

Механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, и их нарушение у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника

Е. А. Полуэктова, О. С. Ляшенко, А. В. Королев, О. С. Шифрин, В. Т. Ивашкин

Кафедра пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет» им И. М. Сеченова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Mechanisms of bacterial-to-host interaction and their disorders at inflammatory bowel diseases

Ye. A. Poluektova, O. S. Lyashenko, A. V. Korolev, O. S. Shifrin, V. T. Ivashkin

Chair of internal diseases propeдевtics, medical faculty, State educational government-financed institution of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university». Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Цель обзора. Рассмотреть современные представления о взаимодействии бактериальных клеток с организмом человека, а также о нарушении взаимодействия микро- и макроорганизма при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК).

Основные положения. У пациентов, страдающих ВЗК, выявляются как качественные, так и количественные изменения микрофлоры в сторону увеличения содержания условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Возможность контакта бактерий с клетками иммунной системы обеспечивается способностью бактериальных клеток к адгезии и инвазии, компетентностью слоя слизи, выступающей оболочку желудочно-кишечного тракта, задерживающей и фиксирующей микробные клетки, полноценностью функции межклеточных контактов эпителиального слоя, плотностью сигнальных рецепторов, уровнем экспрессии антимикробных пептидов, завершенностью процесса аутофагии. Нарушение барьерной функции кишечника у пациентов, рассматриваемой категории, в сочетании

The aim of review. To discuss modern concepts on interaction of bacterial cells with human body, and disorders of micro-and macroorganism interaction at inflammatory bowel diseases (IBD).

Summary. Quantitative and qualitative changes of intestinal microflora are revealed in patients with IBD, with tendency to increase of opportunistic and pathogenic microorganisms contents. The capability of bacteria contact with immune cells is provided by capacity of bacterial cells to adhesion and invasion, competence of mucus layer covering mucosa of gastro-intestinal tract, detaining and fixing microbic cells, competence of intercellular epithelial contacts function, density of signal receptors, level of antimicrobial peptides expression, completeness of autophagy process. Disorder of barrier function of intestine at IBD patients, in combination to prevalence of opportunistic and pathogenic microorganisms in intestinal biome, results in essential overload of innate and adaptive immune system.

Conclusion. At IBD, all mechanisms providing interaction of bacterial cells with the host body are malfunctioning.

Полуэктова Елена Александровна — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник НОКЦ «Инновационной терапии», врач-терапевт отделения хронических заболеваний кишечника и поджелудочной железы Клиники пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и гепатологии им В. Х. Василенко УКБ № 2 ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова». Контактная информация: poluektova@rambler.ru; 119991, Москва, ул. Погодинская, д. 1 стр. 1
Poluektova Yelena A — MD, leading research associate, Scientific and educational clinical center of innovative therapy, doctor of department of chronic intestinal and pancreatic diseases, Vasilenko Clinic of internal diseases propeдевtics, gastroenterology and hepatology, State educational government-financed institution of higher professional education «Sechenov First Moscow state medical university», Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Contact information: poluektova@rambler.ru; 119991, Moscow, Pogodinskaya street, 1, bld 1.

с преобладанием в кишечном биоценозе условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, приводит к существенно большему напряжению иннатной и адаптивной иммунной систем.

Заключение. У пациентов, страдающих ВЗК, в той или иной степени нарушены все механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, что, в сочетании с генетической предрасположенностью к данному заболеванию, приводит к формированию клинических симптомов и морфологических изменений.

Ключевые слова: микрофлора, плотные контакты, аутофагия, паттернраспознающие рецепторы, провоспалительные цитокины, иннатный и адаптивный иммунитет.

Обеспечение взаимодействия микробиома с организмом хозяина осуществляется при участии таких факторов как:

- состав микробиома *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ);
- возможность контакта бактериальных клеток с клетками иммунной системы;
- способность организма хозяина к элиминации бактериальных клеток;
- особенности иннатного и адаптивного иммунитета.

В последние годы в зарубежной и отечественной литературе приводятся результаты большого количества исследований, подтверждающих основополагающую роль кишечной микрофлоры в формировании *воспалительных заболеваний кишечника* (ВЗК). Многочисленные эксперименты подтверждают невозможность индукции и поддержания воспаления кишечной стенки у животных, находящихся в стерильных условиях, при отсутствии кишечной микрофлоры.

Предполагается, что ВЗК развиваются под влиянием факторов окружающей среды у генетически предрасположенных лиц при взаимодействии иммунных факторов защиты и микрофлоры, обитающей в просвете кишки, проявляются неспособностью иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника, контролировать воспалительный процесс [65].

Особенности качественного и количественного состава микрофлоры желудочно-кишечного тракта

В кишечнике взрослого человека содержится около 10^{14} бактериальных клеток, включающих в себя до 1000 видов различных бактерий, причем в толстой кишке находятся 70% всех микробных клеток, населяющих организм человека, большинство из которых относятся к *симбионтам*. Длительное совместное существование

tioning to some extent, that, in combination to genetic predisposition to this disease, results in development of clinical symptoms and morphological changes.

Key words: microflora, tight junctions, autophagy, pattern-recognizing receptors, proinflammatory cytokines, innate and adaptive immunity.

микроорганизмов и организма хозяина носит название симбиоз (от греч. *symbiosis*, совместное проживание). К наиболее распространенным бактериям-симбионтам, обитающим в кишечнике здорового человека, относятся *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, причем преобладают *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [25, 47]. Симбионты выполняют множество функций, к основным из которых можно отнести защитную, пищеварительную, абсорбционную, антиканцерогенную, синтетическую и иммуномодулирующую [8].

У пациентов, страдающих ВЗК, зарегистрированы как качественные, так и количественные изменения микрофлоры в сторону увеличения содержания условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Например, D. N. Frank и соавт. в своем исследовании продемонстрировали, что в биоптатах тонкой и толстой кишки, полученных у пациентов с *болезнью Крона* (БК) и *язвенным колитом* (ЯК), оказалось сниженным количество последовательностей рРНК, характерных для *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и повышено число рРНК последовательностей *Proteobacteria* и *Actinobacteria* по сравнению со здоровыми лицами [30].

P. Seksik и соавт. провели анализ кишечной микрофлоры у больных ВЗК с различной активностью заболевания. Было выявлено уменьшение разнообразия *Bacteroides* у пациентов в стадии обострения БК по сравнению с теми, у кого заболевание находилось в стадии ремиссии, и у здоровых лиц [70].

Изучение микробного профиля кишечника у пациентов с БК, ЯК и здоровых лиц, выполненное B. P. Willing и соавт. в 2012 г., позволило сделать выводы об отличии микробиома у больных БК и здоровых лиц за счет практически полного исчезновения *Faecalibacterium* и *Roseburia*, относящихся к классу *Clostridia*, играющих важную роль в опосредовании иммунного ответа [80].

По данным отдельных исследований, отмечается снижение разнообразия бифидо- и лактобак-

терий, а также увеличение количества бактерий, продуцирующих сероводород (*Fusobacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Bacteroides clostridiformis* и др.) в фекалиях пациентов с ВЗК [34, 39].

Таким образом, у больных, страдающих ВЗК, отмечается уменьшение содержания в кишечнике *Firmicutes* и *Bacteroides*, являющихся основными продуцентами короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), необходимых для формирования слизистого барьера, экспрессии белков плотных контактов (клаудина-2), энергообеспечения колоноцитов и регуляции иммунного ответа [29, 41, 69, 76].

Увеличение содержания таких микроорганизмов, как *Fusobacterium spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* может приводить к избыточной продукции сероводорода. Сероводород, в свою очередь, блокирует процесс окисления жирных кислот, приводя к энергетическому дефициту в эпителиоцитах. Кроме того, сероводород обладает способностью стимулировать выработку провоспалительных цитокинов, что приводит у лиц с мутациями в определенных генах, к не вполне предсказуемой активации адаптивной иммунной системы [6], ингибирует фагоцитоз и лизис бактериальных клеток [32, 61].

Инвазивная *E. coli*, относящаяся к типу протеобактерий, достоверно чаще выявляемая в фекалиях лиц, страдающих ВЗК, стимулирует выработку молекул адгезии (СЕАСАМ6 — *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6*); на основании анализа результатов исследования, выполненного группой авторов [23], было доказано также, что инвазивная *E. coli* обладает способностью повышать экспрессию клаудина-2, одного из белков, формирующих межклеточные контакты и выполняющего функцию селективного канала для парацеллюлярного транспорта воды [62].

Возможность контакта бактерий с клетками иммунной системы

Возможность контакта бактерий с клетками иммунной системы обеспечивается способностью бактериальных клеток к адгезии и инвазии, компетентностью слоя слизи, задерживающей и фиксирующей патогенные микроорганизмы, полноценностью функции межклеточных контактов эпителиального слоя, плотностью сигнальных рецепторов, уровнем экспрессии *антимикробных пептидов* (АМП) и завершенностью процесса аутофагии.

Способность бактериальных клеток к адгезии и инвазии

Способностью к адгезии и инвазии в большей степени отличаются патогенные микроорганизмы за счет наличия у них таких «инструментов», как пили — выросты нитевидной формы, расположен-

ные на полюсах бактериальной клетки и облегчающие проникновение бактериальной клетки в собственную пластинку слизистой оболочки; интегрины, обладающие свойством взаимодействовать с матриксными белками (фибронектином, коллагеном, ламинином и др.), что облегчает «приклеивание» бактерий к клеткам-мишеням хозяина [10].

Компетентность слоя слизи

Эпителиальные клетки продуцируют двухслойную слизистую пленку. Плотный внутренний слой, или гликокаликс, прилежит к эпителиальным клеткам. В этом слое происходит связывание и стабилизация питательных веществ, необходимых для восстановления эпителиального слоя. Наружный вязкий слой содержит растворимые муцины, секретируемые бокаловидными клетками, в отличие от стерильного внутреннего в наружном слое находится также комменсальная микрофлора. Толщина слоя кишечной слизи отличается в различных отделах кишечника: в проксимальной части тонкой кишки слизистый слой прерывистый и тонкий, в дистальных частях толстой кишки — толстый и непрерывный [40], что связано с различной бактериальной нагрузкой (10^3 – 10^5 КОЕ кишечного содержимого в просвете двенадцатиперстной кишки и тощей кишки; около 10^8 КОЕ в подвздошной кишке и 10^{10} – 10^{12} КОЕ в толстой кишке) [22].

В литературе приводятся данные о нарушении слизистого барьера у пациентов, страдающих ВЗК, что в сочетании с преобладанием в кишечном биоценозе условно-патогенных и патогенных микроорганизмов приводит к существенно большему напряжению иннатной и адаптивной иммунной систем у таких больных [71].

Функция межклеточных контактов

Слизистый слой находится на поверхности эпителиального пласта. На всем протяжении внутренняя поверхность ЖКТ покрыта эпителиальной выстилкой, строение которой различается в зависимости от основной функции органа. Тонкая кишка покрыта однослойным призматическим каемчатым эпителием, состоящим из четырех основных популяций клеток — цилиндрические эпителиоциты, бокаловидные экзокриноциты, клетки Панета (или экзокриноциты с ацидофильными гранулами), эндокриноциты, а также М-клетки, являющиеся модификацией цилиндрических эпителиоцитов. Источником образования этих популяций служат стволовые клетки, находящиеся на дне кишечных крипт. Внутренняя поверхность толстой кишки выстлана однослойным призматическим эпителием, состоящим из трех основных видов клеток: цилиндрические эпителиоциты, бокаловидные экзокриноциты и желудочно-кишечные эндокриноциты [2, 6].

Кишечный эпителий выполняет две основные функции. Во-первых, он представляет собой барьер между содержимым кишечника и внутренней средой организма [17, 59], во-вторых, функционирует как селективный фильтр, обеспечивающий возможность перемещения нутриентов, электролитов и воды из просвета кишечника в кровяное русло [17, 18, 28, 43].

Избирательная проницаемость кишечного эпителия опосредована двумя механизмами — трансцеллюлярным/трансэпителиальным и парацеллюлярным [73]. Трансцеллюлярная проницаемость связана с переносом растворенных веществ через эпителиальную клетку и преимущественно регулируется селективными транспортерами для аминокислот, электролитов, КЖК и сахаров [18, 28, 43].

Парацеллюлярная проницаемость связана с транспортом через межэпителиальные промежутки и регулируется межклеточными комплексами, расположенными на стыке апикально-латеральной мембраны и по латеральной поверхности мембраны [75].

Соединительные комплексы, тесно связывающие эпителиальные клетки между собой, состоят из трех основных компонентов: плотные контакты (*tight junctions* — TJs), адгезионные (слипчивые) контакты (*adherens junctions* — AJs) и десмосомы [27].

Плотные контакты (TJs) — расположенные «верхушечно» соединительные комплексы, образующие кольцо вокруг эпителиальных клеток на границе между верхушечной и латеральной областями мембраны (запирающая зона — *zonula occludens*), действуют в качестве селективного/полупроницаемого парацеллюлярного барьера, способствуя прохождению воды и электролитов через межклеточные пространства и предотвращая транслокацию антигенов, микроорганизмов и их токсинов. Кроме того, плотные контакты ограничивают диффузию липидов и белков между апикальной и базолатеральной мембранами клетки, способствуя сохранению полярности клетки [73]. Плотные контакты сформированы трансмембранными белками, такими как окклюдин, клаудины, молекулы адгезии — JAMs (*Junctional adhesion molecules*) и трицеллюлин.

Окклюдин — мембранный белок с двумя внеклеточными петлями, коротким цитоплазматическим N-концом и длинным цитоплазматическим C-концом. Регулирует транспорт малых гидрофильных молекул и прохождение нейтрофилов через эпителиальный слой.

Клаудины представляют собой мембранные белки с четырьмя гидрофобными трансмембранными доменами, двумя внеклеточными петлями, N- и C-концевыми цитоплазматическими доменами. Создают сеть внутримембранных фибрилл, которая опоясывает клетку, разделяет мембрану

на апикальную и базолатеральную части и играет основную роль в формировании барьерной функции системы плотных контактов. В настоящее время описано 24 клаудина. Взаимодействие клаудин—клаудин между клетками может быть гомофильным и гетерофильным. Гомофильные взаимодействия были описаны у клаудинов -1, -2, -3, -5, -6, -9, -11, -14, -19. Гетерофильные взаимодействия более ограничены и прежде всего характерны для клаудина-3, который может взаимодействовать с клаудинами -1, -2 и -5. Полагают, что эти селективные взаимодействия объясняют разнообразие в формировании TJ и обеспечивают молекулярную основу тканеспецифичной гетерогенности барьерной функции [74]. Получены данные, свидетельствующие о том, что клаудины -1, -3, -4, -5, -8 повышают барьерные свойства эпителия [13, 31], клаудины -2, -10, -15 функционируют как парацеллюлярные селективные каналы для транспорта малых ионов [14], клаудин-2 выступает также как селективный канал для парацеллюлярного транспорта воды [62].

Молекулы адгезии JAMs — мембранные белки, которые принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов. Экспрессируются несколькими типами клеток, в том числе эпителиальными и иммунными.

Трицеллюлин — трансмембранный белок, образующий барьер для макромолекул, не влияющий на транспорт ионов. Способствует укреплению контактов между тремя эпителиальными клетками в отличие от клаудина, который действует между двумя клетками. Известно четыре изоформы трицеллюлина, из них наиболее изучена TRIC- α .

Адгезионные контакты (AJs), известные также как *zonula adherens* (поясок сцепления), локализованы в точках контакта между клетками на латеральной мембране, образуются в результате взаимодействия трансмембранных белков (E-кадгеринины), внутриклеточных белков-адаптеров (катенины) и цитоскелета [33, 35, 68].

E-кадгеринины (кальций-зависимые молекулы адгезии) — трансмембранные гликопротеины, у которых C-конец расположен внутриклеточно, а N-конец — вне клетки. Внеклеточный домен образует связи с кадгеринами соседних клеток, способствуя адгезии между ними. Внутриклеточный домен содержит катенинсвязывающий домен, который взаимодействует с катенинами (ρ 120-катенин, β -катенин, α -катенин) и цитоплазматическими белками. Катенины ассоциированы с белками цитоскелета (F-актином). Кадгерин-катениновые комплексы важны не только для соединения соседних клеток друг с другом, но и для поддержания полярности клеток, регуляции эпителиальной миграции и пролиферации.

Адгезионные контакты расположены под плотными контактами, участвуют в межклеточной

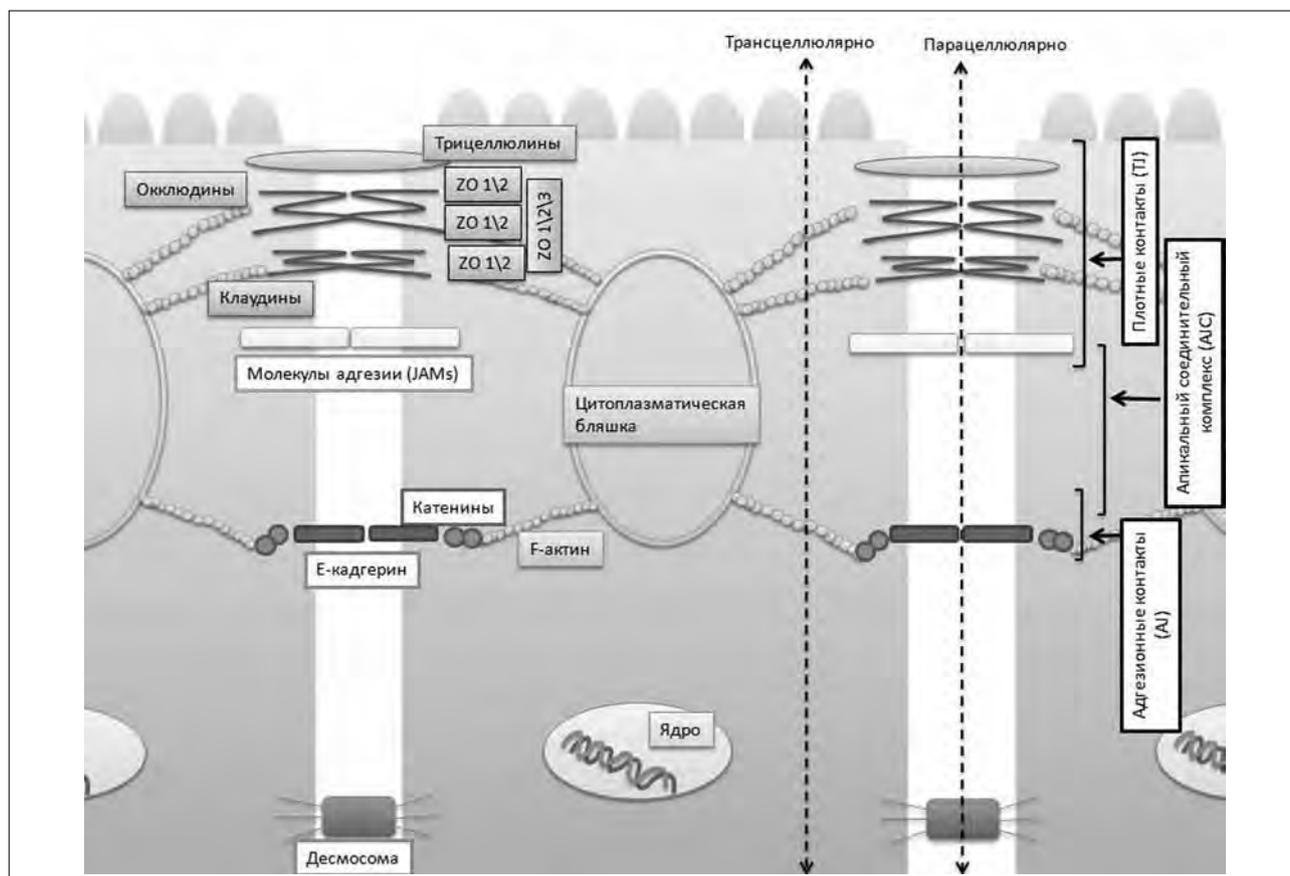


Рис. 1. Схема строения соединительных комплексов эпителиальных клеток кишечника
 Кишечный эпителий представлен слоем поляризованных клеток. Эпителиальные клетки тесно связаны между собой соединительными комплексами, которые состоят из трех основных компонентов: плотные контакты (tight junctions – TJ), адгезионные (слипчивые) контакты (adherens junctions – AJs) и десмосомы. TJ и AJs, известные как *апикальный соединительный комплекс* (Apical Junction Complex – AJC), состоят из трансмембранных белков, которые взаимодействуют друг с другом, соединяя соседние клетки, а внеклеточными доменами связаны с цитоскелетом, способствуя поддержанию структуры клеток. Десмосомы представляют собой плотные «бляшки», соединяющиеся с кератиновыми филаментами, обеспечивая прочные соединения между клетками

адгезии и обеспечении обмена информации между клетками. Оба этих контакта, известные как апикальный соединительный комплекс (*Apical Junction Complex – AJC*), связаны с актиновым цитоскелетом клетки, представляющим собой сложную структуру белковых нитей, находящихся в цитозоле и способствующих поддержанию структуры всех эукариотических клеток [15].

Десмосомы – межклеточные контакты, обеспечивающие прочное соединение клеток, что важно для поддержания целостности эпителия. Функция десмосом в кишечном эпителии изучена недостаточно [44] (рис. 1).

В литературе приводятся данные относительно изменения экспрессии белков плотных контактов у пациентов с ВЗК. Так, при изучении биоптатов слизистой оболочки сигмовидной ободочной кишки у больных с умеренной степенью активности БК было выявлено нарушение строения плотных контактов (TJ), характеризующееся снижением количества белковых нитей, уменьшением

глубины сетчатой структуры, снижением экспрессии клаудинов -3, -5, -8 и окклюдина, увеличением экспрессии клаудина-2 [82]. При исследовании биоптатов толстой кишки у пациентов с ЯК отмечалось снижение экспрессии клаудинов -1, -4 и окклюдина, а также увеличение экспрессии клаудина-2 [37].

В другом исследовании, выполненном у больных ЯК и БК, было продемонстрировано снижение экспрессии TRIC- α при ЯК, но не при БК, что свидетельствовало об увеличении проницаемости эпителия для макромолекул у лиц, страдающих данным заболеванием [42].

Имеются также сообщения о том, что модуляция микрофлоры с помощью пробиотических продуктов приводит к увеличению целостности эпителиального барьера за счет увеличения экспрессии белков плотных контактов (ZO-1 и окклюдина) [19].

Сигнальные рецепторы

В норме в слизистой оболочке кишечника существуют сбалансированные механизмы регуляции иммунологической толерантности хозяина к непрерывному воздействию компонентов клеточной стенки представителей резидентной микрофлоры кишечника и их конечных продуктов метаболизма. Распознавание компонентов (*патоген-ассоциированных молекулярных паттернов* — PAMPs) бактериальных клеток происходит антигенпрезентирующими и эпителиальными клетками за счет наличия на их клеточной мембране паттернраспознающих рецепторов (*pattern-recognition receptors* — PRR).

Паттернраспознающие рецепторы по механизму действия делятся на эндоцитозные и сигнальные. Эндоцитозные PRR (маннозные и рецепторы-мусорщики — «scavenger») экспрессированы на поверхности фагоцитов и ответственны за узнавание соответствующего PAMP, его поглощение, разрушение и образование антигенных детерминант, которые в сочетании с молекулами *главного комплекса гистосовместимости* (MHC) класса II представляются клеткам адаптивной иммунной системы и таким образом запускается классический иммунный ответ [6]. К сигнальным PRR относятся *toll-подобные рецепторы* — TLR и *NOD-подобные рецепторы* — NLR.

У человека семейство TLR насчитывает 11 рецепторов — от TLR1 до TLR10, 10 из них распознают практически все известные PAMPs грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов и грибов. Ген TLR11 у человека содержит несколько стоп-кодонов, которые участвуют в остановке синтеза белков. Большинство TLR располагается на клеточной мембране эпителиальных и антигенпрезентирующих клеток.

Распознавание рецептором специфичного PAMP инициирует передачу сигналов по двум различным путям: 1) с участием MyD88 — *myeloid differentiation primary response gene 88* и 2) альтернативному TRIF-зависимому пути — *TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta* [12].

Оба пути в конечном итоге приводят к опосредованному через NF-κB синтезу ИЛ-1, -2, -6, -8, -12, ФНОα, ИФНγ, *гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора* (ГМ-КСФ). Помимо цитокинов мишенями для NF-κB служат гены молекул адгезии, белков острой фазы, ферментов воспаления (НО-синтазы, циклооксигеназы и т. д.) [6].

NOD-подобные рецепторы — это семейство внутриклеточных PRR, в которое входит более 20 рецепторов. В 2008 г. международной организацией для координации исследований по геному человека — Human Genome Organization (HUGO) для NOD-рецепторов была предложена

иная номенклатура — NLRs. Акроним NLR обозначается как аббревиатура для «*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing*» protein. Другие названия, такие как NOD-рецепторы, CATERPILLER (CLR), NALP, PAN и PYPAF считаются устаревшими.

NLRs передают сигнал через систему киназ (*mitogen-activated protein kinase* — MAPK), что приводит к активации NF-κB, синтезу провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, белков острой фазы, ферментов воспаления, и участвуют в распознавании бактерий, расположенных внутриклеточно [81].

У пациентов с ВЗК описаны мутации генов, кодирующих белки сигнальных рецепторов. Например, у больных ЯК обнаружена мутация гена, кодирующего экспрессию TLR-4, что нарушает распознавание липополисахарида клеточной стенки бактерий [72].

Кроме того, при ВЗК отмечается увеличение экспрессии TLR9, локализованных на клеточной мембране Т-лимфоцитов памяти, причем имеется прямая корреляция между тяжестью обострения заболевания и уровнем экспрессии сигнальных рецепторов [16], у пациентов с ВЗК выявляется также увеличение экспрессии TLR3 и TLR4 на мембране эпителиоцитов [45, 57]. Помимо этого описаны мутации гена NLR при БК, приводящие к потере функции. Утрата функции гена заключается в снижении толерантности слизистой оболочки к микроорганизмам, так как мутировавший рецептор утрачивает способность к восприятию компонентов бактериальной клетки [38, 46, 52, 77].

Активация PRR приводит к продукции АМП, секретируемых эпителиальными клетками и клетками Панета.

Антимикробные пептиды

Антимикробные пептиды представляют собой небольшие молекулы, построенные из аминокислот. Механизм действия АМП связан главным образом с нарушением структуры и функций цитоплазматической мембраны микроорганизмов, что, в свою очередь, ведет к гибели последних. На сегодняшний день у человека обнаружено три семейства АМП — дефензины, кателицидины и гистатины.

Среди *дефензинов* млекопитающих выделяют две основные группы: α- и β-дефензины, различающиеся по положению дисульфидных связей в молекуле. У человека α-дефензины представлены нейтрофильными пептидами (*human neutrophil peptides* — HNP 1–4), обнаруживаемыми в нейтрофилах, и α-дефензинами 5 и 6 (HD-5 и HD-6), которые в основном секретируются клетками Панета под контролем распознавания бактерий сигнальными TLR и NLR [64], причем продукция HD-5 и HD-6 в толстой кишке значительно ниже, чем в тонкой.

HNPs способствуют активации адаптивного иммунитета путем стимуляции дифференцировки лейкоцитов и мобилизации дендритных клеток. HNP1 и HNP2 способны привлекать в очаг воспаления моноциты; HNP1, HNP3 и HD-5 отвечают за хемотракцию макрофагов и Т-клеток памяти.

HD-5 обладают антимикробным действием, направленным на разрушение мембраны бактерий (haarpoons), а также способны нейтрализовать бактериальные экзотоксины [63]. Не так давно идентифицированные HD-6 формируют «мини-сети», которые окружают и «связывают» бактерии [20]. Данные, полученные в исследованиях *in vivo*, показывают, что α -дефензины играют ключевую роль в защите от патогенов, попавших с пищей или водой [20, 63].

Установлено, что β -дефензины обнаруживаются в лейкоцитах и эпителиальных клетках. У человека описано 6 типов β -дефензинов (hBDs); уровень hBD1 остается стабильным при воспалении, тогда как экспрессия hBD2, hBD3 и hBD4 индуцируется после контакта с патогеном [54]. В дополнение к антимикробным свойствам в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий β -дефензины стимулируют реакции иннатной и адаптивной иммунной систем, активируя дифференцировку лейкоцитов [55]; hBD1–3 обладают хемотаксической активностью в отношении незрелых дендритных клеток и Т-клеток памяти, hBD2 способен индуцировать восстановление популяции нейтрофилов и тучных клеток.

У лиц, страдающих ВЗК, отмечается существенное снижение экспрессии АМП по сравнению с таковым у здоровых лиц. Например, при изучении операционного и биопсийного материала слизистой оболочки подвздошной кишки, J. Wehkamp и соавт. в своем исследовании показали, что у пациентов с БК данной локализации оказалась сниженной продукция как HD-5, так и HD-6 [79]. У больных ЯК, напротив, выявлено повышение уровня HD-5, HD-6 и hBD2 по сравнению с группой здоровых лиц [26]. При этом снижение экспрессии hBD1 отмечалось у пациентов как с ЯК, так и с БК [78].

Кателицидины — АМП, локализующиеся в пероксидаза-отрицательных гранулах нейтрофилов. Формируются в результате протеолиза белка-предшественника [24]. У человека идентифицирован только один предшественник кателицидинов — hCAP18, синтезируемый главным образом в лейкоцитах (нейтрофилах, лимфоцитах, моноцитах), эпителиальных клетках и расщепляющийся с образованием пептида LL-37 и целого набора более коротких пептидов [3, 11]. Антибактериальный С-концевой фрагмент hCAP18 — LL-37 (37 аминокислот) проявляет антимикробную активность против грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, некоторых вирусов и простейших, оказывая

синергичный эффект с дефензинами, а также цитотоксичность по отношению к клеткам организма млекопитающих. У человека кателицидин LL-37/hCAP18 обнаружен в верхней части крипт толстой кишки. Усиление его экспрессии наблюдается при кишечных инфекциях [1]. По данным исследования, выполненного J. Schaubert и соавт. в 2006 г., у пациентов с ЯК отмечалось повышение экспрессии LL-37 в слизистой оболочке толстой кишки [66].

Гепсидин — 25-аминокислотный пептид, вырабатываемый гепатоцитами, может синтезироваться также макрофагами, жировыми клетками и кардиомиоцитами [51]. Изначально был описан как мочевой АМП. Антимикробный эффект гепсидина обусловлен непосредственным воздействием на мембрану бактериальной клетки, а также ограничением использования микроорганизмами железа. Повышение экспрессии гепсидина служит характерным ответом на инфекцию. Экспрессия гепсидина при ВЗК не изучалась.

Способность организма хозяина к элиминации бактериальных клеток. Аутофагия

Аутофагия — один из способов избавления клеток от ненужных органелл, а организма от ненужных клеток. Различают три типа аутофагии — микроаутофагию, макроаутофагию и шаперон-зависимую аутофагию.

При *микроаутофагии* макромолекулы и обломки клеточных мембран захватываются лизосомами. Таким путем клетка может переваривать белки при нехватке энергии или строительного материала (например, при голодании).

При *макроаутофагии* участок цитоплазмы (часто содержащий какие-либо органоиды) окружается мембраной, похожей на цистерну эндоплазматической сети. В результате этот участок отделяется от остальной цитоплазмы двумя мембранами. Такие двухмембранные органеллы называются аутофагосомами. Аутофагосомы соединяются с лизосомами, образуя аутофагосомы, в которых органеллы и остальное содержимое перевариваются. С помощью макроаутофагии клетка может избавляться от «отслуживших свой срок» органоидов (митохондрий, рибосом и др.)

Третий тип аутофагии — *шаперон-опосредованная аутофагия*, при которой происходит направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в ее полость, где они перевариваются. Этот тип аутофагии описан только для млекопитающих. Шаперон-зависимая аутофагия происходит при участии цитоплазматических белков-шаперонов семейства hsc-70, вспомогательных белков и LAMP-2A (*lysosomal-associated membrane protein 2A*), который служит мембранным рецептором комплекса шаперона и белка, подлежащего

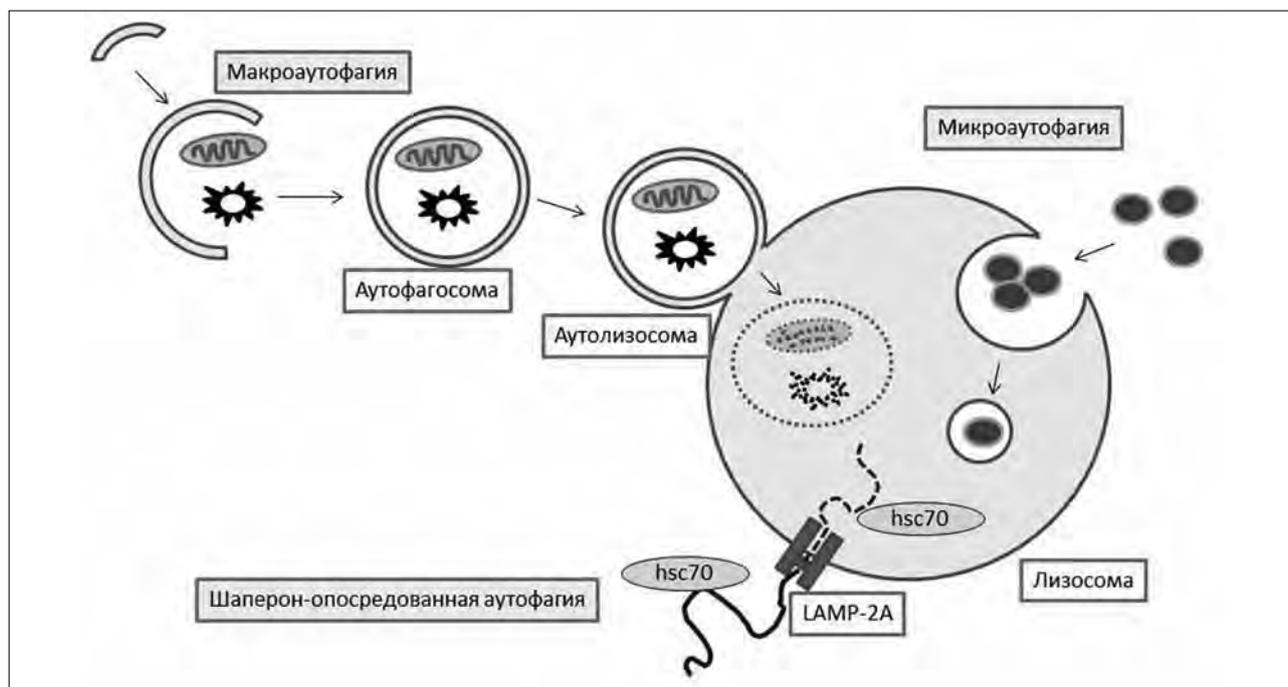


Рис. 2. Аутофагия

Различают три типа аутофагии. При микроаутофагии макромолекулы и обломки клеточных мембран захватываются лизосомами. Макроаутофагия характеризуется формированием аутофагосом, двухмембранных органелл, окружающих удаляемые органеллы и цитоплазму. Далее аутофагосома сливается с лизосомой с образованием аутолизосомы, в которой происходит переваривание ее содержимого. При шаперон-опосредованной аутофагии происходит направленный транспорт частично денатурировавших белков из цитоплазмы сквозь мембрану лизосомы в ее полость, где они перевариваются при участии цитоплазматических белков-шаперонов семейства hsc-70, вспомогательных белков и LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein 2A)

транспорту в лизосому. При аутофагическом типе клеточной гибели перевариваются все органеллы клетки, остаются лишь «осколки», поглощаемые макрофагами [53] (рис. 2).

Описано нарушение процесса аутофагии у пациентов, страдающих БК, за счет полиморфизма генов, участвующих в обеспечении данного процесса (*immunity-related GTPase family M – IRGM gene, autophagy-related gene 16L1 – ATG16L1*) [48, 49, 58, 60], а также за счет гипоксии эпителиоцитов слизистой оболочки [56].

Нарушение процесса аутофагии в виде накопления в клетках недоутилизированного материала приводит к развитию и персистенции воспаления за счет изменения функционирования белков главного комплекса гистосовместимости и клеток адаптивной иммунной системы [67].

Иннатные и адаптивные факторы защиты

В том случае, если микроорганизм преодолевает защитные механизмы неспецифического иммунитета, происходит инициация адаптивной иммунной системы. При этом первый, и решающий, шаг состоит в активации Т-лимфоцитов. Наивные, не контактировавшие с антигенами, Т-клетки циркулируют между кровью и периферической лимфо-

идной тканью и остаются в неактивном состоянии до встречи с инфекционным агентом или другим сигналом опасности. Узнавание бактериального антигена или сигнала опасности сопровождается пролиферацией и дифференцировкой наивных лимфоцитов в эффекторные лимфоциты, способные отвечать на инфекцию.

Наивные Т-клетки могут активироваться только *антигенпрезентирующими клетками* (АПК) – макрофагами, *дендритными клетками* (DC) и В-лимфоцитами [21]. Дифференциация наивных Т-клеток в функциональные эффекторные клетки контролируется сигналами из неспецифической иммунной системы. Секретция ИЛ-12 и ИЛ-18 макрофагами и DC, IFN γ NK-клетками способствует дифференцировке наивных клеток в CD8⁺ цитотоксические Т-клетки и CD4⁺ Т-хелперные клетки (Th1). ИЛ-4 и ИЛ-6 способствуют программированию дифференцировки Т-клеток в направлении CD4⁺ Th2-клеток. Th1- и Th2-клетки различаются между собой набором продуцируемых цитокинов. Так, Th1 продуцируют IFN γ , ИЛ-2, TNF, тогда как Th2 – ИЛ-4, 5, 10 и 13. На основании проведенных исследований было доказано, что защита организма от внутриклеточных патогенов происходит с помощью формирования клеточного иммунитета, зависящего от Th1, в то время как внеклеточные патогены ней-

трализируются и выводятся из организма благодаря гуморальному иммунитету, поддерживаемому Th2-клетками [7].

Клеточный иммунитет — тип иммунного ответа, в процессе которого активируются макрофаги, натуральные киллеры и антигенспецифические цитотоксические Т-лимфоциты [9], что проявляется реакцией *гиперчувствительности замедленного типа* (ГЗТ). Последовательность событий складывается из следующих этапов. Первичное внедрение внутриклеточно расположенного антигена в организм приводит к накоплению специфических Th1-клеток. При повторном проникновении антигена происходит его захват тканевыми макрофагами, которые выводят фрагменты антигена в комплексе с молекулами II класса МНС на свою поверхность. Уже существующие антигенспецифические Th1-клетки взаимодействуют с иммуногенным комплексом на поверхности макрофага.

После взаимодействия Th1-клетки начинают секрецию цитокинов, обеспечивающих реакцию воспаления — *макрофагингибирующего фактора* (МИФ), *макрофагального хемотоксического фактора* (МХФ), $IFN\gamma$, $IFN\beta$, ФНО β , ИЛ-3 и ГМ-КСФ. МИФ и МХФ привлекают в зону проникновения антигена дополнительные фагоцитирующие клетки, $IFN\gamma$ активирует макрофаги, которые усиливают продукцию медиаторов воспаления, ФНО β определяет локальное тканевое повреждение и усиливает экспрессию адгезивных молекул, ИЛ-3 и ГМ-КСФ обеспечивают созревание моноцитов. Вновь образующиеся моноциты — макрофаги, мигрируя в зону воспаления, компенсируют убыль тех макрофагов, которые, выполнив свою функцию, разрушаются. Эти процессы завершаются за 24–48 ч формированием воспалительного очага.

Известны три типа реакции ГЗТ — туберкулиновая, контактная и гранулематозная. Первые две развиваются в течение 2–3 сут, гранулематозная реакция — через 21–28 сут и вызывает наиболее серьезные клинические последствия. К важнейшим заболеваниям с гранулематозными реакциями ГЗТ относятся проказа, туберкулез, шистосомоз, саркоидоз, БК. Активация макрофагов лимфоцитами может способствовать ограничению инфекции, но постоянная стимуляция способна приводить к повреждению тканей.

Гуморальный иммунитет строится на образовании антител к каждому антигену, попадающему в организм человека. Реакции, связанные с иммунопатологическими механизмами, которые служат проявлением гуморального иммунитета, называются реакциями гиперчувствительности немедленного типа, представленными в тканях иммунным воспалением. При этом в стенках сосудов развивается фибриноидный некроз (некротизирующий васкулит), повышается сосудистая проницаемость

для грубодисперсных белков (фибриноген) и форменных элементов крови, что приводит к повреждению слизистой оболочки кишки, образованию эрозий и язв.

Следует отметить крайне важную роль макрофагов в формировании иммунного ответа. Это связано с тем, что внедрение в организм чужеродного агента вызывает мощную активацию макрофагов, выделение цитокинов и других медиаторов воспаления. Макрофаги, стимулированные внутриклеточными микробами, такими как вирусы или бактерии, липополисахаридом и/или $IFN\gamma$, отвечают продукцией провоспалительных цитокинов ИЛ-1, $TNF\alpha$, ИЛ-12 и $IFN\gamma$ и генерацией активных форм кислорода и азота. Такой фенотип макрофагов получил название M1 [50]. Макрофаги, стимулированные внеклеточно расположенными бактериями или паразитами, формируют альтернативный M2 фенотип и продуцируют такие цитокины, как ИЛ-10, ИЛ-13. Провоспалительные цитокины ИЛ-1, $TNF\alpha$, ИЛ-12 и $IFN\gamma$, продуцируемые преимущественно M1 фенотипом, потенцируют развитие Th0 клеток в Th1 и угнетают Th2 ответ. Таким образом, M1 макрофаги интегрированы в клеточный Th1 ответ. Противовоспалительные цитокины ИЛ-10, ИЛ-4 и ИЛ-13, продуцируемые преимущественно M2 фенотипом, сдвигают дифференцировку Th0 клеток в Th2 и ингибируют пролиферацию Th1, т. е. Th1 клетки продуцируют тот же набор цитокинов, что и M1 макрофаги, а Th2 — что и M2 макрофаги [4].

Третья популяция $CD4+$ Т-клеток, обладающих регуляторными функциями, относится к Th3 или Т-регуляторным 1 (Tr1) клеткам. Эти клетки секретируют ИЛ-10 и $TNF\beta$ и участвуют в поддержании иммунологической толерантности на поверхности слизистых оболочек. Таким образом, неспецифическая и специфическая иммунные системы находятся в постоянном диалоге, взаимно регулируя одна другую [5].

У пациентов с БК, вероятно, вследствие имеющихся нарушений иннатного иммунитета в виде мутации гена NLR2, ответственного за контакт с бактериальными клетками, антигенпрезентирующих клеток, дифференцировка наивных Th-клеток происходит преимущественно в Th1-клетки с одновременной блокадой формирования Th2-лимфоцитов. Th1-клетки участвуют в реакциях гиперчувствительности замедленного типа и способствуют развитию гранулем в тканях [7, 36].

При ЯК дифференцировка наивных лимфоцитов происходит главным образом в направлении Th2-клеток, что приводит к реализации иммунологической реактивности организма по типу гуморального иммунитета и в итоге способствует формированию эрозий и язв в слизистой оболочке кишки.

Возможно, к вышеописанным изменениям адаптивного иммунитета у больных ЯК приво-

дят мутации генов МНС, что, в свою очередь, обуславливает нарушение связывания антигенов и представления их Т-клеткам, или полиморфизм генов, непосредственно кодирующих экспрессию провоспалительных цитокинов [6].

Заключение

У пациентов, страдающих ВЗК, в той или иной степени нарушены все механизмы, обеспечивающие взаимодействие бактериальных клеток с организмом хозяина, что в сочетании с генетической предрасположенностью к данному заболеванию приводит к формированию клинических симптомов, а также морфологических изменений.

Список литературы

1. Алешина Г.М., Кокряков В.Н., Шамова О.В., Орлов Д.С. и др. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета. Мед академ журн 2010; 4:149-60.
1. Aleshina G.M., Kokryakov V.N., Shamova O.V., Orlov D.S., et al. Modern concept on antimicrobial peptides as molecular factors of immunity. Med akadem zhurn 2010; 4:149-60.
2. Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А. Гистология. М.: Медицина; 2001. 743 с.
2. Afanasyev Yu.I., Yurina N.A. Histology. M.: Medicine; 2001. 743 p.
3. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины — мультифункциональные катионные пептиды человека. Иммунопатол аллергол инфектол 2008; 2:31-40.
3. Budikhina A.S., Pinegin B.V. Defensins - the multifunctional cationic human peptides. Immunopatol allergol infektol 2008; 2:31-40.
4. Вассерман Е.Н., Лямина С.В., Шимшелашвили Ш.Л., Абрамова Е.В., Назаров В.А., Круглов С.В., Малышева Е.В., Беарс М.Ф., Гоу А.Д., Малышев И.Ю. SP-D контролирует баланс TH1 и TH2 цитокинов и обладает признаками эндогенного фактора репрограммирования макрофагов. Фундаментальные исследования 2010; 6:28-36.
4. Vasserman Ye.N., Lyamina S.V., Shimshelashvili Sh.L., Abramova Ye.V., Nazarov V.A., Kruglov S.V., Malysheva Ye.V., Bears M.F., Gou A.D., Malyshev I. Yu. SP-D controls TH1 and TH2 cytokine balance and possesses attributes of endogenous of macrophage reprogramming factor. Basic researches 2010; 6:28-36.
5. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2008; 18(4):4-14.
5. Ivashkin V.T. Basic concepts and positions of fundamental immunology. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol 2008; 18(4):4-14.
6. Ивашкин В.Т., Полуэктова Е.А. Функциональные расстройства желудочно-кишечного тракта. М.: МЕДпресс-информ; 2013. 128 с.
6. Ivashkin V.T., Poluektova Ye.A. Functional disorders of gastro-intestinal tract. M.: MEDpress-inform; 2013.128 p.
7. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб: Фолиант; 2008. 552 с.
7. Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. SPb: Foliant; 2008. 552 p.
8. Кучумова С.Ю., Полуэктова Е.А., Шептулин А.А., Ивашкин В.Т. Физиологическое значение кишечной микрофлоры. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2011; 21(5):17-27.
8. Kuchumova S.Yu., Poluektova Ye.A., Sheptulin A.A., Ivashkin V.T. Physiological role of intestinal microflora. Ros zhurn gastroenterol gepatol koloproktol 2011; 21(5):17-27.
9. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Роимм А. Иммунология = Immunology, 7th ed., Elsevier. 2006; 1. М.: Логосфера; 2007. 568 с.
9. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt A. Immunology, 7th ed., Elsevier. 2006; 1. M.: Logosfera; 2007. 568 p.
10. Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом. Клин микробиол антимикроб химиотер 2001; 3 (4):301-15.
10. Sidorenko S.V. Infectious process as «dialogue» between the host and parasite. Klin mikrobiol antimikrob khimioter 2001; 3(4):301-15.
11. Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jörnvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood 2000; 96 (Suppl. 9):3086-93.
12. Akira S., Takeda K. Review Toll-like receptor signaling. Nat Rev Immunol 2004; 4 (Suppl. 7):499-511.
13. Amasheh M., Andres S., et al. Barrier effects of nutritional factors. Ann N Y Acad Sci 2009; 1165:267-73.
14. Amasheh S., Meiri N., et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. J Cell Sci 2002; 115 (Pt 24):4969-76.
15. Banan A., Choudhary S., Zhang Y., Fields J.Z., Keshavarzian A. Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms. J Pharmacol Exp Ther 1999; 291:1075-85.
16. Berkowitz D., Peri R., Lavy A., Kessel A. Increased Toll-like receptor 9 expression by B cells from inflammatory bowel disease patients. Hum Immunol 2013; 74 (Suppl. 12):1519-23.
17. Blikslager A.T., Moeser A.J., Gookin J.L., Jones S.L., Podle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. Physiol Rev 2007; 87:545-64.
18. Broer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. Physiol Rev 2008; 88:249-86.
19. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes 2008; 57:1470-81.
20. Chu H., Pazgier M., Jung G., Nuccio S.P., Castillo P.A., de Jong M.F., et al. Human alpha-defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. Science 2012; 337 (Suppl. 6093):477-81.

21. *Coombes J.L., Siddiqui K.R., Arancibia-Carcamo C.V., Hall J., Sun C.M., Belkaid Y., Powrie F.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204:1757-64.
22. *Craig L Maynard, Charles O Elson, Robin D Hatton, Casey T Weaver.* Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012; 489:231-41.
23. *Denizot J., Sivignon A., Barreau F., Darcha C., Chan H.F., Stanners C.P., Hofman P., Darfeuille-Michaud A., Barnich N.* Adherent-invasive Escherichia coli induce claudin-2 expression and barrier defect in CEABAC10 mice and Crohn's disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18 (Suppl. 2):294-304.
24. *Desai D., Faubion W.A., Sandborn W.J.* Review Article: Biological Activity Markers in Inflammatory Bowel Disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25:247-25.
25. *Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.* Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308 (Suppl. 5728):1635-8.
26. *Fahlgren A., Hammarström S., Danielsson A., Hammarström M.L.* Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 131 (Suppl. 1):90-101.
27. *Farquher M.G., Palade G.E.* Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; 17:375-412.
28. *Ferraris R.P., Diamond J.* Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 1997; 77:257-302.
29. *Fleming L.L., Floch M.H.* Digestion and absorption of fiber carbohydrate in the colon. *Am J Gastroenterol* 1986; 81:507-11.
30. *Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:13780-5.
31. *Furuse M., Hata M., et al.* Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156 (Suppl. 6):1099-111.
32. *Gardiner K.R., Halliday M.I., Barclay G.R., Milne L., Brown D., Stephens S., Maxwell R.J., Rowlands B.J.* Significance of systemic endotoxaemia in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 36:897-901.
33. *Gumbiner B.* Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 1993; 123:1631-3.
34. *Hammer H.F.* Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2011; 29:550-3.
35. *Hartsock A., Nelson W.J.* Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:660-9.
36. *Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C.* Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:19440-5.
37. *Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., Christ M., Hillenbrand B., Mankertz J., Gitter A.H., Bürgel N., Fromm M., Zeitl M., Fuss I., Strober W., Schulzke J.D.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129 (Suppl. 2):550-64.
38. *Hugot J.P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard J.P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C.A., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Cortot A., Modigliani R., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C., Macry J., Colombel J.F., Sahbatou M., Thomas G.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411 (Suppl. 6837):599-603.
39. *Iebba V., Aloï M., Civitelli F., Cucchiara S.* Gut microbiota and pediatric disease. *Dig Dis* 2011; 29:531-9.
40. *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. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:4659-65.
41. *Krishnan S., Ramakrishna B.S., Binder H.J.* Stimulation of sodium chloride absorption from secreting rat colon by short-chain fatty acids. *Dig Dis Sci* 1999; 44 (Suppl. 9):1924-30.
42. *Krug S.M., Bojarski C., Fromm A., Jörg Dieter J.S., Fromm M.* Tricellulin in Crohn's disease and ulcerative colitis. *FASEB J* 2010 (Meeting Abstract Supplement) 998. 1.
43. *Kunzelmann K., Mall M.* Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 2002; 82:245-89.
44. *Laukoetter M.G., Nava P., Nusrat A.* Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14 (Suppl. 3):401-7.
45. *Leal R.F., Milanski M., Agrizono Mde L., Coope A., Rodrigues V.S., Portovedo M., Oliveira L.M., Fagundes J.J., Coy C.S., Velloso L.A.* Toll-like receptor 4, F4/80 and pro-inflammatory cytokines in intestinal and mesenteric fat tissue of Crohn's disease. *Int J Clin Exp Med* 2013; 6(Suppl. 2):98-104.
46. *Lesage S., Zouali H., Cezard J.P., et al.* CARD 15/NOD2 mutational analysis and genotype/phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70:845-57.
47. *Louis P., Scott K.P., Duncan S.H., Flint H.J.* *J Appl Microbiol* 2007; 102 (Suppl. 5):1197-208.
48. *Lu C., Chen J., Xu H.G., Zhou X., He Q., Li Y.L., Jiang G., et al.* MIR106B and MIR93 Prevent Removal of Bacteria From Epithelial Cells by Disrupting ATG16L1-Mediated Autophagy. *Gastroenterology* 2014; 146 (Suppl. 1):188-99.
49. *Lu X.C., Tao Y., Wu C., Zhao P.L., Li K., Zheng J.Y., Li L.X.* Association between variants of the autophagy related gene - IRGM and susceptibility to Crohn's Disease and Ulcerative Colitis: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8 (Suppl. 11).
50. *Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., et al.* Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13:453-61.
51. *Merle U.* The iron regulatory peptide hepcidin is expressed in the heart and regulated by hypoxia and inflammation. *Endocrinology* 2007; 148 (6):2663-8.
52. *Ogura Y., Lala S., Xin W., Smith E., Dowds T.A., Chen F.F., et al.* Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52 (Suppl. 11):1591-7.
53. *Oh J.E., Lee H.K.* Modulation of pathogen recognition by autophagy. *Front Immunol* 2012; 3:44.
54. *O'Neil D.A., Porter E.M., Elewaut D., Anderson G.M., Eckmann L., Ganz T., Kagnoff M.F.* Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163 (Suppl. 12):6718-24.
55. *Oppenheim J.J., Yang D.* Review Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005; 17 (Suppl. 4):359-65.
56. *Ortiz-Masiá D., Cosín-Roger J., Calatayud S., Hernández C., Alós R., Hinojosa J., Apostolova N., Alvarez A., Barrachina M.D.* Hypoxic macrophages impair autophagy in epithelial cells through Wnt1: relevance in IBD. *Mucosal Immunol* 2013.
57. *Østvik A.E., Granlund A.V., Torp S.H., Flatberg A., Beisvåg V., Waldum H.L., Flo T.H., Espevik T., Damås J.K., Sandvik A.K.* Expression of Toll-like receptor-3 is enhanced in active inflammatory bowel disease and mediates the excessive release of lipocalin 2. *Clin Exp Immunol* 2013; 173 (Suppl. 3):502-11.
58. *Parkes M., Barrett J.C., Prescott N.J., Tremelling M., Anderson C.A., Fisher S.A., Roberts R.G., Nimmo E.R., et al.* Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39 (Suppl. 7):830-2.
59. *Podolsky D.K.* Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best

- offense is a good defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999; 277:495-9.
60. Rioux J.D., Xavier R.J., Taylor K.D., Silverberg M.S., Goyette P., Huett A., Green T., Kuballa P., Barmada M.M., Datta L.W., Shugart Y.Y., Griffiths A.M., Targan S.R., Ippoliti A.F., Bernard E.J., Mei L., Nicolae D.L., Regueiro M., Schumm L.P., Steinhart A.H., Rotter J.I., Duerr R.H., Cho J.H., Daly M.J., Brant S.R. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39 (Suppl. 5):596-604.
 61. Roediger W.E., Duncan A., Kapaniris O., Millard S. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1993; 104:802-9.
 62. Rosenthal R., Milatz S., Krug S.M., Oelrich B., Schulzke J.D., et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 2010; 123:1913-21.
 63. Salzman H.N., Ghosh D., Huttner K.M., Paterson Y., Bevins C.L. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003; 422 (Suppl. 6931):522-6.
 64. Salzman N.H., Hung K., Haribnai D., Chu H., et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol* 2010; 11 (Suppl. 1):76-83.
 65. Sandborn W., Rogler G. The keys to IBD 2010: Treatment, diagnosis and pathophysiology. *Peprint Dig Dis* 2010; 28(3).
 66. Schaubert J., Rieger D., Weiler F., Wehkamp J., Eck M., Fellermann K., Scheppach W., Gallo R.L., Stange E.F. Heterogeneous expression of human cathelicidin hCAP18/LL-37 in inflammatory bowel diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18 (Suppl. 6):615-21.
 67. Schmid D., Pypaert M., Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 2007; 26 (Suppl. 1):79-92.
 68. Schneeberger E.E., Lynch R.D. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1992; 262:647-61.
 69. Segain J.P., Raingeard de la Blétière D., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottière H.M., Galmiche J.P. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47:397-403.
 70. Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G., Sutren M., Pochart P., Marteau P., et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52:237-42.
 71. Sepehri S., Kotłowski R., Bernstein C.N., Krause D.O. Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13 (Suppl. 6):675-83.
 72. Török H.P., Glas J., Tonenchi L., Mussack T., Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004; 112 (Suppl. 1):85-91.
 73. Tsukita S., Furuse M., Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:285-93.
 74. Turksen K., Troy T.C. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 2004; 117:2435-47.
 75. Van Itallie C.M., Anderson J.M. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006; 68:403-29.
 76. Vanhoutvin S.A., Troost F.J., Hamer H.M., Lindsey P.J., Koek G.H., Jonkers D.M., Kodde A., Venema K., Brummer R.J. Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One* 2009; 4:6759.
 77. Watanabe T., Asano N., Murray P.J., et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2008; 118:545-59.
 78. Wehkamp J., Harder J., Weichenthal M., Mueller O., Herrlinger K.R., Fellermann K., Schroeder J.M., Stange E.F. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9 (Suppl. 4):215-23.
 79. Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (Suppl. 50):18129-34.
 80. Willing B.P., Dicksved J., Halfvarson J., Andersson A.F., Lucio M., Zheng Z., et al. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 2010; 139:1844-54.
 81. Yeretssian G. Review Effector functions of NLRs in the intestine: innate sensing, cell death, and disease. *Immunol Res* 2012; 54 (Suppl. 1-3):25-36.
 82. Zeissig S., Burgel N., Gunzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 2007; 56:61-72.