс общее число

нейронов у них снижается на 64% [111]. К старости у крыс и морских свинок снижается число, в основном, холинэргических нейронов, а размер тел нейронов не отличается от половозрелых животных [97, 111]. В ганглиях межмышечного нервного сплетения у крыс снижается как число нейронов (HuC/D), так и глиальных клеток (S100b) [100]. В период старости у крыс в ободочной кишки увеличивается толщина аксонов холинергических нейронов [100]. В подслизистом нервном сплетении в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у старых крыс больше тирозин-гидроксилаза-положительных нервных волокон с «утолщениями» (тирозин-гидроксилаза – ключевой фермент аксонов превертебральных симпатических ганглиев, действие которых замедляет моторику, снижает секрецию ацетилхолина). Аналогичные изменения происходят во внешней иннервации (при экспериментальном аганглиозе увеличивается толщина нервов) [100]. В межмышечном нервном сплетении ободочной кишки у пожилых людей на тотальных препаратах выявляются ганглии с так называемыми внутриганглионарными пространствами, что приводит к увеличению площади ганглиев [59].

Таким образом, известно, что нервная сеть у крыс в период новорожденности не сформирована, и она представлена ганглиями, внутри которых располагаются нейроны и единичные глиальные клетки, однако данные литературы о различиях гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки отсутствуют. Известно, что к препубертатному возрастному периоду у крыс межмышечное нервное сплетение организовано в сеть, которая состоит из ганглиев, соединенных межганглионарными трактами. По сравнению с периодом новорожденности в ганглиях увеличивается доля холинергических и нитроэргических нейронов, число S100b- и GPAP- иммунореактивных глиальных клеток. Однако, остаются неизученными изменения площади, числа ганглиев и их клеточного состава в разных отделах ободочной кишки. Известно, что по сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых крыс количество в ганглиях межмышечного нервного сплетения число NOS- и VIP - позитивных нейронов, и их аксонов достигает максимальных значений. У половозрелых крыс в проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным

больше число нейронов, но средний размер их тел меньше. Однако, отсутствуют данные литературы об изменении площади и числа ганглиев в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у половозрелых крыс. [97]. У старых крыс по сравнению с половозрелыми число ганглиев межмышечного нервного сплетения в ободочной кишки не изменяется, а общее число нейронов и глиальных клеток в них снижается. В период старости у крыс в ободочной кишки увеличивается толщина аксонов холинергических нейронов. Однако, отсутствуют данные литературы об изменении площади ганглиев, их клеточного состава в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ОБЗОРУ ЛИТЕРАТУРЫ

В литературе представлено относительно большое число работ, посвященных изучению у крыс возрастных морфофункциональных особенностей толстой кишки. Однако, систематизация данных этих работ по структурно-функциональным компонентам ободочной кишки — эпителиальному барьеру, иммунной и нервной систем — показывает, что многое остается неизученным (табл. 1).

Показано, что в период новорожденности у крыс структуры ободочной кишки отличаются наименьшими размерами. Слизистая оболочка ободочной кишки у новорожденных крыс представлена «ворсинко-подобными структурами». Эпителиальный барьер незрелый, поскольку бокаловидные клетки почти лишены нейтральных муцинов. Основные таксоны просветной микрофлоры у новорожденных крыс не изучены. Агрегированные лимфоидные узелки в этот период отсутствуют. Не охарактеризован клеточный состав ганглиев межмышечного нервного сплетения, численность и толщина внутримышечных нервных отростков.

По сравнению с новорожденными в препубертатном возрастном периоде у крыс происходит увеличение линейных размеров ободочной кишки. Формируются крипты, складки в проксимальном отделе. Секреторные клетки ободочной кишки и физико-химические свойства их секрета не охарактеризованы. Основные таксоны просветной микрофлоры выявляли у препубертатных крыс, но их соотношение не изучено. Данные о наличии агрегированных лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки в литературе представлены, но их количественная оценка не проведена. Межмышечное нервное сплетение сформировано, выражены нервные тракты, но клеточный состав ганглиев не охарактеризован.

По сравнению с препубертатными у половозрелых крыс нет различий толщины оболочек ободочной кишки. Литературные сведения о секреторных клетках эпителия, структурах иммунной и нервной систем ободочной кишки в этом периоде отсутствуют.

По сравнению с половозрелыми у старых крыс увеличивается толщина мышечной оболочки ободочной кишки. Показано снижение числа бокаловидных клеток в этот период. Энтероэндокринные клетки и содержание серотнина у старых крыс не оценивалось. Соотношение основных таксонов просветной микрофлоры, количественная оценка структур иммунной и нервной систем в этот период не проводилась.

Региональные различия структурной организации ободочной кишки во все периоды постнатального развития практически не изучены.

Необходимость систематизированных данных о возрастных морфофункциональных изменениях ободочной кишки у крыс определяется тем, что этот вид лабораторных животных используется в качестве объекта исследования в 17% всех экспериментальных работ [7] и 60% при оценке эффективности действия препаратов микробного происхождения, применяемых во все возрастные периоды.

Таблица 1. Данные литературы о возрастных структурно-функциональных изменениях ободочной кишки

	Новорожденные		Препубертатные		Половозрель	sie	Старые	
	Кишка	Отделы	Кишка	Отделы	Кишка	Отделы	Кишка	Отделы
Структурные	Наименьшая	В проксималь-	Слизистая	Складки в	Слизистая	Складки в проксимальном отделе. В ди-	Увеличивается	
изменения	длина, ширина	ном отделе есть	оболочка	прокси-	оболочка	стальном нет [86]	толщина мы-	
ободочной	просвета, толщина	«ворсинко-по-	сформиро-	мальном от-	складчатая.		шечной обо-	Данные
кишки	ее стенки [38]	добные струк-	вана.	деле. В ди-	Крипты		лочки [27]	отсут-
		туры» [95]. В ди-	Крипты уз-	стальном	сформиро-			ствуют
		стальном нет	кие глубо-	нет [86]	ваны [86]			
			кие [86]					
Микрофлора	Данные отсутствуют		Выявляли 5 основных так-		Выявляли 5 о	сновных таксонов микрофлоры: <i>Bac</i> -	Данные отсутствуют	
			сонов микрофлоры: Вас-		teroides, Firm	icutes, Lactobacillus, Bifidobacteria, Entero-		
			teroides, Firmicutes, Lacto-		bacteriaceae [	90]		
			bacillus, Bifidobacteria, En-					
			terobacteriaceae [90]					
Численность	Данные отсут-						Снижается в	Данные
бокаловидных	ствуют	Данные отсут-	Данные от-	Данные от-	Данные от-	Пауни на отгоутотъринат	проксимальном	отсут-
клеток	Cibylei	ствуют	сутствуют	сутствуют	сутствуют	Данные отсутствуют	и дистальном	ствуют
							отделах [86]	
Содержание	Преобладает сек-	Данные отсут-	Данные от-	Данные от-	Данные от-	Содержание высокосульфатированных	Данные отсут-	Данные
муцинов в бо-	реция кислых вы-	ствуют	сутствуют	сутствуют	сутствуют	муцинов в бокаловидных клетках больше	ствуют	отсут-
каловидных	сокосульфатиро-					в дистальном отделе ободочной кишки, а		ствуют
клетках	ванных и сиалому-					нейтральных муцинов – в проксимальном		
	цинов [29]					[107]		
		1		<u> </u>	<u> </u>		1	1

Число энтеро- эндокринных клеток и со- держание се- ротонина	Данные отсут-	Данные отсут- ствуют	Данные от- сутствуют	Данные от-	Данные от- сутствуют	В проксимальном отделе по сравнению с дистальным количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки выше [92]	Данные отсут-	Данные отсут- ствуют
Агрегирован- ные лимфоид- ные узелки	Данные отсут-	Данные отсут- ствуют	Данные от- сутствуют	Данные от-	Данные от- сутствуют	Количество агрегированных лимфоидных узелков и число узелков в них в проксимальном отделе ободочной кишки не отличается от дистального [84, 93]	Количество агрегированных лимфоидных узелков и их площадь не изменяются [86]	Данные отсут- ствуют
Межмышеч- ное нервное сплетение	Ганглии формируют цепь [124], состоящую из единичных NOS- и VIP+ нейронов [81], глиальных S100b- и GPAP+ клеток [39]	Данные отсут- ствуют	Нервная сеть сформирована, нервные тракты выражены [39]	Данные от- сутствуют	Количество NOS+ и VIP+ нейро- нов и их ак- сонов в ган- глиях наибольшее [81]	В проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным больше число нейронов, но средний размер их тел меньше [101, 111].  Площадь и число ганглиев - ?	Число ганглиев не изменяется [109], Число нейронов НиС/D+, и гли- альных клеток \$100b+ снижа- ется на 64% [100]	Данные отсут- ствуют

#### ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА

Исследование выполнено на 100 самцах крыс Вистар разных возрастных групп: новорожденных (2-4 сут), препубертатных (25-30 сут), половозрелых (3 мес), и старых (18-24 мес). В зависимости от использованного метода, было по 6-7 животных в каждой серии. Крысы были получены из филиала "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Работу с экспериментальными животными проводили в соответствии с приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №15 от 16.12.2014).

Животных содержали в открытой системе при температуре 18-25°С и естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССКИ.nO81.B00113, ГОСТ Р50258-92).

Поскольку доклиническая оценка эффективности бактериальных препаратов чаще всего проводится на крысах, этот вид лабораторных животных был использован нами в эксперименте [7]. Выбор периодов постнатального развития обусловлен тем, что у крыс в период новорожденности кишечник колонизируется микрофлорой, не развита регуляция моторики [33]. У препубертатных животных происходит переход на твердый корм и смена состава микрофлоры [60]. У половозрелых животных состав микрофлоры стабильный и развита моторная функция ободочной кишки [60]. По данным литературы к старости у крыс снижается частота и амплитуда сокращений кишечника [86].

За 6 часов перед экспериментом проводили пищевую депривацию животных. Крыс выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Анатомический

С целью четкой визуализации агрегированных лимфоидных узелков на толстую кишку накладывали лигатуры, вводили в ее просвет 2% водный раствор уксусной кислоты, фиксацию проводили при 4°С в течение 18-20 часов по Bienenstock J. and Clancy R. [26]. Поперечным разрезом разделяли ободочную кишку на две равные части: проксимальный и дистальный отделы (рис. 4). Полученные фрагменты проксимального и дистального отделов ободочной кишки вскрывали по брыжеечной линии, отмывали от содержимого и расправляли на бумаге черного пвета.

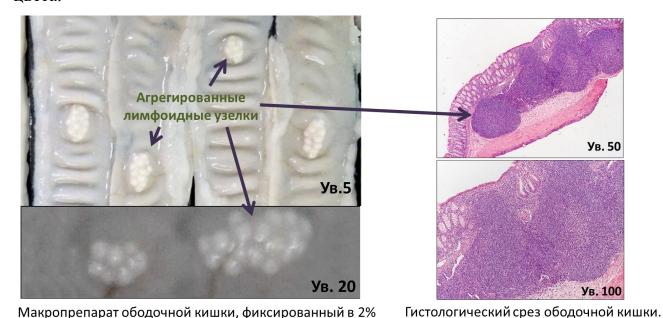


Рисунок 4. Иммунная система ободочной кишки. Агрегированные лимфоидные узелки

р-ре уксусной кислоты. Агрегированные лимфоидные

узелки

#### Гистологические

**Агрегированные лимфоидные узелки.** Окраска гематоксилином и эозином.

Для гистологического исследования фрагменты проксимального и дистального отделов ободочной кишки погружали на 10 мин в раствор миорелаксанта (Nicardipine 10-6M в p-ре PBS; Sigma, Австралия) [97], затем расправляли на миллипоровом фильтре и фиксировали в жидкости Буэна. Материал проводили по спиртам восходящей концентрации и ксилолам в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США). Обезвоженные образцы заключали в гистомикс на аппарате Tissue-

Tek TEC (Sakura, США). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4-6 мкм на микротоме модели Microm HM340E (ThermoScientific, США) и окрашивали их гематоксилином и эозином.

#### Гистохимические

Для выявления нейтральных муцинов в секреторных гранулах бокаловидных клеток проводили ШИК-реакцию, а для выявления высоко сульфатированных муцинов - окраску альциановым синим (рН 1.0) [107]. Гистологические срезы были стандартной толщины 5 мкм. Препараты крыс всех возрастных групп окрашивали одномоментно.

#### Иммуногистохимические

Энтероэндокринные клетки эпителиальной выстилки ободочной кишки выявляли на гистологических срезах с помощью антител к хромогранину A (Rabbit polyclonal anti-Chromogranin A antibody, ab15160, Abcam, Великобритания) в титре 1:400, инкубацию проводили в течение 18 ч (при температуре 12°С). Затем срезы инкубировали 1 ч при комнатной температуре со вторыми антителами (Simple Stain Rat MAX PO (R), Nichirei Bioscience Inc., Япония). Для визуализации реакции применяли набор N-Histofine DAB-2V (Nichirei Bioscience Inc., Япония). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам.

#### Иммунофлуоресцентные

Иммунофлуоресцентное исследование межмышечного нервного сплетения проводили на гистологических срезах и тотальных препаратах мышечной оболочки ободочной кишки. Фрагменты кишки для изготовления гистологических срезов фиксировали в нейтральном забуференном 4% формалине (Биовитрум, Россия). Для получения тотальных препаратов фрагменты кишки размерами 0,5 х 0,5 см фиксировали в охлажденном до -20°C ацетоне 12-14 ч, предварительно удалив скальпелем слизистую оболочку и подслизистую основу.

С целью маркирования плоскостной структуры межмышечного нервного сплетения и внутримышечных нервных отростков применяли антитела к βШ тубулину (аb18207, Abcam, США). На гистологических срезах мышечной оболочки ободочной кишки определяли клеточный состав ганглиев. С целью выявления тел нейронов и глиальных клеток применяли, соответственно, антитела к HuC/D (ab184267, Abcam, США) и S100b (ab868, Abcam, США). В качестве флуоресцентной метки для HuC/D служил стрептавидин, коньюгированный с Alexa Fluor 555 (S21381, Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:100. Вторыми антителами для βШ-тубулина и S100b были Alexa-Fluor 488 goat-anti-rabbit (Life technologies, США) в разведении 1:100.

#### Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Определяли концентрацию серотонина в гомогенате обоих отделов ободочной кишки [92] и плазме периферической крови [36] методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1260 Infinity Nanoflow LC (Agilent, США).

Кровь из шейных вен собирали в пробирки, содержащие 1% ЭДТА. К 500 мкл крови добавляли 50 мкл 2% раствора метабисульфита натрия, 100 мкл 3.4М хлорной кислоты (4°С). Оставляли при температуре 4°С на 15-20 минут, центрифугировали (центрифуга-вортекс СМ-70М, ELMI, Латвия) 10 мин при 3500 об/мин, супернатант (плазму крови) переносили в чистую микропробирку. Пробы замораживали и хранили при - 70°С.

Для получения гомогената фрагменты обоих отделов ободочной кишки размерами 0,5 х 0,5 см помещали в 1 мл раствора 0,1М хлорной кислоты (4°С), гомогенизировали (гомогенизатор TissueLyser LT, Qiagen, Нидерланды) 5 мин при 50Гц, оставляли при комнатной температуре на 15-20 минут, центрифугировали (центрифуга-вортекс СМ-70М, ЕLМІ, Латвия) 10 мин при 9000 об/мин, супернатант переносили в эппендорф. Пробы замораживали и хранили при - 70°С в течение 1 мес. Проводили расчет концентрации серотонина в гомогенате ободочной кишки на 1 мг общего белка (по Брэдфорду).

#### Морфометрические

Для оценки морфологических изменений ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты проксимального и дистального отделов ободочной кишки фотографировали на микроскопе Leica DM2500 (Leica Microsystems, Австрия) с объективом х10. Выбирали участки с продольно ориентированными криптами. Определяли показатели длины ободочной кишки, толщины слизистой оболочки, подслизистой основы, циркулярного слоя мышечной оболочки, глубины и числа крипт в программе PhotoM1.21 (freeware, разработчик А. Черниговский, 2000–2001, http://t\_lambda.chat.ru/).

На гистологических срезах ободочной кишки, визуализируемых при ШИК-реакции проводили подсчет числа бокаловидных клеток на стандартной единице площади эпителия слизистой оболочки (1 мм²). На гистологических срезах, выявляемых при ШИК-реакции и альциановым синим определяли содержание, соответственно, нейтральных и высокосульфатированных муцинов. О содержании муцинов в бокаловидных клетках судили по интенсивности окрашивания продукта реакции. Интенсивность окрашивания рассчитывали как средний десятичный логарифм отношения яркости фона к яркости точки объекта на фотографии. Для нивелирования различий в толщине срезов, времени фиксации и окраски, интенсивность окрашивания бокаловидных клеток нормировали по отношению к расположенным рядом участкам соединительной ткани.

Определяли абсолютное количество энтероэндокринных клеток, выявленных при реакции с антителами к хромогранину A, на стандартной единице площади эпителия (1 мм²).

Для оценки возрастных и региональных изменений локальной иммунной системы агрегированные лимфоидные узелки расправляли на бумаге черного цвета и фотографировали (фотокамера "Premiere" SMZ05, KHP). На полученных цифровых фотографиях при помощи морфометрической программы "Image-Pro Plus 6.0" определяли число агрегированных лимфоидных узелков на стандартной единице площади ободочной кишки (1 см²), их площадь, и число лимфоидных узелков (рис. 1).

Для оценки возрастных изменений межмышечного нервного сплетения на тотальных препаратах, окрашенных антителами к βІІІ-тубулину, определяли среднюю площадь межганглионарных пространств (мкм²) и толщину соединяющих ганглии нервных трактов (мкм). Для компьютерной обработки полученных изображений использовали программу ImageJ (Fiji, free software).

На гистологических срезах, окрашенных антителами к βIII-тубулину, подсчитывали число ганглиев (на 1 мм длины кишки), и их площадь (мкм²). В циркулярном слое мышечной оболочки определяли число и толщину (мкм) поперечных профилей нервных отростков на стандартной единице площади (1 мм²).

На гистологических срезах мышечной оболочки ободочной кишки, маркированных антителами к HuC/D и S100b, в ганглиях проводили подсчет числа, соответственно, нейронов и глиальных клеток.

#### Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Методом полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции в режиме реального времени определяли уровень экспрессии мРНК основных таксонов: *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae* в кале (просветная микрофлора) у животных разных возрастных групп. Использовали праймеры и программу амплификации, предложенные С. Nasuti et al. [90] (табл. 2).

Таблица 2. Праймеры, использованные для определения основных таксонов просветной микрофлоры ободочной кишки

Гены	Праймеры	Длина продукта		
Bacteroides	F: GGTGTCGGCTTAAGTGCCAT	140		
Bucieroides	R: CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC			
Firmicutes	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT			
Timicates	R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279		
Bifidobacteria	F: GGGTGGTAATGCCGGATG	457		
Bijidobacieria	R: TAAGCGATGGACTTTCACACC	437		
Lactobacillus	F: TGGAAACAGRTGCTAATACCG	230		
Laciobaciius	R: GTCCATTGTGGAAGATTCCC	230		
Enterobacteriaceae	F: CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	195		
Linerobacieriaceae	R: CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	1)3		

Для выделения суммарной РНК 10 мг каловых масс гомогенизировали в 1 мл стерильной дистиллированной воды с помощью настольного шейкера TissueLyser LT (QIAGEN, Голландия) при 50 Гц в течение 5 мин. Аликвоту полученной суспензии смешивали с лизирующим раствором из набора реагентов "Проба ГС" (НПФ ДНК-Технология, Россия) в соотношении 1:3, прогревали при 50°С в течение

30 мин и центрифугировали в настольной миницентрифуге при максимальных оборотах в течение 5 мин для осаждения нерастворенной фракции. К 200 мкл отобранного супернатанта добавляли 20 мкл ресуспендированного сорбента ("Проба ГС"), после чего проводили очистку нуклеиновых кислот в строгом соответствии с протоколом изготовителя. Полученные образцы, которые представляли собой тотальную фракцию нуклеиновых кислот с минимальными примесями других соединений, в общем объеме 100 мкл Tris 10 mM, pH 8,0, исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени со специфичными праймерами. Помимо 3 мкл исследуемого образца, каждая реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала по 10 пикомоль (pmol) каждого из двух праймеров, а также компоненты реакционного буфера, свободные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и интеркалирующий краситель SYBR Green (qPCRmix-HS SYBR, Евроген, Россия). Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе DT-Prime (НПФ ДНК-Технология, Россия) в режиме 95°C 5 мин, 94°C 15 сек, 62°C +детекция 10 сек, 72°C 20 сек 40 циклов. Считывание показателей флуоресценции и их интерпретация в виде значений пороговых циклов (Ср) осуществлялись автоматически в соответствии с алгоритмом разработчика. Выбирали референсный таксон (Firmicutes), относительно которого оценивали долю (%) основных таксонов в каждом образце.

#### Статистические

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc., США), руководствуясь методическим пособием [10] и рекомендациями А.М. Гржибовского и соавт. [2]. При проведении анализа на нормальность распределения (по результатам теста  $\chi^2$ ) был выбран метод непараметрической статистики. Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи, для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA Крускала-Уоллиса «multiple comparisons of mean ranks for all groups». Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки р<0,05.

Для оценки корреляции между показателями числа энтероэндокринных клеток, концентрации серотонина в кишке и крови применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КРЫС ВИСТАР В РАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Постнатальное развитие всех систем органов, включая желудочно-кишечный тракт и один из его отделов, толстую кишку, характеризуется структурными изменениями всех оболочек — слизистой, подслизистой основы, мышечной, а также локальной иммунной и энтеральной нервной систем. Литературные сведения о возрастных изменениях толстой кишки выполнены на разных видах лабораторных животных и не охватывают всех периодов постнатального развития [38, 61]. Отсутствуют систематизированные представления о возрастных морфофункциональных изменениях проксимального и дистального отделов ободочной кишки у крыс, которые отличаются по источнику развития, структурным и функциональным характеристикам [62].

#### 3.1. ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУР СТЕНКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

В период новорожденности стенка ободочной кишки и составляющие ее структурные компоненты тонкие, в слизистой оболочке крипт мало, они неглубокие с широкими просветами. У препубертатных животных отмечалось увеличение толщины всех структур ободочной кишки. У половозрелых и старых животных их размер на качественном уровне не различался. Длина ободочной кишки прогрессивно увеличивалась от периода новорожденности к старости.

В период новорожденности у крыс Вистар структуры ободочной кишки окончательно не сформированы. Малочисленные крипты характеризовались широким просветом и были неправильной формы (рис. 5A,Б). В составе эпителиальной вы-

стилки выявлялись колоноциты, бокаловидные и энтероэндокринные клетки. Колоноциты были высокими цилиндрическими с удлиненными нормо- и гиперхромными ядрами.

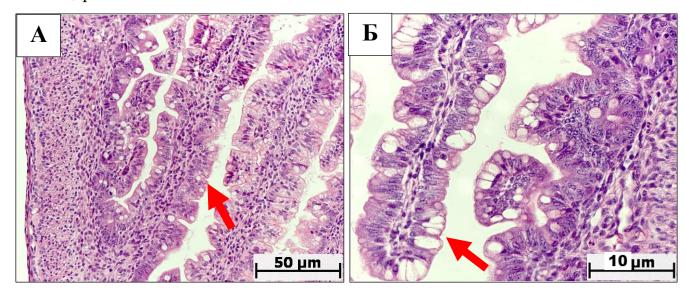


Рисунок 5. Морфологическая характеристика проксимального отдела ободочной кишки у крыс Вистар в период новорожденности. Стенка ободочной кишки тонкая (А), в слизистой оболочке крипты не сформированы, визуализируются «ворсинко-подобные структуры» ↑ (Б). Окраска гематоксилином и эозином

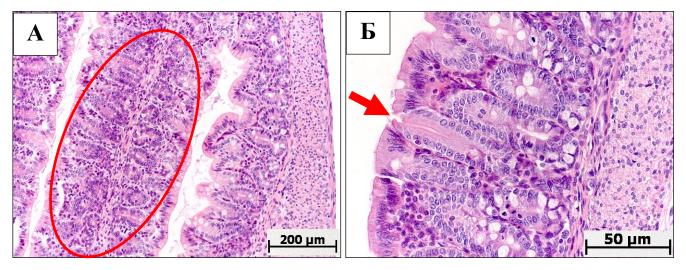


Рисунок 6. Морфологическая характеристика проксимального отдела ободочной кишки у крыс Вистар в препубертатный возрастной период. Слизистая оболочка складчатая (A). Крипты узкие глубокие ↑, подслизистая основа и мышечная оболочка хорошо выражены (Б). Окраска гематоксилином и эозином

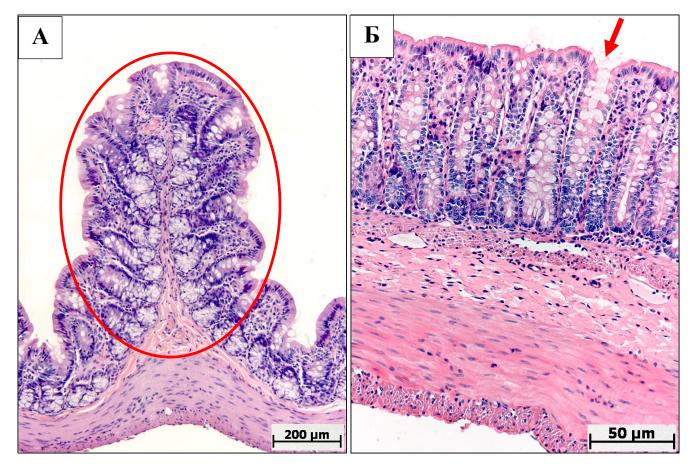


Рисунок 7. Морфологическая характеристика проксимального отдела ободочной кишки у крыс Вистар в период половой зрелости. Слизистая оболочка складчатая (A). Крипты узкие глубокие ↑, подслизистая основа и мышечная оболочка хорошо выражены (Б). Окраска гематоксилином и эозином

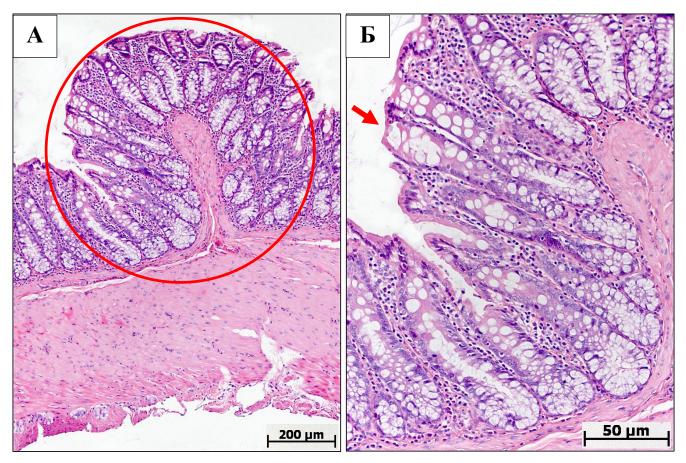


Рисунок 8. Морфологическая характеристика проксимального отдела ободочной кишки у старых крыс Вистар. Слизистая оболочка складчатая, подслизистая основа хорошо выражена. Мышечная оболочка утолщенная (A). Крипты узкие глубокие ↑ (Б). Окраска гематоксилином и эозином

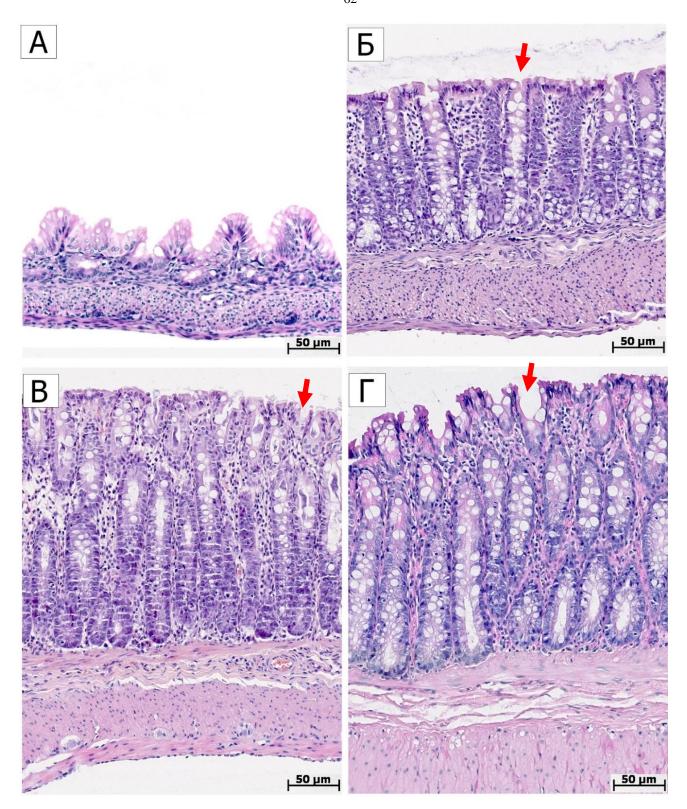


Рисунок 9. Морфологическая характеристика дистального отдела ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп. А – новорожденные; Б – препубертатные; В – половозрелые;  $\Gamma$  – старые. А - Стенка ободочной кишки тонкая, в слизистой оболочке крипты не сформированы; Б, В,  $\Gamma$  – Крипты узкие глубокие  $\uparrow$ , подслизистая основа и мышечная оболочка хорошо выражены. Окраска гематоксилином и эозином

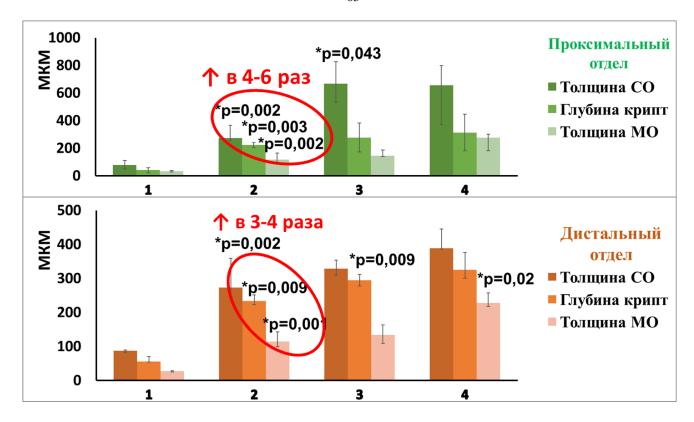


Рисунок 10. Морфометрическая характеристика проксимального и дистального отделов ободочной кишки в постнатальном онтогенезе у крыс Вистар в динамике развития. Возрастные группы: 1 — новорожденные; 2 — препубертатные; 3 — половозрелые; 4 — старые. СО — слизистая оболочка; МО — мышечная оболочка. Ме (L25;U75). ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при р<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой

Бокаловидные клетки распределялись неравномерно, в отдельных участках преобладали над колоноцитами. В слизистой оболочке проксимального отдела ободочной кишки у новорожденных крыс выявлялись «ворсинко-подобные структуры» (рис. 5Б). В дистальном отделе они отсутствовали (рис. 9А). Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистая основа имели трудно различимую границу, содержали небольшое количество фиброцитов, фибробластов, лимфоцитов и единичных гистиоцитов (рис. 5Б). Мышечная пластинка слизистой оболочки у новорожденных крыс не выражена. В этот возрастной период длина ободочной кишки, толщина слизистой оболочки, число и глубина крипт в ее составе были наименьшими (табл. 2). Мышечная оболочка состояла в основном из недифференцированных клеток мезенхимального происхождения. Между продольным и цир-

кулярным слоями мышечной оболочки выявлены мелкие четко очерченные ганглии, образующие «плотную» цепь. Серозная оболочка представлена тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и выстлана плоским мезотелием.

В препубертатном возрастном периоде крипты в слизистой оболочке обоих отделов ободочной кишки были глубокими с узким просветом (рис. 6А,Б; 9Б). В слизистой оболочке проксимального отдела ободочной кишки исчезали «ворсинкоподобные структуры», выявлялись складки, которые отсутствовали в дистальном отделе. Эпителиальная выстилка так же, как и у новорожденных животных представлена колоноцитами, бокаловидными и энтероэндокринными клетками. Колоноциты высокие цилиндрические с гиперхромными ядрами овальной формы. Бокаловидные клетки распределялись равномерно в эпителии крипт (8-12 на крипту). Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистая основа содержали небольшое количество равномерно распределенных клеточных элементов – фиброцитов, фибробластов, лимфоцитов и единичных гистиоцитов (рис. 6А,Б). Мышечная пластинка представлена 1-2 слоями гладкомышечных клеток. В собственной пластинке слизистой оболочки выявлялись агрегированные и одиночные лимфоидные узелки, часть из них была со светлыми центрами. Мышечная оболочка состояла из циркулярного и продольного слоев гладкомышечных клеток. В подслизистой основе и мышечной оболочке выявлялись четко очерченные ганглии, соответственно, подслизистого и межмышечного нервных сплетений. По сравнению с новорожденными у крыс препубертатного возрастного периода значительно увеличивалась длина ободочной кишки, толщина слизистой оболочки, а также количество крипт и их глубина (рис. 6Б; табл. 2). В этот возрастной период увеличивались показатели толщины как подслизистой основы, так и мышечной оболочки (рис. 10). Серозная оболочка была представлена тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и выстлана плоским мезотелием. Данные, представленные на качественном уровне подтверждаются показателями толщины структур ОК. В проксимальном отделе в период от новорожденности до препубертатного отмечается рост толщины слизистой оболочки, глубины крипт и мышечной оболочки в 4-6 раз (рис. 6Б; табл. 2). В дистальном отделе выявлены аналогичные изменения (в 3-4 раза), но менее выражены (рис. 6Б).

В период половой зрелости слизистая оболочка проксимального и дистального отделов ободочной кишки образовывала глубокие крипты с узким просветом (рис. 7, 9В). Клеточный состав эпителиальной выстилки, собственной пластинки слизистой оболочки, подслизистой основы не отличался от предыдущей возрастной группы. У половозрелых животных по сравнению с препубертатной возрастной группой длина ободочной кишки, показатели толщины слизистой оболочки и подслизистой основы были в 2 раза выше в проксимальном отделе, а глубины крипт – в дистальном (табл. 2). Мышечная оболочка состояла из циркулярного и продольного слоев гладкомышечных клеток (рис. 7, 9В). Толщина мышечной оболочки в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки не отличалась (табл. 2).

При морфологическом исследовании у старых крыс по сравнению с половозрелыми изменений длины ободочной кишки, толщины слизистой оболочки, глубины крипт и их числа не выявлено (рис. 8A). По сравнению с периодом половой зрелости у старых животных наблюдалось увеличение в 2 раза показателя толщины мышечной оболочки в дистальном отделе (рис. 9Г; табл. 2).

Таким образом, в период новорожденности слизистая оболочка стенки ободочной кишки не сформирована, и характеризуется наличием «ворсинко-подобных структур» в проксимальном отделе. В этот возрастной период показатели длины ободочной кишки, толщины слизистой оболочки, глубины и числа крипт, а также толщины мышечной оболочки были минимальными. В проксимальном отделе по сравнению с дистальным больше толщина мышечной оболочки, а число крипт, наоборот, меньше. К препубертатному возрастному периоду у крыс значительно увеличивается длина ободочной кишки, толщина слизистой оболочки, а также количество крипт и их глубина в обоих отделах ободочной кишки. В этот возрастной период увеличиваются показатели толщины подслизистой основы и мышечной оболочки ободочной кишки. Региональных различий ободочной кишки у препубертатных крыс не выявлено. У половозрелых животных по сравнению с препубер-

татной возрастной группой в 2 раза больше длина ободочной кишки, толщина слизистой оболочки и подслизистой основы в проксимальном отделе, а глубина крипт — в дистальном. В этот возрастной период различий по показателям толщины мышечной оболочки в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки не обнаружено.

При морфологическом исследовании у старых крыс по сравнению с половозрелыми возрастных и региональных различий не выявлено.

Таблица 3 Структурная характеристика ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп, Me (L25;U75)

Параметры	Проксимальный отдел				Дистальный отдел			
• •	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые
Длина всей ободоч- ной кишки, см	2,5(1,8;3,1)	* ( <b>p=0,007</b> ) 8,0(7,3;11,8)	* (p=0,016) 18,0(17,5;20,5)	17,7(16,5;18,5)	-	-	-	-
Толщина слизи- стой оболочки, мкм	77,1 (48,3; 111,2)	* (p=0,002) 272,5 (256; 364)	* (p=0,043) 767,8 (533; 826)	424 (371,1; 798)	87,5 (82,6; 88,5)	* (p=0,0009) 273,4 (247; 481)	328,3 (309,2; 353,5)	434,2 (390; 445)
Число крипт / мм длины ободочной кишки	6,4 (5,3; 7,4)	* (p=0,0021) 27,8 (21,3; 33,2)	* (p=0,033) 66,8 (43,1; 75,5)	21,4 (20,4; 28,8)	# ( <b>p=0,007</b> ) 13,6 (12,7; 14,6)	* (p=0,009) 25,8 (21,5; 30,7)	22,2 (19,7; 24,1)	16,6 (16,1; 18,6)
Глубина крипт, мкм	40,7 (23,4; 64,5)	* (p=0,0024) 222,3 (203; 234)	203,5 (172; 269)	312,7 (180; 349)	59,6 (54,3; 69,6)	* (p=0,0009) 233,9 (223; 251)	* (p=0,008) 294,2 (277; 312)	325 (300; 376)
Число бокаловид- ных клеток / мм <sup>2</sup> эпителия	3416 (3029; 4926)	3859 (3323; 4769)	5183 (4712; 5619)	5462 (4447; 6347)	# (p=0,016) 6275 (5755; 6786)	# ( <b>p=0,034</b> ) 7747 (5687; 8510)	# ( <b>p=0,006</b> ) 9977 (8092; 11126)	# ( <b>p=0,011</b> ) 9819 (8465; 11363)
Содержание нейтральных му- цинов в бокало- видных клетках, у.е.	14,2 (7,1; 15,1)	9,7 (6,9; 9,8)	7 (6,9; 9,1)	(p=0,023) 5,9 (5,1; 6,05)	7,96 (6,25; 9,07)	5,15 (3,21; 5,2)	5,79 (4,3; 6,04)	5,55 (5,2; 6,27)
Содержание сульфатированных муцинов в бокаловидных клетках, у.е.	9,01 (8,2; 9,2)	4,41 (4,2; 8,03)	* (p=0,028) 3,6 (3,14; 3,8)	3,75 (2,9; 4,3)	5,94 (4,81; 9)	4,9 (4,75; 5)	# (p=0,013) 4,3 (4,03; 7,5)	5,72 (3,8; 6,34)
Толщина подсли- зистой основы	13,6 (10,8; 14,2)	* (p=0,003) 21,6 (17,1; 24,1)	* (p=0,032) 33,0 (27,1; 39,8)	57,5 (36,8; 60,8)	11,3 (9,4; 11,8)	* (p=0,0008) 25,9 (18,7; 26,2)	40,2 (28,8; 48,6)	55,7 (44,7; 62)
Толщина мышеч- ной оболочки	33,8 (28; 40,2)	* (p=0,002) 117,7 (96,8; 163,3)	145,1 (138; 186)	275 (181,5; 301)	27,2 (25,3; 28,2)	* (p=0,0011) 114,2 (100; 143)	134,4 (108,8; 162,7)	* (p=0,02) 228,5 (217,6; 256,8)

В каждой возрастной группе было по 7 животных.

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): \* - при p<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой. # - при p<0,05 различия статистически значимы между проксимальным и дистальным отделами в данной возрастной группе

# 3.2. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО БАРЬЕРА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ У КРЫС ВИСТАР

Эпителиальный барьер ободочной кишки представлен слизью, колонизирующей ее микрофлорой и эпителием. Эпителиальная выстилка ободочной кишки образована выполняющими абсорбционную функцию колоноцитами и двумя типами секреторных клеток – бокаловидными и энтероэндокринными. Бокаловидные клетки продуцируют муцины, которые являются основным структурным компонентом слизи. Кишечная слизь препятствует адгезии и инвазии микроорганизмов, механическому повреждению слизистой оболочки, служит субстратом для комменсальной микрофлоры [6]. Большинство энтероэндокринных клеток являются серотонин-продуцирующими [36]. Серотонин регулирует абсорбцию, моторику кишечника, функции желез, пролиферацию эпителия.

## **Цитофизиологическая характеристика бокаловидных клеток в** постнатальном онтогенезе у крыс Вистар

Бокаловидные клетки — одноклеточные железы, продуцирующие слизь, которая образует на поверхности эпителия барьер, непроницаемый для бактерий и повреждающих веществ, а также служит субстратом для прикрепления и питания комменсальной микрофлоры. Основным компонентом слизи являются муцины — гликопротеины, состоящие из белковой оси и множества связанных с ней олигосахаридных цепей. Периферические участки олигосахаридных цепей модифицируются остатками серной и сиаловой кислот. При гистохимическом исследовании в бокаловидных клетках нами вывлялись нейтральные ШИК-позитивные и высокосульфатированные альциан-позитивные муцины, роль которых особенно важна, поскольку они высоко устойчивы к бактериальным гликозидазам [6]. На качественном уровне их содержание варьировало.

Нами показано, что у новорожденных крыс количество бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки не отичалось по сравнению с препубертатными, половозрелыми и старыми (Рис. 7, 11A). По сравнению с проксимальным отделом ободочной кишки в дистальном число бокаловидных клеток было в 2 раза больше. Содержание в них кислых и нейтральных муцинов в обоих отделах ободочной кишки не отличалось (Рис. 11Б,В; табл. 3).

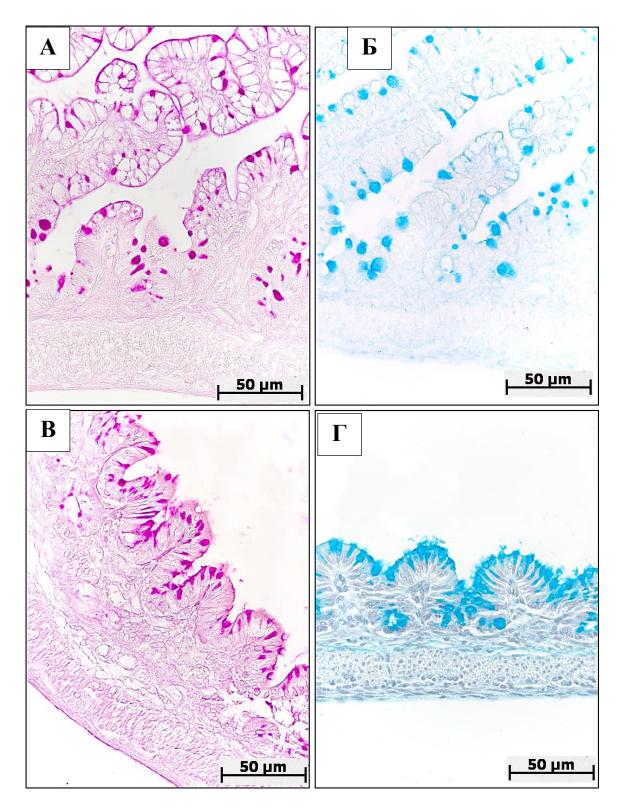


Рисунок 11. Бокаловидные клетки в слизистой оболочке проксимального (A,Б) и дистального (B, $\Gamma$ ) отделов ободочной кишки у новорожденных самцов крыс Вистар. ШИК-реакция (A,B) и окраска альциановым синим (Б, $\Gamma$ ). По сравнению с проксимальным в дистальном отделе число бокаловидных клеток больше

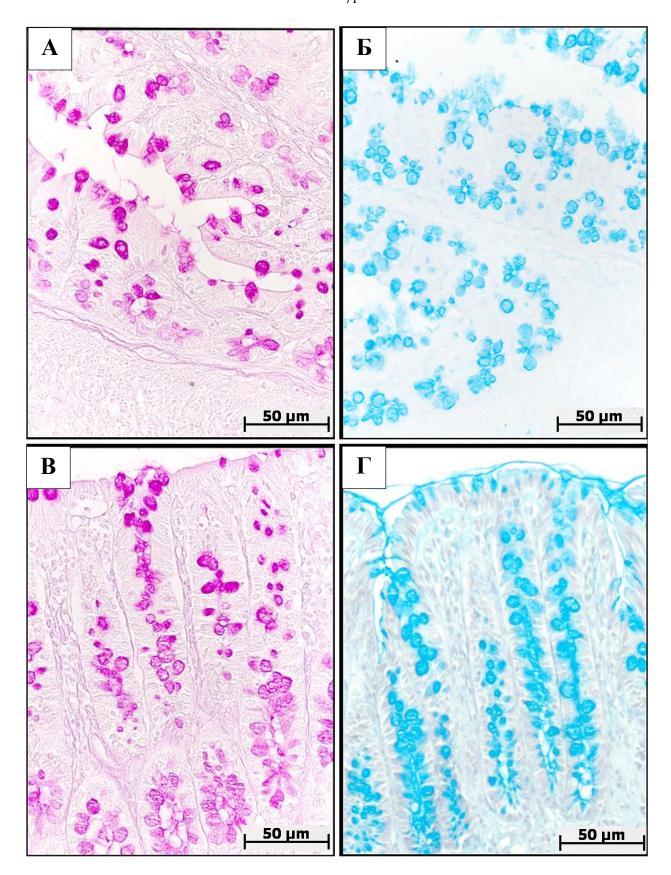


Рисунок 12. Бокаловидные клетки в слизистой оболочке проксимального (A,Б) и дистального (B,Г) отделов ободочной кишки у крыс Вистар препубертатного возрастного периода. ШИК-реакция (A,B) и окраска альциановым синим (Б,Г). По сравнению с проксимальным в дистальном отделе число бокаловидных клеток больше

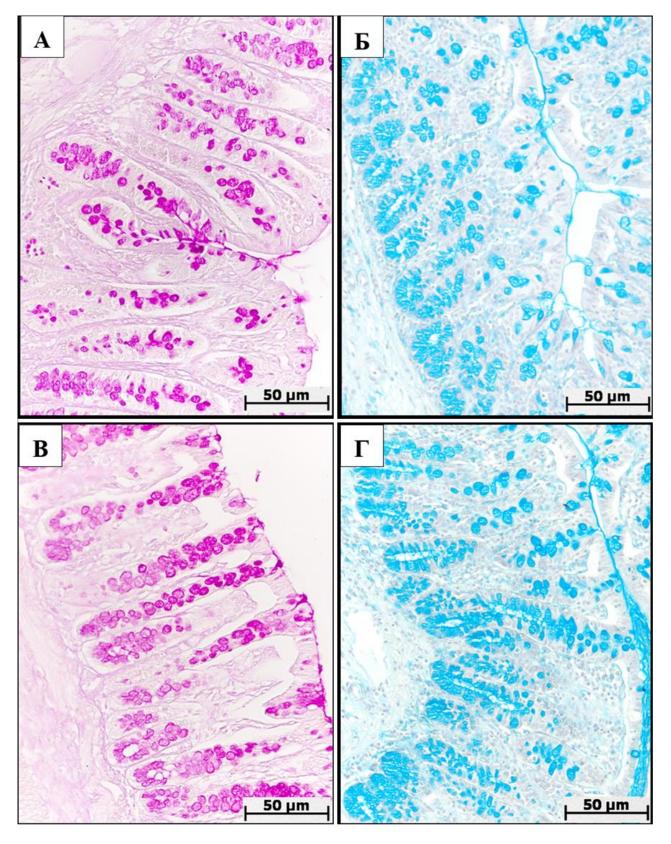


Рисунок 13. Бокаловидные клетки в слизистой оболочке проксимального (A,Б) и дистального (B,Г) отделов ободочной кишки у половозрелых крыс Вистар. ШИК-реакция (A,B) и окраска альциановым синим (Б,Г). По сравнению с проксимальным в дистальном отделе число бокаловидных клеток больше. В проксимальном отделе интенсивность окрашивания альциановым синим снижена (Б)

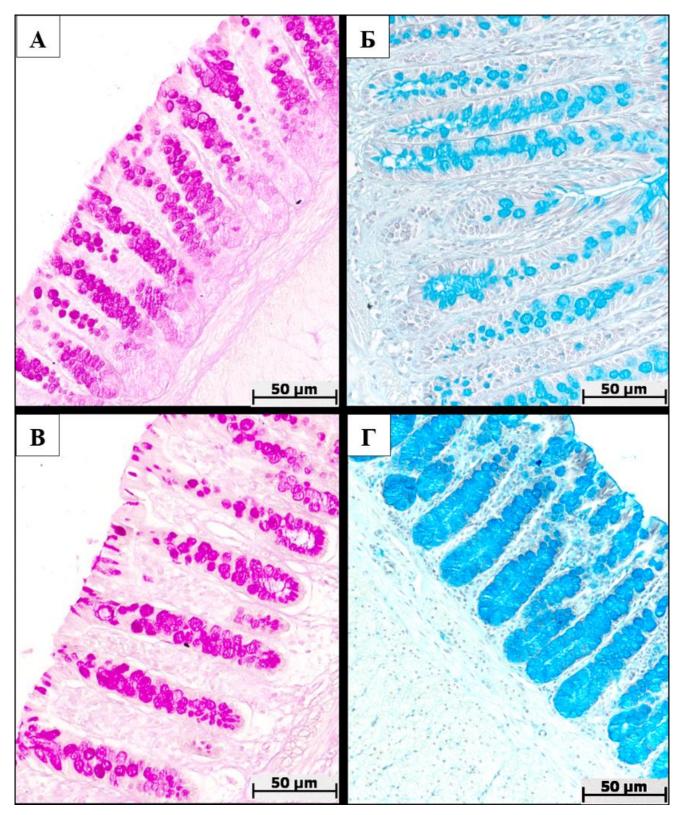


Рисунок 14. Бокаловидные клетки в слизистой оболочке проксимального (A,Б) и дистального (B,Г) отделов ободочной кишки у старых крыс Вистар. ШИК-реакция (A,B) и окраска альциановым синим (Б,Г). По сравнению с проксимальным в дистальном отделе число бокаловидных клеток больше. В проксимальном отделе интенсивность ШИК-реакции снижена (Б)

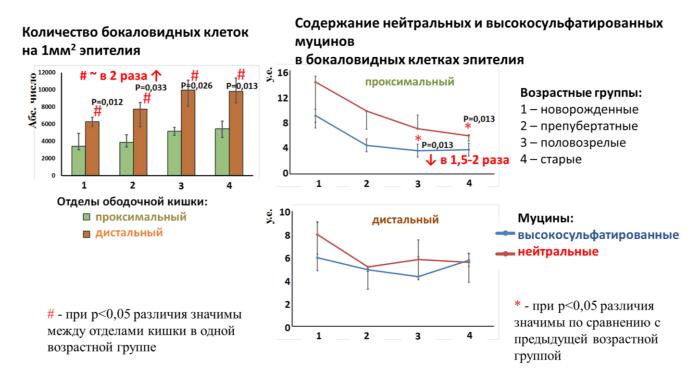


Рисунок 15. Количественная характеристика бокаловидных клеток и содержания в них муцинов, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при p<0,05 по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе

По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс число бокаловидных клеток не изменялось (рис. 15). По сравнению с проксимальным в дистальном отделе число бокаловидных клеток было в 2 раза больше (табл. 2). Показатели содержания кислых и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках обоих отделов ободочной кишки не отличались (рис. 15).

По сравнению с препубертатными у половозрелых животных число бокаловидных клеток не изменялось, в них снижалось в 1,5 раза содержание высокосульфатированных муцинов в проксимальном отделе (табл. 2). Сравнительное исследование разных отделов ободочной кишки у половозрелых животных показало, что по сравнению с проксимальным в дистальном отделе число бокаловидных клеток было больше в 2 раза (рис. 15; табл. 2).

По сравнению с половозрелыми у старых крыс количество бокаловидных клеток не изменялось (рис. 14), но в них снижалось содержание нейтральных муцинов в

проксимальном отделе (рис. 15; табл. 2). Содержание кислых и нейтральных муцинов в бокаловидных клетках в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки не отличалось (табл. 2).

Таким образом, у новорожденных, препубертатных, половозрелых и старых крыс в проксимальном отделе ободочной кишки количество бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке в 2 раза меньше, чем в дистальном. В проксимальном отделе ободочной кишки содержание кислых муцинов в бокаловидных клетках снижается к периоду половой зрелости в 1,5 раза, а нейтральных – к старости.

# Соотношение основных таксонов просветной микрофлоры в разные периоды постнатального развития у крыс Вистар

Важную роль в защите организма от патогенов играет микрофлора. Данные литературы о возрастных изменениях основных таксонов в составе просветной микрофлоры у крыс отсутствуют. Однако, известно, что у человека и лабораторных животных они варьируют [126]. В составе просветной микрофлоры методом полимеразной цепной реакции в реальном времени нами были оценены 5 основных таксонов: Firmicutes, Bacteroides, Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacteriaceae.

В период новорожденности отмечалось преобладание таксонов *Enterobacte*riaceae и *Firmicutes* (рис. 16; табл. 4).

По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс в составе просветной микрофлоры снижалась доля *Bifidobacteria*, но сохранялось преобладание *Firmicutes* (рис. 16; табл. 4).

К периоду половой зрелости по сравнению с новорожденными в составе просветной микрофлоры доля *Bacteroides* увеличивалась в 6500 раз, а *Enterobacteriaceae*, напротив, почти исчезали (рис. 16; табл. 4).

У старых животных по сравнению с половозрелыми достоверных различий в соотношении основных таксонов микрофлоры не выявлено (рис. 16; табл. 4).

Таким образом, в составе просветной микрофлоры у крыс с возрастом наблюдается увеличение доли *Bacteroides*, и, напротив, снижение - *Bifidobacteria* и *Enterobacteriaceae*. Доля *Lactobacillus* с возрастом значительно не изменяется.

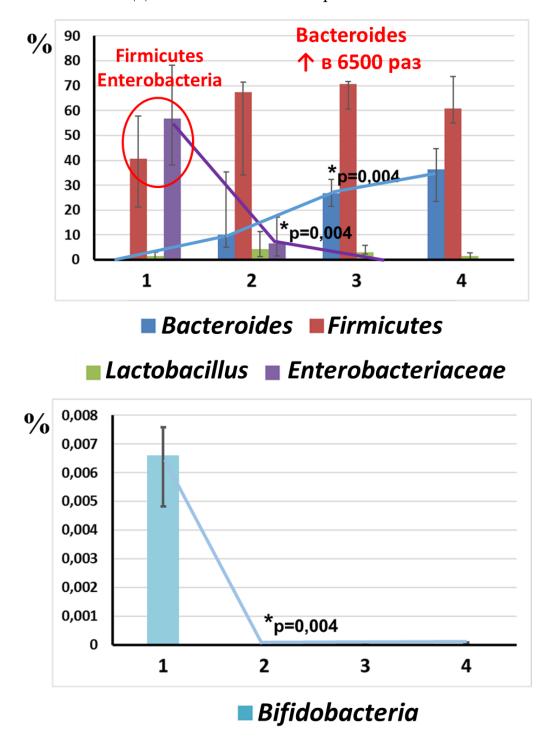


Рисунок 16. Возрастные изменения соотношения (%) основных таксонов просветной микрофлоры у крыс Вистар, Ме (L25;U75). Возрастные группы: 1 – новорожденные; 2 – препубертатные; 3 – половозрелые; 4 – старые. Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса при \*p<0,05 по сравнению с новорожденными

Таблица 4 Соотношение (%) основных таксонов просветной микрофлоры в разные периоды постнатального развития в ободочной кишке у крыс Вистар, Ме (L25;U75)

Таксоны	Возрастные группы							
	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые				
Bacteroides			↑ †p=0,008	†p=0,0002				
	0,004	10,09	26,82	36,38				
	(0,002; 0,006)	(4,93; 35,23)	(21,48; 32,41)	(23,46; 44,74)				
Firmicutes	40,53	67,33	70,78	60,79				
	(21,13; 57,75)	(34,11; 71,51)	(60,47; 71,70)	(55,08; 73,60)				
Bifidobacteria	0,0066	†p=0,0004	†p=0,0097	†p=0,0172				
	(0,0048; 0,0076)	$3,3x10^{-6}$	$4 \cdot 6,5 \times 10^{-6}$	$3,2x10^{-5}$				
		$(8,2x10^{-7}; 2,1x10^{-5})$	$(2.8 \times 10^{-6}; 9.2 \times 10^{-5})$	$(8,7x10^{-6};7,7x10^{-5})$				
Lactobacillus	1,4433	4,27	2,99	1,42				
	(0,0002; 3,0285)	(1,36; 11,33)	(2,37; 5,91)	(0,34;2,76)				
Enterobacteri-	56,8	6,478	†p=0,0287	†p=0,0003				
aceae	(38,1; 78,3)	(1,492; 17,147)	(17,147) $0.02$ $0.0$					
			(0,01; 0,04)	(0,0029; 0,0137)				

В каждой возрастной группе было по 6 животных.

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): † при вероятности ошибки **p≤0,05** различия статистически значимы между сравниваемой группой и возрастным периодом новорожденности

# Возрастные изменения популяции энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в разных отделах ободочной кишки и плазме крови у крыс Вистар

Энтероэндокринные клетки составляют около 1% эпителиальных клеток кишечника. Выделяемые ими гормоны регулируют пролиферацию эпителия, функцию желез желудочно-кишечного тракта, моторику кишечника, аппетит, висцеральную чувствительность [48]. Энтероэндокринные клетки, среди которых преобладают (энтерохромаффинные) ЕС-клетки, у человека синтезируют 90-95% серотонина, поступающего в кровь и депонирующегося в тромбоцитах [12]. Основным метаболитом серотонина в ободочной кишки является индолилуксусная кислота (5-hydroxiindolilacetic acid, 5-HIAA). Наряду с энтеральной нервной системой серотонин участвует в регуляции моторики ободочной кишки, секреции слизи, всасывании воды и электролитов [53]. Энтероэндокринные клетки накапливают и секретируют белок хромогранин А, являющийся маркером большинства клеток диффузной эндокринной системы [57].

В эпителиальной выстилке слизистой оболочки ободочной кишки у новорожденных крыс энтероэндокринные клетки были представлены небольшим количеством диффузно рассеянных клеток (рис. 17А; табл. 5). Содержание серотонина в этот возрастной период в плазме периферической крови и гомогенате ободочной кишки было наименьшим ( табл. 6,7). При сравнительном исследовании проксимального и дистального отделов ободочной кишки различий по показателям числа энтероэндокринных клеток, содержанию серотонина в крови и гомогенате ободочной кишки не выявлено (табл 5,6,7).

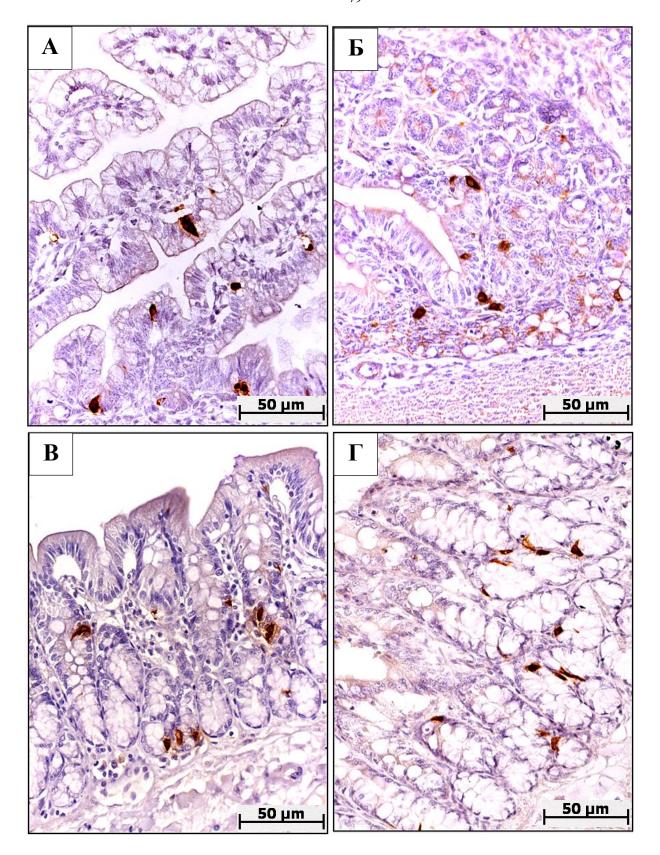


Рисунок 17. Энтероэндокринные клетки в слизистой оболочке проксимального отдела ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп. А – новорожденные; Б – препубертатные; В – половозрелые;  $\Gamma$  – старые. Иммуногистохимическая реакция с антителами к хромогранину А

Таблица 5 Показатели числа энтероэндокринных клеток на 1 мм2 эпителия ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп, Ме (L25;U75)

	Возрастные группы						
Отделы ОК	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые			
Проксимальный	87,3 (65,4;157,9)	* (p=0,0003) * (p=0,026) 220,8 (178,8;253,5)	# (p=0,029) 230,8 (181,8;283,3)	# (p=0,021) 278,2 (210,5;293,5)			
Дистальный	126,4 (81,9;169,6)	145,1 (74,8;170,9) 91,3 (58,8;112,		93,0 (68,4;141,6)			

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): \* - при p<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой. # - при p<0,05 различия статистически значимы между проксимальным и дистальным отделами в данной возрастной группе.

Таблица 6 Концентрация серотонина в гомогенате ободочной кишки у крыс Вистар разных возрастных групп, мкмоль / мг белка, Ме (L25;U75)

	Возрастные группы							
Отделы ОК	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые				
Проксимальный	1,9×10 <sup>-4</sup> (1,7×10 <sup>-4</sup> ; 2,1×10 <sup>-4</sup> )	* (p=0,005)  # (p=0,037)  0,015  (0,011; 0,030)	# (p=0,014) 0,017 (0,015; 0,034)	# (p=0,031) 0,024 (0,019; 0,037)				
Дистальный	$2,0\times10^{-4}  (1,7\times10^{-4}; 2,3\times10^{-4})$	0,0025 (0,0022; 0,0029)	0,003 (0,003; 0,005)	0,0027 (0,0020; 0,055)				

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): \* - при p<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой. # - при p<0,05 различия статистически значимы между проксимальным и дистальным отделами в данной возрастной группе.

Таблица 7 Концентрация серотонина (5 HT) и индолилуксусной кислоты (5-HIAA) в плазме крови у крыс Вистар разных возрастных групп, Ме (L25;U75)

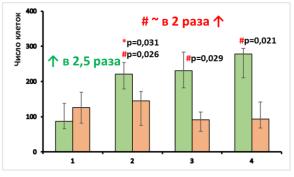
	Возрастные группы						
Параметры	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые			
Концентрация 5-НТ в плазме крови, мкмоль / мл	3,7×10 <sup>-4</sup> (2,3×10 <sup>-4</sup> ; 6,1×10 <sup>-4</sup> )	*(p=0,004)	3,1 (2,7; 3,4)	3,2 (2,7; 3,5)			
Соотношение 5-HT/5-HIAA в плазме крови, у.е.	4 (1,9; 5,1)	*(p=0,033) 89 (49,8; 201,2)	123 (56,1; 177,7)	138 (126,4; 350,1)			

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): \* - при p<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой.

По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс в 2,5 раза повышается количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки (в 50-80 раз) в проксимальном отделе, а в дистальном — не различалось (рис. 18; табл. 6). В препубертатный возрастной период у крыс содержание серотонина в периферической крови и соотношение с его основным метаболитом (5-HIAA) увеличивалось по сравнению с новорожденными животными в 6216 и 22 раз соответственно (табл. 7). По сравнению с дистальным в проксимальном отделе ободочной кишки количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина было выше (табл. 5,6,7).

По сравнению с препубертатными у половозрелых животных возрастных изменений показателей числа энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в обоих отделах ободочной кишки не выявлено (рис. 17В; табл. 5,6). В период половой зрелости в проксимальном отделе ободочной кишки по сравнению с дистальным в 2 раза больше число энтероэндокринных клеток и в 6-8 раз - содержание серотонина (табл. 5,6).





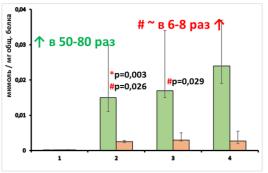
#### Отделы ободочной кишки:

■ проксимальный■ дистальный

#### Возрастные группы:

- 1 новорожденные
- 2 препубертатные
- 3 половозрелые
- 4 старые

#### Концентрация серотонина в гомогенате кишки



Концентрация серотонина в плазме крови

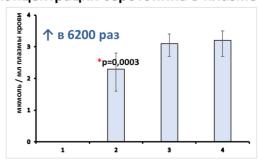


Рисунок 18. Возрастные изменения числа энтероэндокринных клеток, концентрации серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови у крыс, Ме (L25; U75). Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при p<0,05 по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе

В период старости у крыс по сравнению с половозрелыми животными возрастных изменений по показателям числа энтероэндокринных клеток и содержанию серотонина в обоих отделах ободочной кишки не выявлено (табл. 5,6,7). В этот возрастной период в проксимальном отделе ободочной кишки количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина было выше, чем в дистальном (рис. 18).

У животных разных возрастных групп выявлена прямая корреляционная связь высокой силы между показателями числа энтероэндокринных клеток, содержанием серотонина в периферической крови и гомогенате ободочной кишки (табл. 8).

Таким образом, с возрастом численность популяции энтероэндокринных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки у крыс увеличивается. В проксимальном отделе этот показатель у препубертатных, половозрелых и старых животных

больше, чем в дистальном. Число энтероэндокринных клеток в сравниваемых отделах ободочной кишки у новорожденных крыс не различается. Содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме крови с возрастом повышается. Установлена прямая корреляционная связь высокой силы между числом энтероэндокринных клеток и содержанием серотонина в плазме периферической крови и ободочной кишке.

Таблица 8 Значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена (|r|≤1) при сравнении показателей числа энтероэндокринных клеток, концентрации серотонина в плазме крови и гомогенате проксимального отдела ободочной кишки

Параметры	Число ЭЭК	Число ЭЭК Число ЭЭК		Число ЭЭК				
	новорожденные	препубертатные	половозрелые	старые				
5-НТ/мг белка новорожденные	0,93	-	-	-				
5-НТ/мг белка препубертатные	-	0,96	-	-				
5-НТ/мг белка половозрелые	-	-	0,95	-				
5-НТ/мг белка старые	-	-	-	0,77				
5-НТ/мл крови новорожденные	0,81	-	-	-				
5-НТ/мл крови препубертатные	-	0,87	-	-				
5-НТ/мл крови половозрелые	-	-	0,81	-				
5-НТ/мл крови старые	-	-	-	0,70				
Условные обозначения: 5-НТ – серотонин. ЭЭК- энтероэндокринные клетки								

# 3.3 ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛОКАЛЬНОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ

Неинкапсулированная лимфоидная ткань ободочной кишки, выполняющая защитную функцию, представлена агрегированными и небольшим количеством одиночных лимфоидных узелков, диффузно рассеянными лимфоцитами в слизистой оболочке [84]. Ее структурно-функциональное состояние, главным образом, зависит от состава микрофлоры и пищевых антигенов. Структурная оценка возрастных особенностей неинкапсулированной лимфоидной ткани проводилась у человека и лабораторных животных [84, 93]. В отличие от других работ, мы определяли количественные параметры агрегированных лимфоидных узелков на тотальных препаратах, фиксированных в 2% р-ре уксусной кислоты по методике, предложенной Ј. Bienenstock and R. Clancy [26]. При микроскопическом исследовании у животных всех возрастных групп, за исключением новорожденных, выявлялись группы лимфоидных узелков с герминативными центрами и широкой маргинальной зоной (рис. 20). В ряде работ оценка агрегированных лимфоидных узелков ободочной кишки проводилась на гистологических срезах, что не позволило оценить все лимфоидные узелки [63, 93]. Данные литературы о распределении агрегированных лимфоидных узелков в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у крыс отсутствуют.

Нами показано, что у крыс в период новорожденности в стенке проксимального и дистального отделов ободочной кишки агрегированные лимфоидные узелки отсутствовали (табл. 9).

По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс были выявлены небольшие агрегированные лимфоидные узелки, состоящие из 6-8 лимфоидных узелков. В этот возрастной период по сравнению с половозрелыми и старыми животными количество агрегированных лимфоидных узелков на 1 см<sup>2</sup> ободочной кишки было наибольшим, а их средняя площадь, напротив, наименьшей (рис. 21; табл. 9). В дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным средняя площадь агрегированных лимфоидных узелков и число лимфоидных узелков в них были в 2 раза больше. Региональных различий показателей числа агрегированных лимфоидных узелков на 1 см<sup>2</sup> ободочной кишки в препубертатный возрастной период у крыс не выявлено (табл. 9).

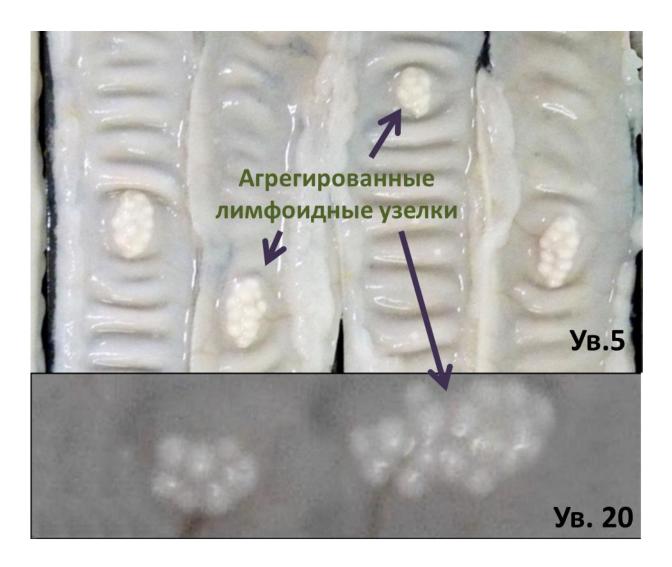


Рисунок 19. Макропрепарат ободочной кишки половозрелых самцов крыс Вистар, фиксированный в 2% водном растворе уксусной кислоты по J. Bienenstock and R. Clancy [26]. Видны агрегированные лимфоидные узелки

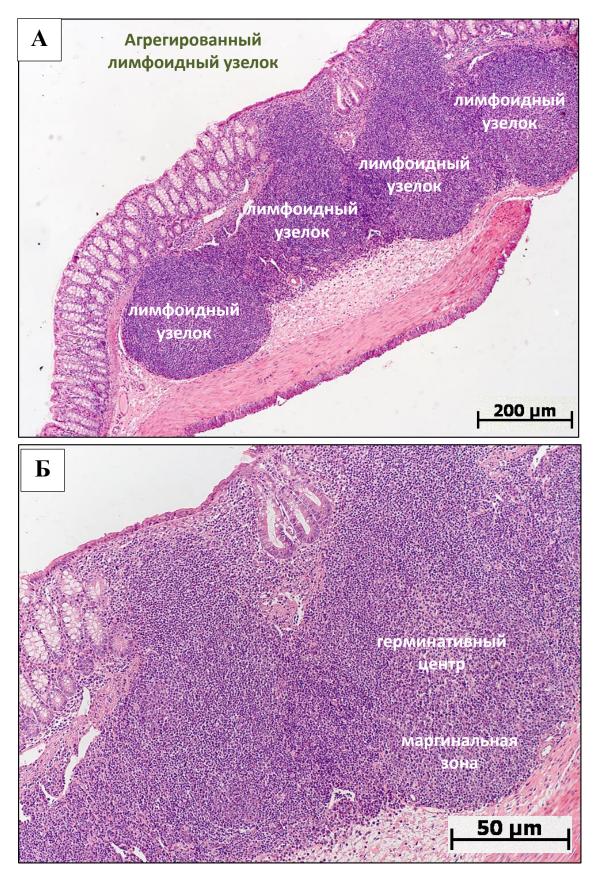


Рисунок 20. Агрегированные лимфоидные узелки в ободочной кишке у половозрелых крыс Вистар. В слизистой оболочке выявляются скопления лимфоидных узелков (A) с крупными герминативными центрами и широкой маргинальной зоной (Б). Окраска гематоксилином и эозином

По сравнению с препубертатным возрастным периодом у половозрелых животных значительно снижалось число агрегированных лимфоидных узелков на 1 см<sup>2</sup> ободочной кишки, в 3 раза увеличивалась их средняя площадь, а число лимфоидных узелков - не изменялось (рис. 19; табл. 9). В дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным были в 2 раза больше показатели средней площади агрегированных лимфоидных узелков и числа лимфоидных узелков в них. Региональных различий количества агрегированных лимфоидных узелков на 1 см<sup>2</sup> ободочной кишки в этот возрастной период не выявлено (рис. 19; табл. 9).

По сравнению с периодом половой зрелости у старых крыс в ободочной кишки показатели количественной оценки агрегированных лимфоидных узелков – числа на 1 см<sup>2</sup> ободочной кишки, их средней площади, и количества лимфоидных узелков в них - не изменялись (табл. 9). В этот возрастной период количество лимфоидных узелков в дистальном отделе ободочной кишки было в 2 раза больше, чем в проксимальном (рис. 21; табл. 9). Региональных различий количества агрегированных лимфоидных узелков на 1 см<sup>2</sup> ободочной кишки и их средней площади у старых крыс не выявлено.

Таким образом, у новорожденных крыс Вистар агрегированные лимфоидные узелки отсутствуют. К периоду половой зрелости число агрегированных лимфоидных узелков ободочной кишки снижается, а их площадь, напротив, увеличивается в 3 раза. Во все возрастные периоды, за исключением новорожденности, в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным в 2 раза выше показатели средней площади агрегированных лимфоидных узелков и числа лимфоидных узелков в них.

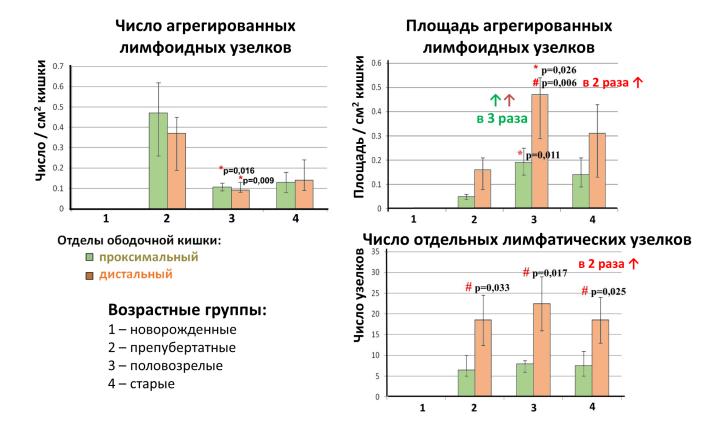


Рисунок 21. Возрастные изменения числа агрегированных лимфоидных узелков, их площади, и числа лимфоидных узелков в них, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при p<0,05 по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе

Таблица 9 Показатели количественной оценки агрегированных лимфоидных узелков в ободочной кишке у крыс Вистар разных возрастных групп, Ме (25;75)

Параметры	Проксимальный отдел Дистальный отдел							
	Новорожден-	Препубертат-	Половозре-	Старые	Новорожден-	Препубертат-	Половозре-	Старые
	ные	ные	лые		ные	ные	лые	
Количество								
агрегирован-							* (n=0 000)	
ных лимфо-					0	0,37	* ( <b>p=0,009</b> ) 0,09	0,14
идных узел-			* (p=0,016)		U	(0,19;0,44)	(0,07; 0,12)	(0,09;0,25)
ков на 1 см <sup>2</sup>		0,15	0.11	0,13			(0,07,0,12)	
кишки	0	(0,17;0,63)	(0,07;0,17)	(0,10;0,24)				
Площадь аг-							* (n=0.026)	
регирован-		0,05	<b>(p=0,011)</b>	0,14		# (p=0,033)	* (p=0,026)	0,31
ных лимфо-	0	(0,04; 0,06)	0,19	(0,09;0,21)	0	0,16	(p=0,006) 0,47	(0,13; 0,42)
идных узел-		(0,04, 0,00)	(0,14;0,24)	(0,03, 0,41)		(0,08;0,21)	(0,29; 0,54)	(0,13, 0,42)
ков, см <sup>2</sup>							(0,29, 0,34)	
Число лимфо-		6,5	8	7,5		# (p=0,033)	# (p=0,017)	# (p=0,035)
идных узел-	0	(5,0; 10)	_		0	18,5	22,5	18,5
ков		(3,0, 10)	(6,0; 8,7)	(5,0; 11,0)		(12,5; 24,5)	(16,0; 29,0)	(13,0; 24,0)

В каждой возрастной группе было по 6 животных.

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): \* - при p<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой и/или между проксимальным и дистальным отделами в данной возрастной группе - # (при p<0,05).

# 3.4. ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИСТОАРХИТЕКТОНИКИ МЕЖМЫШЕЧНОГО НЕРВНОГО СПЛЕТЕНИЯ В РАЗНЫХ ОТДЕЛАХ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У КРЫС ВИСТАР

Энтеральная нервная система — собственная нервная система желудочно-кишечного тракта, являющаяся одним из отделов автономной нервной системы. По отечественной классификации она входит в состав метасимпатической нервной системы [14]. Энтеральная нервная система наряду с энтероэндокринными клетками и интерстициальными клетками Кахаля регулирует моторику, секрецию слизи, всасывание воды и электролитов в ободочной кишки. Энтеральная нервная система состоит из двух крупных сплетений: межмышечного (Ауэрбаха) и подслизистого (Мейснера). Оба сплетения представлены ганглиями, состоящими из нейронов, глиальных клеток и нервных волокон, образованными аксонами нейронов и глиальных клеток. Межмышечное нервное сплетение иннервирует продольный и циркулярный слои мышечной оболочки, а подслизистое — слизистую оболочку и подслизистую основу.

Гистоархитектонику межмышечного нервного сплетения изучали на тотальных препаратах, маркированных антителами к βІІІ-тубулину. Клеточный состав ганглиев межмышечного нервного сплетения выявляли на гистологических срезах, маркированных антителами к HuC/D (нейроны) и S100b (глиальные клетки).

В период новорожденности у крыс на тотальных препаратах мышечной оболочки ободочной кишки выявляли сеть, состоящую из скоплений нейронов и соединяющих коротких нервных трактов. В этой сети пространства между ганглиями и нервными трактами были овальной формы, и они характеризовались наименьшей средней площадью по сравнению с другими возрастными группами (рис. 22A). Толщина межганглионарных нервных трактов в этот возрастной период также была минимальной. В период новорожденности у крыс на гистологических срезах ободочной кишки число ганглиев на 1 мм ее длины было максимальным, а площадь ганглиев, наоборот, минимальной (рис. 23A; табл. 10). Клетки ганглиев в обоих от-

делах ободочной кишки были представлены, главным образом, HuC/D+ нейронами, в среднем, около 6 нейронов на ганглий (рис. 25; табл. 10). Число S100b-позитивных глиальных клеток в этот возрастной период было минимальным и составляло 0-1 клетку на ганглий (рис. 25). Число профилей βIII-тубулин-позитивных внутримышечных нервных отростков на 1 мм² площади циркулярного слоя мышечной оболочки у новорожденных крыс было в 2 раза выше, а их толщина, напротив, ниже, чем у препубертатных, половозрелых и старых крыс (табл. 10). Региональных различий межмышечного нервного сплетения между отделами ободочной кишки в этот возрастной период не выявлено.

В препубертатном возрастном периоде так же, как и у новорожденных, межмышечное нервное сплетение было представлено ганглиями, нервными трактами, между которыми располагались так называемые межганглионарные пространства (рис. 22Б). В отличие от периода новорожденности у крыс этой возрастной группы средняя площадь межганглионарных пространств увеличивалась в проксимальном и дистальном отделах, соответственно, в 17 и 22 раза, и возрастала толщина нервных трактов в 1,7 и 1,5 раза (табл. 10). По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс ганглии были четко отграничены друг от друга, и их число статистически значимо снижалось в обоих отделах ободочной кишки в 3,5 раза, а площадь - увеличивалась в 3 раза (рис. 24; табл. 10). В составе ганглиев количество нейронов не изменялось, а число глиальных клеток возрастало и достигало 3-4 на ганглий (рис. 23Б; табл. 10). В обоих отделах ободочной кишки число внутримышечных нервных отростков снижалось в 2 раза, а их толщина - увеличивалась в 1,5 раза (рис. 26; табл. 10). Структурных различий межмышечного нервного сплетения между отделами ободочной кишки у препубертатных животных выявлено не было (табл. 10).

В период половой зрелости по сравнению с препубертатными животными показатели средней площади межганглионарных пространств и толщины нервных трактов не изменялись, и не было выявлено различий по числу, площади и клеточному составу ганглиев (рис. 24, 25; табл. 10). Региональных различий гистоархитектоники межмышечного нервного сплетения в проксимальном и дистальном отделах ободочной кишки у препубертатных животных выявлено не было (табл. 10).

По сравнению с половозрелыми крысами у старых животных по показателям площади межганглионарных пространств и толщины нервных трактов изменений не было (рис. 22; табл. 10). По сравнению с периодом половой зрелости число ганглиев в ободочной кишки у старых крыс не изменялось, а площадь ганглиев в проксимальном и дистальном отделах была выше в 1,7 и 1,5 раза соответственно (рис. 24; табл. 10). Изменений клеточного состава ганглиев, показателей количества нервных волокон и их толщины у старых крыс обнаружено не было (табл. 10).

Сравнительное исследование межмышечного нервного сплетения в разных отделах ободочной кишки показало, что в возрастных группах новорожденных, препубертатных, половозрелых и старых крыс региональных различий по всем изученным показателям не выявлено (табл. 10).

Таким образом, в период от новорожденности до препубертатного у самцов крыс Вистар отмечается интенсивный рост межмышечного нервного сплетения, характеризующийся увеличением площади межганглионарных пространств и толщины нервных трактов. Возрастные изменения межмышечного нервного сплетения характеризуются снижением относительного числа ганглиев и пропорциональным увеличением их размеров. Гистоархитектоника межмышечного нервного сплетения в разных отделах ободочной кишки у новорожденных, препубертатных, половозрелых и старых крыс не отличается.

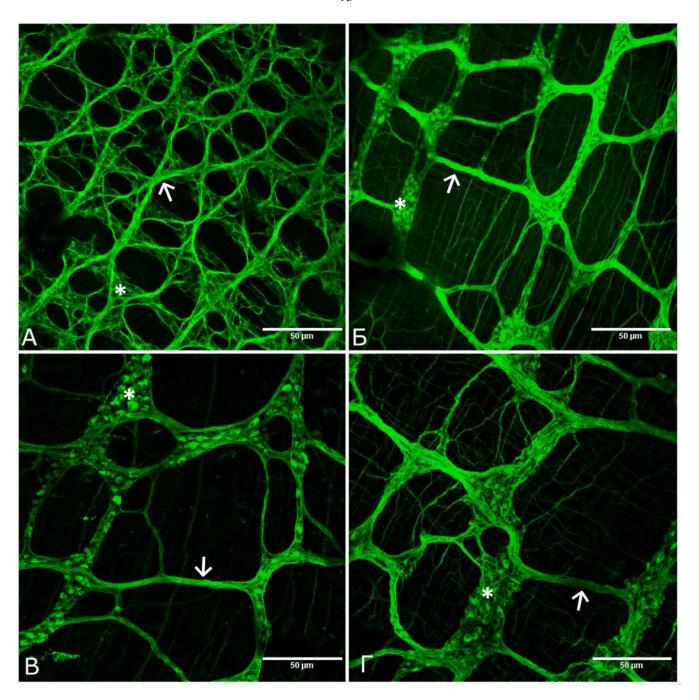


Рисунок 22. Маркированные антителами к  $\beta$ III-тубулину тотальные препараты мышечной оболочки ободочной кишки крыс Вистар разных возрастных групп. А — период новорожденности: межмышечное нервное сплетение представлено скоплениями нейронов (\*), соединенными в сеть короткими нервными трактами ( $\uparrow$ ), образующими небольшие межганглионарные нервные пространства. Возрастные периоды: Б —препубертатный; В — половой зрелости;  $\Gamma$  — старости. Межмышечное нервное сплетение представлено сформированными ганглиями, нервными трактами, большими межганглионарными пространствами

Таблица 10 Показатели количественной оценки межмышечного нервного сплетения в разных отделах ободочной кишки, Me (L25;U75)

Параметры		Проксималы	ный отдел			Дистальный	і отдел	
	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые	Новорожденные	Препубертатные	Половозрелые	Старые
Площадь межган- глионарных про- странств, мкм <sup>2</sup>	1981 (1167; 2336)	* (p=0,03) 36216 (29505; 41183)	35305 (26054; 39997)	48642 (44997; 72274)	1685 (1265; 2081)	* (p=0,033) 42088 (34465; 43366)	63992 (53085; 66783)	52625 (48224; 64299)
Толщина межган- глионарных нерв- ных трактов, мкм	8,73 (8,26; 11, 35)	* (p=0,031) 15,57 (14,68; 18,90)	13,98 (13,23; 15,77)	16,62 (16,22; 18,26)	8,72 (8,07; 10,43)	13,6 (12,1; 18,17)	16,6 (13,23; 18,17)	16,2 (15,37; 16,9)
Число ганглиев на 1 мм длины ОК	3,5 (3,3; 3,8)	*(p=0,014) 0,93 (0,88; 1,20)	0,85 (0,47; 0,91)	0,82 (0,56; 0,94)	3,73 (3,26; 4,12)	* (p=0,011) 1,07 (0,95; 1,15)	* (p=0,020) 0,49 (0,41; 0,59)	0,52 (0,44; 0,64)
Площадь ганглиев, мкм <sup>2</sup>	344 (261; 375)	* (p=0,014) 1189 (607; 1279)	1036 (710; 1094)	* (p=0,034) 1796 (1570; 2205)	262 (200; 318)	* (p=0,010) 871 (699; 910)	1303 (1087; 1507)	* (p=0,034) 1997 (1606; 3002)
Абсолютное число нейронов в ганглии	5,2 (4,5; 5,6)	6,51 (5,02; 7,52)	4,3 (3,0; 5,9)	4,41 (3,50; 6,96)	4,0 (3,9; 5,55)	6,5 (6,0; 8)	4,4 (4,0; 5,2)	5,6 (3,78; 7,2)
Абсолютное число глиальных клеток в ганглии	1,0 (0,8; 1,5)	* (p=0,012) 3,0 (2,7; 4,0)	3,5 (2,8; 4,1)	3,4 (3,1; 5,7)	1,6 (0,95; 2,2)	* (p=0,009) 3,4 (3,0; 5,1)	4,0 (3,8; 5,0)	5,5 (3,5; 7,5)
Число внутримы- шечных нервных волокон, ед / мм <sup>2</sup> мышечной обо- лочки	500 (486; 519)	* (p=0,02) 231 (210; 288)	166 (130; 216)	200 (177; 264)	525 (479; 576)	* (p=0,03) 245 (221; 278)	137 (120; 229)	143 (117; 223)
Толщина внутри- мышечных нерв- ных волокон, мкм	0,9 (0,8; 1,1)	* (p=0,02) 1,4 (1,3; 1,7)	1,81 (1,7; 2,0)	1,7 (1,6; 1,8)	0,84 (0,79; 0,9)	* (p=0,03) 1,5 (1,37; 1,55)	1,6 (1,5; 1,72)	1,58 (1,46; 1,70)

Статистическая значимость различий (ANOVA Крускала-Уоллиса): \* - при p<0,05 различия статистически значимы по сравнению с предыдущей возрастной группой. Региональных различий не выявлено

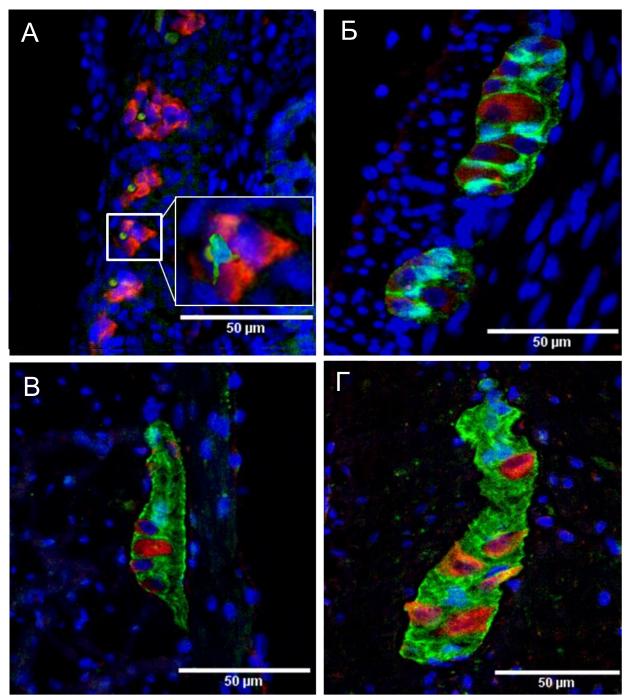


Рисунок 23. Ганглии межмышечного нервного сплетения у крыс Вистар в динамике наблюдения. Маркер тел нейронов - антитела к HuC/D (красный цвет) и глиальных клеток – S100b (зеленый цвет). В синий цвет окрашены ядра всех клеток (краситель DAPI). Ганглии новорожденных (А), препубертатных (Б), половозрелых (В) и старых (Г) крыс. Иммунофлуоресцентная микроскопия

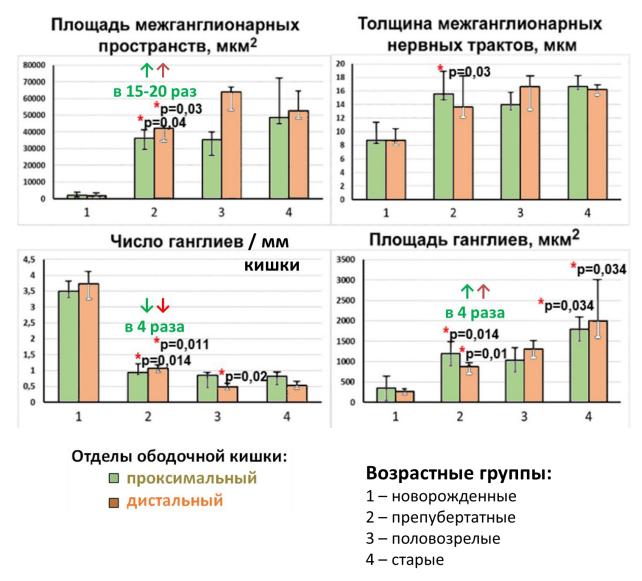


Рисунок 24. Количественная характеристика межмышечного нервного сплетения ободочной кишки разных возрастных групп, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при p<0,05 по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе



Рисунок 25. Клеточный состав ганглиев межмышечного нервного сплетения ободочной кишки разных возрастных групп, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при p<0,05 по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе

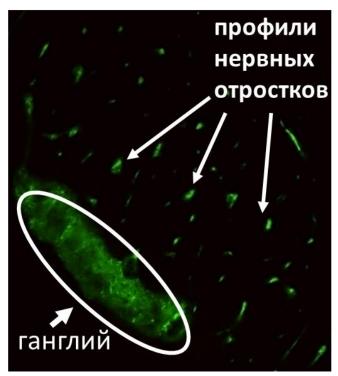


Рисунок 26. Маркированный антителами к βIII-тубулину гистологический срез мышечной оболочки ободочной кишки крыс Вистар разных возрастных групп

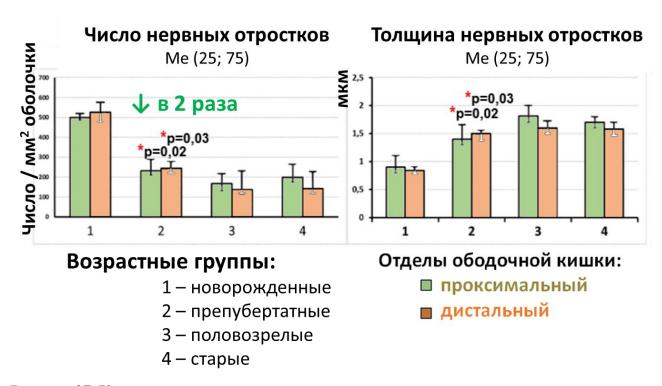


Рисунок 27. Количественная характеристика внутримышечных нервных отростков, маркированных антителами к βIII-тубулину на гистологических срезах ободочной кишки, Ме (L25;U75). Различия статистически значимы ANOVA Крускала-Уолиса: \* - при р<0,05 по сравнению с предыдущей возрастной группой; # - между проксимальным и дистальным отделами в одной возрастной группе

# ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Возрастные структурно-функциональные изменения ободочной кишки крыс недостаточно изучены, представленные в литературе сведения, посвященные данной тематике, фрагментарны и противоречивы (табл. 1). В последние десятилетия установлена тесная взаимосвязь ряда заболеваний, таких как аутизм, болезнь Гиршпрунга, воспалительные заболевания кишечника, депрессия, диабет, болезнь Альцгеймера, Паркинсона и др. со структурно-функциональными нарушениями толстой кишки и изменениями состава колонизирующей ее микрофлоры [49, 91, 102]. Указанные заболевания развиваются в разные возрастные периоды - от новорожденности до старости, а для их коррекции широко используются препараты микробного происхождения — пробиотики, пребиотики, и другие. Для доклинической оценки препаратов микробного происхождения используют, главным образом, крыс [7].

В связи с изложенным, цель работы - охарактеризовать изменения возрастной структурной организации эпителия, иммунной и энтеральной нервной систем ободочной кишки у крыс Вистар является актуальной.

Выбор периодов постнатального развития животных, использованных в работе, обусловлен тем, что в период новорожденности у крыс кишечник колонизируется микрофлорой, нервная и эндокринная регуляция его перистальтики не развита [33]. У препубертатных животных происходит переход с молочного вскармливания на твердый корм, в связи с чем изменяется состав микрофлоры [90]. У половозрелых животных моторика ободочной кишки и состав микрофлоры стабильный [60], а у старых - снижается частота и амплитуда сокращений тонкой и толстой кишки и замедляется транзит содержимого [27].

Толстая кишка, функцией которой является абсорбция воды и формирование каловых масс, максимально заселена микрофлорой, играющей важную роль в регуляции перистальтики, процессов секреции, всасывания, синтезе биологически активных веществ [60]. Функционирование толстой кишки за-

висит от пищевых и бактериальных антигенов, состояния эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем. Эпителиальный барьер ободочной кишки образован слизью, микрофлорой, и эпителиальной выстилкой [60]. Эпителиальная выстилка представлена всасывающими каемчатыми колоноцитами и двумя типами секреторных клеток — бокаловидными и энтероэндокринными. Бокаловидные клетки секретируют муцины, являющиеся основным структурным компонентом слизи, а большинство энтероэндокринных клеток ободочной кишки продуцируют серотонин и другие биогенные амины [5, 9]. Лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой ободочной кишки выполняет функцию иммунной защиты и представлена, в основном, агрегированными лимфоидными узелками, состоящими из одиночных лимфатических узелков [20]. Регуляция моторной и секреторной функций ободочной кишки осуществляется энтеральной нервной системой, состоящей из двух сплетений - межмышечного и подслизистого [47].

Литературные данные об изменениях у крыс разных возрастных групп структурных компонентов стенки ободочной кишки, эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем представлены в таблице (табл. 1) в главе «Обзор литературы».

## Возрастные структурные изменения ободочной кишки

При морфологическом исследовании нами показано, что у новорожденных крыс стенка проксимального отдела ободочной кишки тонкая, в слизистой оболочке крипты не сформированы, визуализируются «ворсинко-подобные структуры». К препубертатному возрастному периоду стенка просимального отдела утолщается, слизистая оболочка остается складчатой. Крипты узкие глубокие, подслизистая основа и мышечная оболочка хорошо выражены. В период половой зрелости в проксимальном отделе скаладки сохраняются. У старых крыс каких-либо патологических изменений не выявлено. В дистальном отделе ободочной кишки во все возрастные периоды складки отсутствуют. Выявленные на качественном уровне уровне морфологические особенности

возрастных изменений структур ободочной кишки подтверждаются морфометрическими данными. В проксимальном отделе в период от новорожденности до препубертатного отмечается рост толщины слизистой оболочки, глубины крипт и мышечной оболочки в 4-6 раз. В дистальном отделе выявлены аналогичные изменения, но менее выраженные. Известно, что по сравнению с половозрелыми животными у новорожденных крыс ободочная кишка характеризуется наименьшей длиной, шириной просвета, толщиной ее стенки [38]. В работе J. Pácha [95] у крыс также были выявлены «ворсинко-подобные структуры», которые увеличивают площадь абсорбции аминокислот, транспорт углеводов, воды и электролитов у крыс в раннем постнатальном онтогенезе. Толщина мышечной оболочки у старых крыс больше, чем у половозрелых, что соответствует данным К. Bitar et al. [27]. Увеличение толщины мышечной оболочки у старых крыс обусловлено увеличением числа и размеров гладких миоцитов, повышенным содержанием коллагеновых и эластических волокон. Показано, что гладкие миоциты ободочной кишки у старых крыс короче, чем у половозрелых и их сократительная функция снижена [27].

Таким образом, полученные нами сведения об увеличении толщины структур ободочной кишки в период от новорожденности до препубертатного у крыс Вистар согласуются с литературными данными. В отличие от других работ, посвященных систематизации структурной организации ободочной кишки у крыс Вистар, нами показано, что возрастные изменения происходят в обоих отделах ободочной кишки, но наибольшей выраженности они достигают в проксимальном отделе.

# Возрастные цитофизиологические изменения бокаловидных клеток ободочной кишки

При гистохимическом исследовании в бокаловидных клетках эпителия ободочной кишки нами вывлены нейтральные ШИК-позитивные и высокосульфатированные альциан-позитивные муцины, роль последних особенно важна, поскольку они высокоустойчивы к бактериальным гликозидазам [6].

При качественном морфологическом исследовании интенсивность их окрашивания варьировала, как в бокаловидных клетках разных отделов ободочной кишки, так и у животных разных возрастных групп. Количество бокаловидных клеток, визуализируемых при ШИК-реакции, в период от новорожденности до старости не изменялось, но в дистальном отделе во все возрастные периоды их число было в 2 раза больше, чем в проксимальном. Это, очевидно, обусловлено тем, что у половозрелых крыс в дистальном отделе ободочной кишки содержится максимальное количество бактерий [82]. В литературе отсутствуют сведения о возрастных изменениях числа бокаловидных клеток у новорожденных, препубертатных, и половозрелых животных. Вместе с тем, известно, что у старых крыс по сравнению с половозрелыми снижается число бокаловидных клеток в проксимальном и дистальном отделах [86].

Содержание муцинов в бокаловидных клетках оценивалось на гистологических срезах по интенсивности окрашивания продукта реакции. Нами впервые показано, что в проксимальном отделе в период от новорожденности до половой зрелости в 1,5-2 раза снижается содержание высокосульфатированных муцинов. Содержание нейтральных муцинов в проксимальном отделе ободочной кишки уменьшается у старых крыс по сравнению с новорожденными. В дистальном отделе возрастных изменений числа бокаловидных клеток и содержания в них муцинов не выявлено. По данным литературы у новорожденных крыс эпителиальный барьер ободочной кишки незрелый, что обусловлено недостаточной продукцией нейтральных муцинов по сравнению с половозрелыми животными [29]. В этой работе не проводилось сравнение проксимального и дистального отделов ободочной кишки, что не позволяет учесть высокую вариабельность изучаемых показателей в дистальном отделе.

Таким образом, нами впервые показано, что у новорожденных крыс эпителиальный барьер является функционально зрелым. В отличие от других работ нами не вывлено возрастных изменений числа бокаловидных клеток, но обнаружено снижение продукции устойчивых к бактериальным гликозидазам высокосульфатированных муцинов к половой зрелости и нейтральных муцинов – у старых крыс. Действительно, частота воспалительных заболеваний кишечника у человека в эти возрастные периоды повышается, что может быть обусловлено нарушениями физико-химических свойств муцинов [106].

## Возрастные изменения основных таксонов просветной микрофлоры

Существенную роль в защите организма от патогенов играет микрофлора, которая вместе с эпителиальным барьером и слизью образует биопленку. Литературные данные о возрастных изменениях просветной микрофлоры ободочной кишки у крыс отсутствуют. С. Nasuti et al [90] выявляли 5 основных таксонов микрофлоры у препубертатных и половозрелых крыс Вистар: Bacteroides, Firmicutes, Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacteriaceae. Методом количественной ПЦР в реальном времени соотношение экспрессии именно этих таксонов определялось в нашей работе. Нами установлено, что у крыс во все возрастные периоды преобладает таксон Firmicutes, часть из которых – таксон *Clostridium* - продуцирует серотонин [18]. В период новорожденности крысы находятся на молочном вскармливании, и в составе просветной микрофлоры обнаруживаются Bifidobacteria, Enterobacteriaceae. В препубертатном периоде и особенно у половозрелых животных в рационе преобладает твердый корм. Поэтому величина относительной эксперессии Bacteroides, способствующих усвоению клетчатки [90], к периоду половой зрелости увеличивается в несколько тысяч раз. При этом, другие таксоны, за исключением Firmicutes, напротив, почти исчезают.

Таким образом, у крыс нами впервые выявлены изменения соотношения основных таксонов просветной микрофлоры, которое устанавливается к половой зрелости и остается стабильным у старых животных. Это, с одной стороны, свидетельствует о том, что соотношение основных таксонов микрофлоры у крыс, в первую очередь, зависит от рациона питания, а не от возраста. С другой стороны, вырабатываемый таксоном *Clostridium* (*Firmicutes*) серотонин способен влиять на многие физиологические процессы в организме во все

периоды постнатального развития. По данным литературы, микрофлора определяет также морфофункциональное состояние иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой ободочной кишки, участвует в регуляции моторики, секреции и всасывания, а также продукции биологически активных веществ - нейромедиаторов, витаминов, короткоцепочечных жирных кислот [91].

# Возрастные изменения количества энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови

До 90% серотонина в организме продуцируют энтероэндокринные клетки [54]. По другим данным, от 15 до 60% серотонина, образующегося в толстой кишке, продуцируют облигатные спорогенные бактерии [131]. В кишке серотонин стимулирует моторику, секрецию слизи и тормозит всасывание воды. Через кровеносные сосуды серотонин попадает в кровь, где способствует агрегации тромбоцитов, активирует иммунный ответ, и стимулирует дифференцировку остеобластов в остеоциты [54]. Широкий спектр действия серотонина обусловлен множеством типов рецепторов на поверхности колоноцитов, нейронов, иммунных клеток и др. [25].

В нашей работе были изучены возрастные изменения числа энтероэндокринных клеток, выявляемых антителами к хромогранину А, содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме крови при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В составе эпителиальной выстилки количество энтероэндокринных клеток, выявляемых антителами к хромогранину А, во все возрастные периоды варьировало. В отличие от проксимального отдела в дистальном энтероэндокринные клетки были немногочисленными. Численность популяции энтероэндокринных клеток у крыс увеличивается в 2,5 раза от новорожденности к пре-

пубертатному возрастному периоду, что коррелирует с повышением содержания серотонина в гомогенате ободочной кишки (в 50-80 раз) и плазме периферической крови (в 6200 раз). В проксимальном отделе у препубератаных, половозрелых и старых животных число энтероэндокринных клеток в 2 раза больше, чем в дистальном, а у новорожденных региональные различия отсутствуют. Литературные сведения о распределении энтероэндокринных клеток в ободочной кишке у крыс ограничиваются данными, полученными на половозрелых животных. Известно, что в этот возрастной период количество энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки выше в проксимальном отделе ободочной кишки, чем в дистальном [92], что согласуется с нашими данными.

Таким образом, возрастные изменения энтероэндокринных клеток и содержания серотонина в ободочной кишке у новорожденных, препубертатных и старых крыс изучены нами впервые.

## Возрастные изменения агрегированных лимфоидных узелков

Неинкапсулированная лимфоидная ткань ободочной кишки представлена, в основном, агрегированными лимфоидными узелками, состоящими из одиночных лимфатических узелков [94]. Состояние этого локального компартмента регулируется центральными органами иммунной системы и зависит, главным образом, от местной антигенной стимуляции [20]. С целью защиты слизистой оболочки ободочной кишки от кишечных инфекций плазмоциты собственной пластинки слизистой оболочки и В-лимфоциты агрегированных лимфоидных узелков продуцируют секреторный IgA в форме димера, который попадает в клетки эпителия и высвобождается в просвет кишечника. Секреторный IgA осуществляет активацию комплемента, опсонизацию антигенов, препятствует адгезии микроорганизмов к эпителиальным клеткам ободочной кишки [94].

В отличие от других работ, для визуализации агрегированных лимфоидных узелков ободочной кишки мы применяли метод, разработанный J.

Bienenstock and R. Clancy для оценки лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами [26]. На тотальных препаратах, фиксированных в 2% уксусной кислоте проводили подсчет агрегированных лимфоидных узелков на стандартной площади ободочной кишки, определяли площадь и число лимфоидных узелков в них.

У новорожденных крыс агрегированные лимфоидные узелки отсутствовали. А. Варtista et al. показали, что в период новорожденности у мышей агрегированные лимфоидные узелки обнаруживаются только в виде микроскопических скоплений клеток-индукторов лимфоидной ткани CD3<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>RORγ<sup>+</sup> в собственной пластинке слизистой оболочки [20].

Нами впервые показано, что в препубертатный возрастной период наибольшее количествово агрегированных лимфоидных узелков на стандартной площади ободочной кишки. Значения этого показателя снижаются к половой зрелости, и у старых животных он не изменяется. Средняя площадь агрегированных лимфоидных узелков увеличивается в 3 раза от препубертатного возрастного периода к половой зрелости, и к старости не изменяется. Средняя площадь агрегированных лимфоидных узелков и число отдельных узелков в них в 2 раза больше в дистальном отделе, чем в проксимальном у препубертатных, половозрелых и старых крыс. Это обусловлено большим количеством микрофлоры в дистальном отделе по сравнению с проксимальным [6]. В литературе отсутствуют сведения о возрастных изменениях неинкапсулированной лимфоидной ткани у препубертатных и половозрелых крыс, однако известно, что у старых животных по сравнению с половозрелыми количество агрегированных лимфоидных узелков и их площадь не изменяются [86]. Эти данные согласуются с полученными в нашей работе. По другим сведениям, у половозрелых крыс количество агрегированных лимфоидных узелков и число узелков в них в проксимальном отделе ободочной кишки не отличается от дистального [84, 93].

Таким образом, нами впервые охарактеризованы возрастные изменения агрегированных лимфоидных узелков в ободочной кишке у крыс. У новорожденных животных агрегированные лимфоидные узелки отсутствуют. В препубертатный возрастной период в стенке ободочной кишки выявляются агрегированные лимфоидные узелки и по сравнению с другими возрастными периодами их число максимальное. В периоды половой зрелости и старости число агрегированных лимфоидных узелков стабильное, но их площадь больше, чем у препубертатных животных. По сравнению с проксимальным в дистальном отделе ободочной кишки выше показатели площади агрегированных лимфоидных узелков и числа узелков в них, что обусловлено большим количеством микробных антигенов в этом отделе ободочной кишки.

Следует отметить, что систематизированные представления о возрастных изменениях агрегированных лимфоидных узелков у новорожденных, препубертатных, половозрелых и старых крыс получены нами впервые, и могут быть использованы в доклинической оценке бактериальных препаратов.

## Возрастные изменения межмышечного нервного сплетения

Важной системой, регулирующей все функции ободочной кишки, является энтеральная нервная система [11]. Пренатальное развитие энтеральной нервной системы изучено достаточно хорошо. Энтеральная нервная система развивается из клеток нервного гребня, которые мигрируют в стенку кишки в двух противоположных направлениях [47]. К 14 суткам пренатального развития у крыс вся ободочная кишка колонизирована нейробластами. В постнатальном развитии энтеральная нервная система представлена двумя нервными сплетениями: межмышечным и подслизистым. Оба сплетения состоят из гангиев и нервных отростков. Благодаря ей совершаются рефлекторные акты. Эти функции могут модулировать продуцируемый энтероэндокринными клетками и микрофлорой серотонин, в частности, он усиливает моторику, но ингибирует абсорбционную функцию[18].

В работе проведено иммунофлуоресцентное исследование тотальных препаратов мышечной оболочки с применением антител к ВІІІ-тубулину. На качественном уровне у новорожденных сеть межмышечного нервного сплетения мелкоячеистая, нервные тракты относительно тонкие, затем идет их увеличение к препубертатному периоду, и у половозрелых и старых крыс изменеий не выявлено. При количественной оценке структур межмышечного нервного сплетения на тотальных препаратах определяли толщину нервных трактов, площадь межганглионарных пространств. На гистологических срезах проводили подсчет числа ганглиев на стандартной длине ободочной кишки, определяли площадь и клеточный состав ганглиев. В период новорожденности у крыс площадь ганглиев и межганглионарных пространств минимальная. К препубертатному периоду эти показатели увеличиваются в 4 и 15-20 раз соответственно. К половой зрелости и старости структурных изменений межмышечного нервного сплетения не выявлено. Дегенеративных изменений структур нервного сплетения у старых крыс не обнаружено. В литературе отсутствуют количественные данные о структуре нервной сети у новорожденных, препубертатных, половозрелых и старых крыс. Известно, что у препубертатных крыс межмышечное нервное сплетение образует сеть, нервные тракты выражены [39].

Клеточный состав ганглиев на гистологических срезах ободочной кишки нами исследован с помощью маркера нейронов – HuC/D и маркера глиальных клеток - S100b. В период новорожденности у крыс в ганглиях преобладают нейроны, а глиальные клетки единичные. У препубертатных, половозрелых и, особенно, у старых крыс нейропиль в ганглиях хорошо выражен по сравнению с периодом новорожденности. По данным количественной оценки, число нейронов в ганглиях стабильно во все периоды постнатального развития, а число глиальных клеток в ганглиях – повышается в 3-4 раза в период от новорожденности к препубертатному и не изменяется у половозрелых и старых крыс. Таким образом, именно рост числа глиальных клеток в ганглиях обу-

словливает увеличение размеров ганглиев к препубертатному возрастному периоду. По литературным данным, ганглии у новорожденных крыс формируют цепь [124], состоящую из единичных NOS+ и VIP+ нейронов [81], глиальных S100b+ и GPAP+ клеток [39]. Сведения об изменении клеточного состава ганглиев к препубертатному возрастному периоду в литературе отсутствуют. В отличие от наших данных, Phillips R. et al. [100] показали, что у старых крыс по сравнению с половозрелыми общее число HuC/D+нейронов и S100b+глиальных клеток ободочной кишки снижается на 64%.

Для количественной оценки поперечных профилей внутримышечных нервных отростков проводили иммунофлуоресцентное окрашивание гистологических срезов ободочной кишки с применением антител к к βІІІ-тубулину. Нами впервые установлено, что число профилей внутримышечных нервных отростков снижается в 2 раза в период от новорожденности к препубертатному, а их толщина во столько же раз увеличивается.

В отличие от других работ, посвященных постнатальному развитию межмышечного нервного сплетения нами дана количественная характеристика этого процесса и показано, что структурные различия межмышечного нервного сплетения проксимального и дистального отделов ободочной кишки у крыс отсутствуют, несмотря на то, что они имеют ряд особенностей по выраженности секреторной и моторной функции [62]. По-видимому, существуют различия функционального состояния межмышечного нервного сплетения этих отделов, которые связаны с особенностями нейрохимических взаимодействий между нейронами, глиальными, интерстициальными и гладкомышечными клетками, а возможно и с энтероэндокринными клетками, продуцирующими серотонин [35].

Сравнение литературных данных о возрастных морфофункциональных изменениях ободочной кишки у крыс с данными, полученными в настоящей работе, представлено в таблице 11.

Таблица 11. Возрастные морфофункциональные изменения ободочной кишки у крыс. Сравнение данных литературы с полученными в настоящей работе

Возраст- ные пери- оды	Литературные данные	Собственные данные (выделена жирным шрифтом научная новизна)
Новорож-денные	<ul> <li>↓линейные размеры кишки</li> <li>В проксимальном отделе есть «ворсинко-подобные структуры» [95]. В дистальном нет</li> </ul>	<ul> <li>↓линейные размеры кишки</li> <li>В проксимальном отделе есть «ворсинко-подобные структуры». В дистальном нет</li> </ul>
	<ul> <li>нет</li> <li>↑секреция кислых высоко- сульфатированных и сиалому- цинов [29]</li> <li>нет</li> </ul>	<ul> <li>Относительная численность бокаловидных клеток и содержание муцинов соответствует другим возрастным группам</li> <li>Относительная численность энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в кишке и крови минимальное</li> </ul>
	• нет	<ul> <li>Микрофлора</li> <li>†Firmicutes †Enterobacteriaceae</li> <li>\$\sqrt{Bifidobacteria}\$</li> <li>\$\sqrt{Bacteroides}\$</li> </ul>
	• Агрегированные лимфоидные узелки отсутствуют [20]	• Агрегированные лимфоидные узелки отсутствуют
	<ul> <li>Ганглии формируют цепь [124], состоящую из NOS+ и VIP+ нейронов [81], глиаль- ных S100b+ и GPAP+ клеток [39]</li> </ul>	<ul> <li>Межмышечное нервное сплетение окончательно не сформировано. Единичные глиальные клетки в ганглиях</li> <li>Наибольшая численная плотность внугримышечных нервных отростков</li> <li>региональных различий нет</li> </ul>
Препубер- татный по сравнению с новорож- денными	<ul> <li>Формируются крипты</li> <li>Складки в проксимальном отделе. В дистальном – нет [86]</li> </ul>	• Формируются крипты, складки в проксимальном отделе
	<ul><li>нет</li><li>нет</li></ul>	<ul> <li>не изменяется число бокаловидных клеток</li> <li>т число энтероэндокринных клеток (в 2 раза) и</li> <li>т содержание серотонина (в 50-80 раз)</li> </ul>
	• Выявляли 5 основных таксонов микрофлоры: Firmicutes, Bacteroides, Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacteriaceae [90]	• Микрофлора
	<ul><li>нет</li><li>нет</li></ul>	<ul> <li>Численная плотность агрегированных лимфо- идных узелков максимальное</li> <li>В дистальном отделе ↑ площадь и число узел- ков в агрегированных лимфоидных узелках</li> </ul>

		,
Половоз- релые по сравнению с препу- бертат- ными	• Межмышечное нервное сплетение сформировано, нервные тракты выражены [39] • нет	• Межмышечное нервное сплетение сформировано
	• нет	<ul> <li>Повышение числа глиальных клеток в 3-4 раза</li> <li>Региональных различий нет</li> </ul>
	<ul> <li>Слизистая оболочка складча- тая. Крипты сформированы [86]</li> </ul>	• Слизистая оболочка складчатая. Крипты сформированы
	• нет	• Относительная численность бокаловидных клеток не изменяется
	• нет По сравнению с проксимальным отделом в дистальном	<ul> <li>↓содержание высокосульфатированных муцинов (в 1,5-2 раза в проксимальном отделе)</li> </ul>
	↑ высокосульфатированных муцинов, но ↓ нейтральных [107] • нет	• Относительная численность энтероэндокрин- ных клеток и концентрация серотонина не из- меняется
	• Выявляли 5 основных таксонов микрофлоры: <i>Firmicutes</i> ,	• Микрофлора <i>†Firmicutes</i>
	Bacteroides, Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacteri- aceae [90]	≯Bacteroides ↓Enterobacteriaceae ↓Bifidobacteria
	• нет	• ↑ площадь агрегированных лимфоидных узел- ков (в 3 раза)
	• нет	• В дистальном отделе ↑ площадь и число узел- ков в агрегированных лимфоидных узелках
	• нет	• Региональных различий межмышечного нерв- ного сплетения нет
Старые по сравнению	<ul> <li>Толщина мышечной обо- лочки [27]</li> </ul>	•
с половоз-	<ul> <li>↓ число бокаловидных клеток</li> <li>[86]</li> <li>нет</li> </ul>	<ul> <li>Не изменяется относительная численность бо- каловидных клеток</li> <li>↓ содержание нейтральных муцинов</li> <li>Число энтероэндокринных клеток и концентра-</li> </ul>
	• нет	ция серотонина не изменяется
	• нет	• Соотношение основных таксонов просветной микрофлоры не изменяется
	• нет	• Число и площадь агрегированных лимфоидных узелков не изменяется
	• нет	• В дистальном отделе ↑ число узелков в агрегированных лимфоидных узелках
	• HeT	<ul> <li>Нервная сеть сформирована. Различий нет</li> <li>Региональных различий межмышечного нерв-</li> </ul>
		ного сплетения нет

## Структурная организация ободочной кишки в период новорожденности

Известно, что в период новорожденности у крыс структуры ободочной кишки отличаются наименьшими размерами [38]. Слизистая оболочка проксимального отдела ободочной кишки у новорожденных крыс представлена «ворсинко-подобными структурами» [95]. По литературным сведениям, эпителиальный барьер незрелый, поскольку бокаловидные клетки почти лишены нейтральных муцинов [29]. По нашим данным, напротив, эпителиальный барьер у новорожденных крыс Вистар сформирован, поскольку число бокаловидных клеток и содержание в них нейтральных и высокосульфатированных муцинов соответствует другим возрастным группам. Сведения о численности энтероэндокринных клеток и содержании серотонина в литературе отсутствуют. Нами показано, что в этот возрастной период число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови наименьшее. Литературные данные об основных таксонах просветной микрофлоры у новорожденных крыс отсутствуют. По нашим данным, у новорожденных крыс преобладают представители таксонов Firmicutes и Enterobacteriaceae. Следует отметить, что микрофлора определяет морфофункциональное состояние иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой ободочной кишки, участвует в регуляции моторики, секреции и всасывания, а также продукции биологически активных веществ нейромедиаторов, витаминов, короткоцепочечных жирных кислот [91]. В связи с этим, вырабатываемый Firmicutes серотонин может влиять на моторику, секрецию, абсорбцию воды в ободочной кишке у крыс в период новорожденности. Агрегированные лимфоидные узелки в этот возрастной период у крыс отсутствуют. По литературным данным ганглии межмышечного нервного сплетения формируют цепь [124], состоящую из NOS+ и VIP+ нейронов [81], S100b+ и GPAP+глиальных клеток [39]. Количественная оценка клеточного состава ганглиев межмышечного нервного сплетения, численности и толщины внутримышечных нервных отростков у новорожденных крыс не исследована. Нами впервые показано, что в этот возрастной период нервная сеть межмышечного сплетения характеризуется наименьшим размером ганглиев, которые состоят из 5-6 нейронов и 1-2 глиальных клеток. Мышечная оболочка в этот период характеризуется наибольшим числом внутримышечных нервных отростков.

# Структурная организация ободочной кишки в препубертатный возрастной период

По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс происходит увеличение линейных размеров ободочной кишки, формируются крипты, складки в ее проксимальном отделе [86]. Литературные сведения о секреторных клетках и физико-химических свойствах их секрета отсутствуют. Нами впервые показано, что у препубертатных крыс по сранению с новорожденными не изменяется число бокаловидных клеток, которых в дистальном отделе ободочной кишки в 2 раза больше, чем в проксимальном. К препубертатному возрастному периоду в 2 раза увеличивается число энтероэндокринных клеток, что коррелирует с содержанием серотонина в гомогенате ободочной кишки и плазме периферической крови. Основные таксоны просветной микрофлоры у препубертатных крыс представлены Firmicutes, Bacteroides, Lactobacillus, Bifidobacteria, Enterobacteriaceae [90], но их соотношение в этот период не изучено. Нами установлено, что у препубертатных крыс в составе просветной микрофлоры преобладают представители таксона Firmicutes, а количество Bifidobacteria, Enterobacteriaceae минимальное. Данные о наличии агрегированных лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки в литературе представлены, но их количественная оценка не проводилась. В нашей работе показано, что число агрегированных лимфоидных узелков у препубертатных крыс максимальное. По сравнению с проксимальным, в дистальном отделе в 2 раза выше их площадь и число отдельных узелков в агрегированных лимфоидных узелках. Очевидно, это связано с большим количеством микрофлоры в

дистальном отделе [6]. По литературным данным, межмышечное нервное сплетение у препубертатных крыс сформировано, выражены нервные тракты [39], но клеточный состав ганглиев не охарактеризован. Нами впервые установлено, что число нейронов в ганглиях стабильно во все периоды постнатального развития, а число глиальных клеток в ганглиях у препубертатных крыс в 3-4 раза больше, чем у новорожденных. Число профилей внутримышечных нервных отростков снижается в 2 раза в период от новорожденности к препубертатному, а их толщина во столько же раз увеличивается, что обусловлено ростом мышечной оболочки ободочной кишки.

### Структурная организация ободочной кишки у крыс в период половой зрелости

Merchant H. et al [86] показали, что в период половой зрелости у крыс слизистая оболочка проксимального отдела ободочной кишки складчатая, крипты сформированы. По сравнению с препубертатными у половозрелых крыс авторы не выявили различий толщины оболочек ободочной кишки. Литературные сведения о секреторных клетках эпителия, структурах иммунной и нервной систем ободочной кишки в этом периоде отсутствуют. По нашим данным, число бокаловидных клеток у препубертатных и половозрелых животных не отличается. В проксимальном отделе в 1,5-2 раза снижается содержание устойчивых к бактериальным гликозидазам высокосульфатированных муцинов. По сравнению с препубертатными у половозрелых крыс число энтероэндокринных клеток и концентрация серотонина не изменяется. Литературные сведения содержат информацию о наличии представителей основных таксонов просветной микрофлоры в ободочной кишке у половозрелых крыс [90], но соотношение этих таксонов не было изучено. В рационе у половозрелых животных преобладает твердый корм. Поэтому величина относительной эксперессии Bacteroides, способствующих усвоению клетчатки [90], к периоду половой зрелости увеличивается в тысячи раз. При этом, другие таксоны, за исключением Firmicutes, напротив, почти исчезают.

К периоду половой зрелости снижается число агрегированных лимфоидных узелков на стандартной площади ободочной кишки, что обусловлено увеличением площади всей кишки. Средняя площадь агрегированных лимфоидных узелков увеличивается в 3 раза от препубертатного возрастного периода к половой зрелости. По сравнению с проксимальным в дистальном отделе ободочной кишки в 2 раза больше средняя площадь агрегированных лимфоидных узелков и число отдельных узелков в них. Это, очевидно, связано с большим количеством микрофлоры в дистальном отделе по сравнению с проксимальным [6]. По нашим данным, гистоархитектоника межмышечного нервного сплетения, клеточный состав ганглиев и параметры нервных отростков у половозрелых крыс не отличаются от препубертатных животных.

#### Структурная организация ободочной кишки у старых крыс

По сравнению с половозрелыми у старых крыс увеличивается толщина мышечной оболочки ободочной кишки [27]. По данным литературы, в этот возрастной период происходит снижение числа бокаловидных клеток [86]. По нашим данным, снижения числа бокаловидных клеток у старых крыс не происходит, однако уменьшается продукция нейтральных муцинов. Количественная оценка энтероэндокринных клеток и содержания серотонина у старых крыс ранее не проводилась. Нами показано, что число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в плазме крови и гомогенате ободочной кишки у старых крыс по сравнению с половозрелыми не изменяется. Соотношение основных таксонов просветной микрофлоры, количественная оценка структур иммунной системы в этот период не проводилась. Нами показано, что соотношение основных таксонов просветной микрофлоры у старых крыс соответствует периоду половой зрелости. По сравнению с половозрелыми у старых крыс число и площадь агрегированных лимфоидных узелков не изменяется, но в дистальном отделе в 2 раза больше число узелков в их скоплениях. По литературным данным, у старых крыс по сравнению с половозрелыми общее число HuC/D+нейронов и S100b+глиальных клеток в ободочной кишке

снижается на 64% [100], а число ганглиев - не изменяется [109]. В нашей работе признаков дегенеративных изменений межмышечного нервного сплетения у старых крыс не выявлено.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На основе результатов, полученных в работе с помощью комплекса современных методов исследования, систематизированы представления о возрастных морфофункциональных изменениях эпителиального барьера, иммунной и энтеральной нервной систем разных отделов ободочной кишки у крыс Вистар. Установлено, что в период от новорожденности до препубертатного происходят наиболее значительные структурно-функциональные изменения ободочной кишки.

В период новорожденности у крыс эпителиальный барьер, в отличие иммунной и энтеральной нервной систем, уже сформирован - число бокаловидных клеток и содержание муцинов в них соответствует другим возрастным группам. Состав просветной микрофлоры в этот возрастной период характеризуется преобладанием таксонов *Firmicutes*, *Bifidobacteria*. Число энтероэндокринных клеток и содержание серотонина в кишке и крови в этот возрастной период минимальное. Агрегированные лимфоидные узелки у новорожденных крыс отсутствуют. Межмышечное нервное сплетение окончательно не сформировано: нервная сеть мелкоячеистая, в ганглиях содержатся единичные глиальные клетки.

В препубертатный возрастной период формируются крипты, увеличивается всасывающая поверхность ободочной кишки . В составе просветной микрофлоры преобладают таксоны *Firmicutes*, снижается количество *Bifidobacteria*, *Enterobacteria*. В стенке ободочной кишки выявляются агрегированные лимфоидные узелки и по сравнению с другими возрастными периодами их число максимальное. Межмышечное нервное сплетение сформировано: нервная сеть крупноячеистая, в ганглиях много глиальных клеток.

К периоду половой зрелости в бокаловидных клетках снижается содержание кислых сульфатированных муцинов, наиболее устойчивых к действию бактериальных гликозидаз, что, очевидно, обусловливает снижение устойчи-

вости эпителиального барьера. В составе просветной микрофлоры преобладают таксоны *Firmicutes*, *Bacteroides*. В этот возрастной период число агрегированных лимфоидных узелков стабильное, но их площадь больше, чем в предыдущий возрастной период. Структура межмышечного нервного сплетения не отличается от таковой у животных препубертатного периода.

По сравнению с половозрелыми у старых крыс изменений состава просветной микрофлоры, состояния иммунной системы и структуры межмышечного нервного сплетения не выявлено, но защитные свойства эпителиального барьера снижены, что характеризуется уменьшением содержания нейтральных мущинов.

Во всех возрастных периодах выявлены структурно-функциональные региональные различия ободочной кишки . Во всех периодах постнатального онтогенеза в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным выше численность бокаловидных, но ниже — энтероэндокринных клеток, что связано с большим количеством бактерий в этом отделе ободочной кишки и менее выраженной моторной и абсорбционной функцией. В периоды от препубертатного до старости в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным агрегированные лимфоидные узелки характеризуются большей площадью и числом узелков в них, что, очевидно, связано с максимально выраженной колонизацией микрофлоры в этом отделе.

#### **ВЫВОДЫ**

- 1. В период от новорожденности до препубертатного у крыс Вистар увеличиваются линейные размеры ободочной кишки, наблюдается интенсивный рост толщины слизистой оболочки, подслизистой основы и мышечной оболочки. По сравнению с половозрелыми у старых крыс больше толщина мышечной оболочки.
- Во всех периодах постнатального развития количество бокаловидных клеток в проксимальном отделе ободочной кишки меньше, чем в дистальном.
   В проксимальном отделе содержание высокосульфатированных муцинов в бокаловидных клетках снижается к периоду половой зрелости, а нейтральных к старости.
- 3. В процессе постнатального развития у крыс состав основных таксонов просветной микрофлоры устанавливается у половозрелых животных и сохраняется у старых.
- 4. С возрастом численность хромогранин А-позитивных энтероэндокринных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки у крыс прогрессивно увеличивается, что сопровождается повышением содержания серотонина в ободочной кишке и периферической крови. В проксимальном отделе число энтероэндокринных клеток у препубертатных, половозрелых и старых животных больше, чем в дистальном, а у новорожденных количественные показатели не различаются.
- 5. Агрегированные лимфоидные узелки в ободочной кишке впервые обнаруживаются у препубертатных крыс. С возрастом их количество снижается, а площадь, напротив, увеличивается. Показатели средней площади и числа узелков в агрегированных лимфоидных узелках выше в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным.

6. По сравнению с новорожденными у препубертатных крыс сеть межмышечного нервного сплетения с возрастом становится более разреженной, снижается число и увеличивается толщина нервных отростков. В ганглиях количество нейронов с возрастом не изменяется, а глиальных клеток увеличивается до препубертатного периода и в последующих периодах не изменяется.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Белоусов Л.В. Основы общей эмбриологии: Учебник. изд. 3, переработ. и доп.,(Классический университетский учебник) // М. МГУ им. М.В. Ломоносова.-2005.-368с.
- 2. Гржибовский А.М., Иванов С.В. Сравнение количественных данных трех и более независимых выборок с использованием программного обеспечения Statistica и SPSS: // Наука и здравоохранение 2016. №. 2. С. 5-28
- 3. Гундобин Н.П. Особенности детского возраста // СПб.: Практическая медицина 1906. 266 с.
- 4. Данилов Р.К. Руководство по гистологии, Том 2 // Литрес 2017 T 2. 513 c.
- 5. Елецкий Ю.К., Яглов В.В. Эволюция структурной организации эндокринной части поджелудочной железы позвоночных // Наука 1978. 166 с.
- 6. Золотова Н.А. Структурная и функциональная характеристика муцинов // Клиническая и экспериментальная морфология 2014. № 1– С. 66–72.
- 7. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях // М. Профиль 2010. 358 с.
- 8. Кирюхин С.О., Хомякова Т.И. Интерстициальные клетки Кахаля желудочно-кишечного тракта животных и человека // Клиническая и экспериментальная морфология 2012. № 3 С. 68–74.
- 9. Крылова М.И. Хромогранин А: иммуноцитохимическая локализация в секреторных гранулах кардиомиоцитов предсердий лягушки // Цитология 2007. № 7(49) С. 538–543.
- 10. Мастицкий С.Э. Методическое пособие по использованию программы STATISTICA при обработке данных биологических исследований // Минск

- РУП «Институт рыбного хозяйства 2009. Т. 51. 77 с.
- 11. Ноздрачев А.Д. Физиология вегетативной нервной системы // Л.:Медицина 1983. 296 с.
- 12. Пальцев М.А, Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии // М.: Медицина 2006 382 с.
- 13. Петренко В. М. Функциональная анатомия лимфатической системы: современные представления и направления исследований // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. №. 12. С. 94-97.
- 14. Хочанский Д.Н., Макарова О. В. Современные представления о структуре и функции энтеральной нервной системы // Морфологические ведомости 2015. № 1— С. 106–117.
- 15. Ярилин А.А. Иммунология // Москва: ГЭОТАР-Медиа 2010. 752 с.
- 16. Adachi S., Yoshida H., Kataoka H., Nishikawa S. I. Three distinctive steps in Peyer's patch formation of murine embryo // Int. Immunol. -1997. N = 4(9) P. 507–514.
- 17. Agans R., Rigsbee L., Kenche H. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults // FEMS Microbiol. 2011. №2(77) p. 404-412
- 18. Amireault P., Sibon D., Côté F. Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks // ACS Chem. Neurosci. − 2013. − № 1(4) − P. 64–71.
- 19. Aslam A., Spicer R. D., Corfield A. P., Torihashi S. Connective tissue in gut development: A key player in motility and in intestinal desmosis // Cell Tissue Res. -2016. No 1 (22) P. 941 –951.
- 20. Baptista A.P., Olivier B. J., Goverse G., et al. Colonic patch and colonic SILT development are independent and differentially regulated events. // Mucosal

- Immunol.  $-2013. N_{\odot} 3(6) P. 511 521.$
- 21. Bassotti G., Antonelli E. Gastrointestinal motility disorders in inflammatory bowel diseases // World J. − 2014. №1(20). P. 37-44.
- 22. Bates M., Balistreri W. Development of the human digestive system // Neonatal–Perinatal Med. 7th ed. Mosby Inc 2002. P. 1255-1262
- 23. Bates M.D. Development of the Enteric nervous system / M. D. Bates -2002.  $-\frac{N}{2}$  1(29)  $-\frac{P}{2}$ . 97–114.
- 24. Baum B., Meneses F., Kleinschmidt S. Age-related histomorphologic changes in the canine gastrointestinal tract: A histologic and immunohistologic study // World J. Gastroenterol. -2007. -No 1(13) P. 152–157.
- 25. Bertrand P.P., Bertrand R. L.Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract // Auton. Neurosci.  $-2010. N_{\odot} 1(153) P. 47-57$ .
- 26. Bienenstock J., Clancy R.Bronchus associated lymphoid tissue (BALT): its relationship to mucosal immunity and infectious reactions // Immunol. Infect. React. lung -1976. V. 1- P. 29-58.
- 27. Bitar K. V. Aging and gastrointestinal smooth muscle: from signal transduction to contractile proteins //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. − 2003. − №. 1(284). − P. G1-G7
- 28. Blennerhassett M. Neural regulation of intestinal smooth muscle growth in vitro // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 2000. №. 3(279). P. G511-G519.
- 29. Brackett K.I.M.A., Townsend S. F. Organogenesis of the Colon in Rats − 1980. − №2(163). − P. 191–201.
- 30. Braegger C.P., Spencer J., MacDonald T. T. Ontogenetic aspects of the intestinal immune system in man  $N_{\odot} 3(25) P$ . 1–4.
- 31. Bristol J.B., Williamson R. C. Large bowel growth // Scand. J. Gastroenterol.

- Suppl. 1984. №. 93– P. 25–34.
- 32. Buddington R. Postnatal changes in bacterial populations in the gastrointestinal tract of dogs // Am. J. Vet. Res. 2003. №5(64) P. 646-651.
- 33. Carloni M., Nasuti C., Fedeli D. et al. The impact of early life permethrin exposure on development of neurodegeneration in adulthood // Experimental 2012. №1(47). P. 60-66.
- 34. Castrogiovanni P., Musumeci G., Trovato F. M. et al. Effects of high-tryptophan diet on pre- and postnatal development in rats: A morphological study // Eur. J. Nutr. 2014. № 1(53)– P. 297–308.
- 35. Chalazonitis A., Gershon M. D., Greene L. A. Cell death and the developing enteric nervous system // Neurochem. Int. -2012.  $-N_{2}$  6(61) P. 839–847.
- 36. Chen J.J., Li Z., Pan H. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters // J. Neurosci. − 2001. − № 16(21) − P. 6348–6361.
- 37. Cheroutre H., Lambolez F., Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes // Nat. Publ. Gr. -2011. No 7(11) P. 445-456.
- 38. Colony P.C., Kois J. M., Peiffer L. P. Structural and enzymatic changes during colonic maturation in the fetal and suckling rat // Gastroenterology 1989.  $\mathbb{N}_{2}$  2(97) P. 338–47.
- 39. Cossais F., Durand T., Chevalier J. et al. Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2016. N 11(310) P. G941–G951.
- 40. Deplancke B., Gaskins H. R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer //The American journal of clinical nutrition. 2001. №. 6(73). P. 1131S-1141S.
- 41. Deplancke B., K. R. Hristova Molecular Ecological Analysis of the Succession

- and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Mouse Gastrointestinal Tract Molecular Ecological Analysis of the Succession and Diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in the Mouse Gastrointestinal Tract -2000.  $-N_{\odot}$  5(66) -P. 2166–2174.
- 42. Eberl G. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? / G. Eberl // Nat. Rev. Immunol. -2005.  $-N_{\odot}$  5(5) P. 413–420.
- 43. Facer P., Bishop A., Cole G. Developmental profile of chromogranin, hormonal peptides, and 5-hydroxytryptamine in gastrointestinal endocrine cells // Gastroenterology. − 1989. − №. 1(97). − P. 48-57
- 44. Filipe M.I., Sandey A., Carapeti E. A. Goblet cell mucin in human foetal colon, its composition and susceptibility to enzyme degradation: a histochemical study // Symp. Soc. Exp. Biol. − 1989. − №43. P. 249–258.
- 45. Freeman H., Lotan R., Kim Y. Application of lectins for detection of goblet cell glycoconjugate differences in proximal and distal colon of the rat // Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.  $-1980. N_{\odot}$ . 4(42). P. 405-412.
- 46. Fu M., Lui V. C. H., Sham M.H. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut // J. Cell Biol.  $2004. N_{\odot} 5(166) P. 673-684$ .
- 47. Furness J. The enteric nervous system and neurogastroenterology / J. Furness // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. -2012. N0. 5(9). P. 286.
- 48. Furness J.B.The Enteric Nervous System // Blackwell Publishing, Oxford 2006.– P. 274.
- 49. Gabbani T., Marsico M., Marocchi M. Isolated hypoganglionosis in young man with autism // Dig. Liver Dis. 2017. № 1(49) P. 104.
- 50. Gabella G. On the plasticity of form and structure of enteric ganglia // J. Auton.

- Nerv. Syst. 1990. №. 30– P. S59–S66.
- 51. Ganesh B.P., Klopfleisch R., Loh G. Commensal Akkermansia muciniphila Exacerbates Gut Inflammation in Salmonella Typhimurium-Infected Gnotobiotic Mice // PLoS One -2013. -N 9(8) P. 749-763.
- 52. Gershon M.D. Genes and lineages in te formation of the enteric nervous system / M. D. Gershon // Curr. Opin. Neurobiol. 1998. T. 7– 101–109c.
- 53. Gershon M.D. Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut // Curr. Opin. Pharmacol. -2003.  $-N_{\odot}$  6(3) -P. 600–607.
- 54. Gershon M.D., Tack J. The Serotonin Signaling System: From Basic Understanding To Drug Development for Functional GI Disorders // Gastroenterology 2007. № 1(132) P. 397–414.
- 55. Gfroerer S., U. Rolle Interstitial cells of Cajal in the normal human gut and in Hirschsprung disease // Pediatr. Surg. Int. -2013. No 9(29) P. 889-897.
- 56. Gulbransen B. D. Enteric glia // Colloquium Series on Neuroglia in Biology and Medicine: From Physiology to Disease. Morgan & Claypool Life Sciences 2014. №. 2(1). P. 70.
- 57. Gunawardene A.R., Corfe B. M., Staton C. A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract // Int. J. Exp. Pathol.  $2011. -N_{\odot} 4(92) P. 219-231.$
- 58. Gustafsson B.The serotonin producing enterochromaffin cell, and effects of hyperserotoninemia on heart and bone -2005. P. 149.
- 59. Hanani M., Fellig Y., Udassin R. et al. Age-related changes in the morphology of the myenteric plexus of the human colon // Auton. Neurosci. 2004. № 1(113) P. 271–278.
- 60. Hatton G.B., Yadav V., Basit A. W. Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans // J. Pharm. Sci. -2015. -N 9(104) P. 2747 -2776.

- 61. Helander H. Morphological studies on the development of the rat colonic mucosa // Cells Tissues Organs -1973. -№. 2(85). -P. 153-176.
- 62. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? // Int. J. Cancer -2002.  $N_{\odot}$  5(101) P. 403–408.
- 63. Ishikawa H., Kanamori Y., Hamada H. Development and function of organized gut-associated lymphoid tissues // Mucosal Immunol. Two-Volume Set 2005. P. 385–405.
- 64. Izcue A. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation / A. Izcue, J. L. Coombes, F. Powrie // Immunol. Rev. 2006. T. 212–256–271c.
- 65. Johansson M. E. V. et al. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine // Cellular and molecular life sciences. -2011. №. 22(68). C. 3635-36
- 66. Johansson M. E. V., Larsson J. M. H., Hansson G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions // Proceedings of the national academy of sciences.  $2011. N_{\odot}$ . Supplement 1(108). P. P. 4659-4665.
- 67. Kapur R. P., Yost C., Palmiter R. D. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice // Development. − 1992. − №. 1(116). − P. 167-175.
- 68. Kararli T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals / T. T. Kararli // Biopharm. Drug Dispos.  $-1995. N ext{0.} 5(16) P. 351-380.$
- 69. Keating C. et al. Ageing and gastrointestinal sensory function: altered colonic mechanosensory and chemosensory function in the aged mouse // The Journal of physiology. -2016. No. 16(594). P. 4549-4564.
- 70. Kolling G., Wu M., Guerrant R. L. Enteric pathogens through life stages

- //Frontiers in cellular and infection microbiology.  $-2012. N_{\odot}. 2. P. 114.$
- 71. Krause W. J., Yamada J., Cutts J. H. Enteroendocrine cells in the developing opossum small intestine and colon // Journal of anatomy. − 1989. − №. 162. − P. 83-96.
- 72. Langman J., Rowland R. The number and distribution of lymphoid follicles in the human large intestine // J. Anat. -1986. №. 149- P. 189-194c.
- 73. Larsson L., Salviati G. Effects of age on calcium transport activity of sarcoplasmic reticulum in fast-and slow-twitch rat muscle fibres // The Journal of Physiology. 1989. №. 1(419). P. 253-264.
- 74. Lecomte V. et al. Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters // PloS one. -2015. №. 5(10). P. 6012-6931.
- 75. Liu M. T. et al. 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice //Journal of Neuroscience.  $-2009. N_{\odot}$ . 31(29). -P. 9683-9699.
- 76. Lolova I. S., Davidoff M. S., Itzev D. E. Histological and immunocytochemical data on the differentiation of intestinal endocrine cells in human fetus // Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica. − 1998. − №. 3-4(23). − P. 61-71.
- 77. LUCINI C. et al. Postnatal development of intestinal endocrine cell populations in the water buffalo //Journal of anatomy. -1999. No. 3(195). P. 439-446.
- 78. Margolis K. G., Gershon M. D., Bogunovic M. Cellular organization of neuroimmune interactions in the gastrointestinal tract //Trends in immunology.  $2016. N_{\odot}. 7(37). P. 487-501.$
- 79. Mariat D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age //BMC microbiology.  $-2009. N_{\odot}$ . 1(9). -P. 123.
- 80. Marques T. M. et al. Gut microbiota modulation and implications for host health: dietary strategies to influence the gut-brain axis //Innovative Food Science

- & Emerging Technologies. 2014. №. 22. P. 239-247.
- 81. Matini P., Mayer B., Faussone-Pellegrini M. S. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre-and postnatal life //Cell and tissue research. 1997. №. 1(288). P. 11-23.
- 82. Matsuo K. et al. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon  $//Gut. 1997. N_{\odot}. 6(40). P. 782-789.$
- 83. May C. L., Kaestner K. H. Gut endocrine cell development //Molecular and cellular endocrinology.  $-2010. N_{\odot}$ . 1(323). P. 70.
- 84. McConnell E. L., Basit A. W., Murdan S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments // Journal of Pharmacy and Pharmacology. − 2008. − №. 1(60). − P. 63-70.
- 85. McRorie J., Krier J., Adams T. Morphology and projections of myenteric neurons to colonic fiber bundles of the cat //Journal of the autonomic nervous system.  $-1991. N_{\odot}. 3(32). P. 205-216.$
- 86. Merchant H. A. et al. Influence of ageing on the gastrointestinal environment of the rat and its implications for drug delivery //European Journal of Pharmaceutical Sciences. -2014. №. 62. Р. 76-85.
- 87. Merga Y., Campbell B. J., Rhodes J. M. Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy //Digestive diseases. -2014.  $N_{\odot}$ . 4(32). P. 475-483.
- 88. Metzger M. et al. Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system //Gastroenterology.  $-2009. N_{\odot}$ . 6(137). P. 2063-2073.
- 89. Nagy N., Goldstein A. M. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon // Seminars in cell & developmental biology. Academic Press, 2017. №. 66. P. 94-106.

- 90. Nasuti C. et al. Changes on fecal microbiota in rats exposed to permethrin during postnatal development // Environmental Science and Pollution Research. 2016. №. 11(23). P. 10930-10937.
- 91. Nicholson J.K. et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions / J. // Science. 2012. № 6086(336) P. 1262–1267.
- 92. Oshima S., Fujimura M., Fukimiya M. Changes in number of serotonin-containing cells and serotonin levels in the intestinal mucosa of rats with colitis induced by dextran sodium sulfate // Histochemistry and cell biology.  $-1999. N_{\odot}$ . 4(112). P. 257-263.
- 93. Owen R. L., Piazza A. J., Ermak T. H. Ultrastructural and cytoarchitectural features of lymphoreticular organs in the colon and rectum of adult BALB/c mice //Developmental Dynamics. − 1991. − №. 1(191). − P. 10-18.
- 94. Pabst R. The anatomical basis for the immune function of the gut. // Anat. Embryol. (Berl).  $-1987. N_{\odot} 2(176) P. 135-144.$
- 95. Pácha J. Development of Intestinal Transport Function in Mammals // Psychol. Rev. 2000. № 4(80) P. 1633–1667.
- 96. Parikh D. H. et al. Abnormal expression and distribution of nidogen in Hirschsprung's disease //Journal of pediatric surgery. − 1995. − №. 12(30). − P. 1687-1693.
- 97. Peck C. J. et al. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing

  //Neurogastroenterology & Motility. − 2009. − №. 10(21). − P. 10-75
- 98. Pelaseyed T. et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system // Immunological reviews.  $-2014. N_{\odot}. 1(260). P. 8-20.$
- 99. Pham T.D. Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: Sequence in relation to phenotype / // J. Comp. Neurol. -1991. No 4(314) P.

789–798.

- 100. Phillips R. J., Kieffer E. J., Powley T. L. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat // Anatomy and embryology. 2004. №. 1(209). P. 19-30.
- 101. Phillips R. J., Pairitz J. C., Powley T. L. Age-related neuronal loss in the submucosal plexus of the colon of Fischer 344 rats //Neurobiology of aging.  $-2007. N_{\odot}. 7(28). P. 1124-1137.$
- 102. Pistollato F. et al. Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease //Nutrition reviews. − 2016. − №. 10(74). − P. 624-634.
- 103. Queipo-Ortuño M. I. et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels //PloS one. -2013. №. 5(8). P. 654-665.
- 104. Roda G. et al. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases //World journal of gastroenterology: WJG. -2010. №. 34(16) P. 42-64.
- 105. Rothman T. P. et al. Increased Expression of Laminin-1 and Collagen (IV) Subunits in the Aganglionic Bowel ofls/ls, but Notc-ret−/− Mice //Developmental biology. − 1996. − №. 2(178). − P. 498-513.
- 106. Ruel J. IBD across the age spectrum—is it the same disease? / J. Ruel, D. Ruane, S. Mehandru, C. Gower-Rousseau, J.-F. Colombel // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013. № 2(11) P. 88–98.
- 107. Sakata T. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs / T. Sakata, W. v. Engelhardt // Cell Tissue Res. 1981. № 3(219) P. 629–635.
- 108. Sanders K. M. et al. A novel pacemaker mechanism drives gastrointestinal rhythmicity // Physiology.  $-2000. N_{\odot}$ . 6(15). C. 291-298.
- 109. Sandström O. Age-related Changes in Neuroendocrine System of the Gut Apossible role in the pathogenesis of gastrointestinal disorders in the elderly

- Minireview based on a doctoral thesis / O. Sandström, M. El-Salhy // Upsala J Med Sci − 2001. №. 106 P. 81–97.
- 110. Santa Barbara P. De Development and differentiation of the intestinal epithelium / P. De Santa Barbara, G. R. Van Den Brink, D. J. Roberts // Cell. Mol. Life Sci. − 2003. − № 7(60) − P. 1322–1332.
- 111. Santer R.M. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats / R. M. Santer, D. M. Baker // J. Auton. Nerv. Syst. -1988. No 1(25) P. 59-67.
- 112. Schäfer K. H., Hänsgen A., Mestres P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat //The anatomical record. 1999. №. 1(256). P. 20-28.
- 113. Schriemer D. et al. Regulators of gene expression in Enteric Neural Crest Cells are putative Hirschsprung disease genes // Developmental biology. − 2016. − №. 1(416). − P. 255-265.
- 114. Skinner S. a The Microvascular Structure of the Normal Colon in Rats and Humans / S. a Skinner, P. E. O'Brien // J. Surg. Res. − 1996. − № 2(61) − P. 482–490.
- 115. Spiller R. Pathophysiology of the Enteric Nervous System: A Basis for Understanding Functional Diseases / R. Spiller, D. Grundy // Pathophysiol. Enteric Nerv. Syst. A Basis Underst. Funct. Dis. − 2008. − №1−P. 261.
- 116. Sultan I. et al. Distinct features of colorectal cancer in children and adolescents // Cancer. 2010. №. 3(116). P. 758-765.
- 117. Swords W. E. et al. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora //Neonatology.  $-1993. N_{\odot}$ . 3(63). -P. 191-200.
- 118. Timmermans J. P. et al. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract // Cell and tissue research.  $-1994. N_{\odot}. 2(275). P. 235-245.$

- 119. Tsavkelova E. A. et al. Hormones and hormone-like substances of microorganisms: a review //Applied Biochemistry and Microbiology. 2006. №. 3(42). P. 229-235.
- 120. Upchurch B. H. et al. Peptide YY expression is an early event in colonic endocrine cell differentiation: evidence from normal and transgenic mice //Development. 1996. №. 4(122). P. 1157-1163.
- 121. Vaishnava S. The Intestinal Mucus Layer Comes of Age // Trends Immunol. 2016. № 1(37) P. 3–4.
- 122. Vanderwinden J. M., Rumessen J. J. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease //Microscopy research and technique. − 1999. − N<sub>2</sub>. 5(47). − P. 344-360.
- 123. Vigueras R. M. et al. Histological characteristics of the intestinal mucosa of the rat during the first year of life // Laboratory animals. -1999. №. 4(33). P. 393-400.
- 124. de Vries P. et al. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon //American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. − 2010. − T. 299. − №. 2. − C. G539-G547.
- 125. Wallace A. S., Burns A. J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract //Cell and tissue research.  $-2005. N_{\odot}. 3(319). P. 367-382.$
- 126. Walthall K. et al. Postnatal development of the gastrointestinal system: a species comparison //Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology. − 2005. − №. 2(74). − P. 132-156.
- 127. Ward S.M. Morphological changes during ontogeny of the canine proximal colon // Cell Tissue Res. -1995. -№ 1(282) P. 93–108.
- 128. Wikoff W. R. et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut

- microflora on mammalian blood metabolites //Proceedings of the national academy of sciences.  $-2009. N_{\odot}. 10(106). P. 3698-3703.$
- 129. Williams L. Anatomy and Embryology Asynchronous development of the rat colon / L. Williams, L. Bell 1991. P. 573–578.
- 130. Wooding F. B. P., Smith M. W., Craig H. The ultrastructure of the neonatal pig colon //Developmental Dynamics. 1978. №. 3(152). P. 269-285.
- 131. Yano J. M. et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis // Cell. -2015. N<sub> $\odot$ </sub>. 2(161). P. 264-276.
- 132. Young H. M., Bergner A. J., Müller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest–derived cells in the mouse intestine //Journal of Comparative Neurology.  $-2003. N_{\odot}$ . 1(456). -P. 1-11.
- 133. Young H. M., Hearn C. J., Newgreen D. F. Embryology and development of the enteric nervous system //Gut. -2000. No. suppl 4(47). P. iv12-iv14.
- 134. Yu B., Chiou P. W. S. The morphological changes of intestinal mucosa in growing rabbits //Laboratory animals.  $-1997. N_{\odot}$ . 3(31). -P. 254-263.