



РАЗЛИЧНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ КРОНА

Байкова Ю.П., Ракитина Д.В., Щербаков П.Л., Говорун В.М.
ФГБУ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической Медицины ФМБА России

EXPERIMENTAL ANIMAL MODELS OF CROHN'S DISEASE

Baykova Yu.P., Rakitina D.V., Shcherbakov P.L., Govorun V.M.
FSBIS RCPM FMBA of Russia

Байкова Ю.П. — н.с. лаборатории протеомного анализа, к.б.н.
Ракитина Д.В. — с.н.с. лаборатории протеомного анализа, к.б.н.
Щербаков П.Л. — заместитель генерального директора по лечебной работе — главный врач, д.м.н., профессор
Говорун В.М. — генеральный директор, член-корреспондент РАН, д.б.н., профессор

Байкова Юлия Павловна
Baykova Yulia P.
baykjulia@gmail.com

Резюме

Болезнь Крона (БК), входящая в группу воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) представляет собой хроническое рецидивирующее заболевание неясного генеза. Считается, что в патогенез БК вовлечены aberrантные иммунные реакции в ответ на патогенную кишечную микрофлору, в частности на условно патогенные *E. coli*, но точная причина возникновения болезни до сих пор остается неизвестной. Поэтому терапия при БК во многом зависит от стадии заболевания и является симптоматической.

Наиболее эффективным методом для изучения патогенеза заболевания и подбора подходящей терапии до сих пор остается моделирование БК in vivo. На сегодняшний день существует более шестидесяти различных животных моделей БК, условно разделенных на четыре группы: химическая индукция заболевания, заселение модельного объекта определенным патогенным микроорганизмом, спонтанное возникновение заболевания у генетически модифицированных животных и пересадка клеток иммунной системы иммунодефицитным животным.

Ключевые слова: болезнь Крона, экспериментальные животные модели, *Escherichia coli*

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 141 (5): 33–38

Summary

Crohn's disease (CD), a member of inflammatory bowel disease group (IBD), is a chronic relapsing disease of unknown origin. It is considered, that the pathogenesis of CD involves aberrant immune reactions in response to the pathogenic intestinal microflora, in particular opportunistic *E. coli*, but the exact cause of the disease still remains unknown. Therefore, the CD therapy depends on the stage of the disease and remains symptomatic.

The most effective method for pathogenesis study of the CD and the selection of appropriate treatment is in vivo CD models. Today, there are more than sixty different animal models of CD, conventionally divided into four groups: chemical induction of the disease, the introduction of specific pathogen into model object, spontaneous occurrence of the disease in genetically modified animals and transplantation of immune system cells into immunodeficient animals.

Keywords: Crohn's disease, experimental animal models, *Escherichia coli*

Ekspperimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 141 (5): 33–38

Введение

Болезнь Крона — хроническое рецидивирующее заболевание ЖКТ, при котором воспалительный инфильтрат распространяется на все слои стенки кишечника. Ранняя стадия болезни характеризуется макрофагальной и лимфоцитарной инфильтрацией подслизистого слоя, изъязвлением эпителия и неравномерной инфильтрацией нейтрофилами. Для поздних стадий болезни характерны гранулемы саркоидного типа, язвы, фиброз стенок кишечника, спайки. Клиническая симптоматика БК во многом зависит от локализации и степени поражения стенки кишечника, и точный диагноз возможно поставить только после эндоскопического и гистологического исследования, причем на поздних стадиях развития болезни [6, 9, 10, 16].

Сложность диагностики и лечения, а также неустановленная причина болезни делают исследование БК *in vivo* на модельных животных необходимым.

Для изучения ВЗК в качестве модельных животных используют грызунов (мышей и крыс), минипигов и кроликов. Перспективными модельными животными считаются минипиги, так как их анатомо-гистологические структуры, физиология и даже биохимия во многом сходны с таковыми у человека [2, 29]. Но, к сожалению, использование минипигов в качестве модели патогенеза БК на данный момент ограничено высокой стоимостью содержания, сложностями с получением гнотобиотических особей, поддержанием СПФ-статуса и получением необходимых генетических нокаутов [26, 29].

Использование лабораторных грызунов получило широкое распространение благодаря доступности всех категорий качества, воспроизводимости, возможности выбора наиболее подходящей линии,

простоте и невысокой стоимости содержания [1]. Анатомия желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) мыши и человека имеет схожее строение. Тем не менее, есть ряд макро- и микроскопические различий в строении органов ЖКТ [28], которые следует учитывать при использовании мышей как объекта для моделирования ВЗК человека. Этими особенностями во многом обусловлен и различный состав нормальной микрофлоры кишечника.

В целом, микрофлора кишечника как человека, так и мыши относится в основном к двум доминирующим типам, *Bacteroidetes* and *Firmicutes* [8]. Однако, различия в представленности конкретных родов и видов бактерий весьма значительны. Из 226 различных родов бактерий, характерных для человека, только 80 обнаружены и у мышей. Например, представители родов *Ruminococcus*, *Lachnospira*, *Faecalibacterium*, *Dialister*, *Oscillospira*, *Sutterella*, *Prevotella* у мышей, в отличие от человека, практически не встречаются. В свою очередь, в микробиоте мышей преобладают *Lactobacillus*, *Alistipes* и *Turicibacter* [14, 21]. Тем не менее, данные различия не исключают использование мышей в качестве модельных объектов для исследования общих процессов, вызывающих изменение состава тотальной микрофлоры.

За последнее десятилетие было разработано большое количество мышинных моделей, имитирующих ВЗК, в частности илеит, терминальной стадией которого считают БК. Чаще всего для моделирования БК используют такие методы, как: химически индуцированный колит, внедрение патогенных микроорганизмов, моделирование спонтанного заболевания у трансгенных животных и их различные комбинации [19]. Далее данные модели будут рассмотрены более подробно.

Химически индуцированный колит

Наиболее популярной является модель химически индуцированного воспаления кишечника из-за ее простоты, хорошей воспроизводимости метода и возможности контролировать течение заболевания [4]. Главным достоинством химически индуцированных колитов является возможность варьировать тяжесть заболевания в зависимости от концентрации и длительности воздействия химического агента. Главный недостаток модели состоит

в том, что воспаление не затрагивает весь ЖКТ, а ремиссия прекращается с отменой лечения. Наиболее часто индукцию воспалительной реакции вызывают: выпаиванием 1,5–5 %-ном раствором декстрана сульфата натрия (ДСН) в питьевой воде, тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС) в 50 %-ном растворе этанола *per rectum* или же внутрибрюшинным введением пептидогликан-полисахарида (ПГ-ПС) [24].

Декстран сульфата натрия

ДСН используют, чтобы вызвать воспаление, имитирующее клинические и гистологические особенности язвенного колита (как острого, так и хронического). Наиболее подходящими модельными животными являются мыши линий C3H/HeJ, NOD/Ltj и NOD-scid и крысы линии Wistar. Токсическое действие ДСН у животных данных линий проявляется следующими симптомами: гиперемия, отеки и язвы среднего и дистального отделов толстого кишечника, кровавая диарея. Гистологические изменения включают в себя макрофагальную инфильтрацию, эрозию слизистой оболочки кишечника,

деформацию кишечного эпителия, сглаживание крипт кишечника [17].

Эффект от применения ДСН зависит от его концентрации и молекулярной массы, а также длительности воздействия. На основе экспериментальных данных были разработаны стандартизированные протоколы, согласно которым для моделирования острого ДСН-индуцированного колита необходимо выпаивание 3,5% ДСН (Mr ~40кДа) в течение 5 суток, хронического — выпаивание 0,5–1% ДСН в течение длительного времени (4–5 циклов, чередуя с чистой питьевой водой) или использование ДСН с Mr ~5кДа [24].

2,4,6-тринитробензолсульфоновая кислота

ТНБС вызывает трансмуральное воспаление, сопровождающееся лейкоцитарной инфильтрацией, отеком слизистой и изъязвлением стенок толстого кишечника. ТНБС активирует клеточный иммунный ответ с участием таких цитокинов, как ИЛ-12 и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), проявляющийся в значительной инфильтрации CD4 + Т-клетками, что соответствует клинической картине болезни Крона [20].

Как и в случаях с ДСН, эффект ТНБС зависит как от концентрации самой кислоты, так и от

процентного содержания этанола. Малые концентрации ТНБС и этанола приводят к временному дисбактериозу и воспалению, но не вызывают острый колит. Поэтому в качестве растворителя используют 50 % этанол и дозу TNBS в 10–40 мг/кг массы тела животного. Согласно стандартизированным протоколам ТНБС вводят ректально, по 0,8 мл крысам, 0,4 мл мышам и 30 мл минипигам. Токсический эффект проявляется на 2–4 сутки после введения [20, 24, 26].

Оксазолон

Раствор оксазолон в этаноле активирует гуморальный иммунный ответ с участием ИЛ-13 [24]. Гистологические изменения при однократном введении оксазолон, зависимость проявления симптомов от дозы химического агента и растворителя идентичны с таковыми при применении ТНБС. Методика введения оксазолон также схожа с методикой введения ТНБС. Но для индукции острого колита с помощью оксазолон необходима предварительная сенсibilизация 50–150 мкл 3–5 %

раствором оксазолон в 100 % этаноле. После сенсibilизации мышам ректально вводят 100 мкл 1 % оксазолон в 50 % растворе этанола, крысам — 450 мкл мкл 5 % оксазолон в 50 % этаноле [12].

Однако для моделирования воспаления кишечника при помощи оксазолон подходят не все линии мышей. Предпочтительным является использование мышей линии BALB и животных линий, предрасположенных к гуморальному иммунному ответу [12, 24].

Пептидогликан

Одна из наиболее точных моделей болезни Крона — индукция воспаления с помощью компонента клеточной стенки бактерий пептидогликана (ПГ-ПС). Чаще всего как источник ПГ-ПС используют лабораторные штаммы стрептококков группы А. В качестве модельных животных предпочтительны линия крыс Lewis, генетически предрасположенных к онкологическим заболеваниям, и линии

мышей CBA/J, RISK и NOD 2. Лапаротомия стенки толстого кишечника с последующей однократной инъекцией очищенного стерильного ПГ-ПС (в дозировке 12,5 мкг эквивалентов рамнозы на 1 г массы тела животного) вызывает хронический, спонтанно рецидивирующий энтероколит, сопровождающийся гранулематозом, что соответствует картине БК у человека [24, 25].

Внедрение патогенных организмов

Перспективной животной моделью БК является заселение ЖКТ животного отдельными штаммами микроорганизмов, характерных для микробиоты больных БК, или же очищенной микробиотой, полученной непосредственно от больных БК. Однако следует учитывать, что внедрение видоспецифичных микроорганизмов не представляется возможным, а отличная от человека представленность доминирующих микроорганизмов затрудняет сравнение экспериментальных данных с данными клинических исследований.

При моделировании БК для внедрения используют микроорганизмы, характерные для микрофлоры больных: из группы Bacteroidetes — *Bacteroides fragilis*, *Prevotella copri*, из группы Firmicutes — *Candidatus Savagella*, *Enterococcus faecalis*. Но чаще всего используют условно патогенные *Escherichia coli* B2 и D филогенетических групп, в частности внекишечные патогенные и адгезивно инвазивные *E. coli* [18].

Экспериментально было показано, что внедрение смеси патогенных микроорганизмов более эффективно, чем внедрение отдельного штамма. При этом в состав внедряемой смеси могут входить не только способные к инвазии бактериальные агенты, но и любые микроорганизмы, обладающие цито- и генотоксическими свойствами. Существует мнение, что развитию илеита в таких случаях

в первую очередь способствует снижение микробного разнообразия в сторону грамотрицательных бактерий. Например, развитие тяжелого илеита наблюдали через восемь суток после внедрения смеси *Toxoplasma gondii* и *Giardia muris* у мышей линий NOD 2, C57BL/6 и Swiss Webster. В пользу этого мнения говорит и то, что та же смесь, внедренная в организм устойчивых к дисбактериозу мышей линии CCR2(-/-), только в некоторых случаях вызвала развитие мягкого илеита [22].

Особенность моделирования ВЗК с помощью подселения микроорганизмов в том, что при использовании животных немодифицированных линий и/или одиночных штаммов микроорганизмов для полноценного развития болезни необходимо первичное нарушение в функционировании ЖКТ. Таким воздействием может служить обработка слабыми дозировками химических агентов, обработка ЖКТ антибиотиками или получение животными СПФ-статуса (то есть отсутствие нормальной для вида микрофлоры, что де-факто означает нарушенное функционирование кишечника) [18]. Например, однократное введение 20 мг стрептомицина мышам немодифицированных линий CD 1, DBA/2, C3H, 129е и C57BL/6 и последующее пероральное введение 10^9 КОЕ смеси адгезивно инвазивных *E. coli* NRG857с и LF82 (в соотношении 1:1) приводит к возникновению воспалительного процесса

и фиброза. Подобная смесь штаммов на 21 день вызывает стабильное трансмуральное воспаление, гиперплазию крипт, клеточную инфильтрацию в слизистой, подслизистой и люмене и фиброз слепой кишки. Без антибиотикотерапии данная смесь микроорганизмов оказывает токсигенный эффект на слизистую и вызывает симптомы, схожие с таковыми при колите, но не БК [5, 18].

Из генетически модифицированных линий, не требующих предварительной сенсебилизации, широкое распространение получила линия мышей СЕАВАС 10, для которой характерна изначально повышенная экспрессия СЕАСАМ6 — гена, кодирующего поверхностный гликопротеин, вовлеченный в клеточную адгезию. Адгезивно инвазивные *E. coli*, связываясь с СЕАСАМ6 эпителиальных клеток, вызывают повышенную экспрессию ФНО, что в свою очередь снижает

барьерную функцию эпителия и приводит сначала к развитию острой воспалительной реакции, а позже — симптомов, характерных для БК человека [4]. Помимо мышей линии СЕАВАС часто используют животных нокаутной линии NOD 2(-/-), так как именно NOD 2 стал первым идентифицированным геном, обуславливающим генетическую предрасположенность к развитию ВЗК [15]. У мышей линии NOD 2(-/-) достоверно отмечена дисфункция бокаловидных клеток тонкого кишечника, связанная с избыточной продукцией интерферона- γ интраэпителиальными лимфоцитами. Примечательно, что степень дисфункции зависит от количества и состава микробиоты, поэтому мыши линии NOD 2(-/-) также являются удобным объектом для изучения связи между активностью генов эпителиальных клеток кишечника и микрофлорой [4, 15].

Спонтанное развитие ВЗК у генетически модифицированных животных

Главным недостатком всех моделей спонтанного развития ВЗК является невозможность контроля сроков исследования и сильный разброс во времени и степени проявления симптоматики ВЗК. Тем не менее, модель часто используют в том случае, когда работа с химическими агентами и/или патогенами невозможна, или же задачи исследования требуют изучения генетической составляющей ВЗК.

Чаще всего для изучения спонтанно возникающих ВЗК используют генетически модифицированных мышей. Одна из наиболее успешных моделей спонтанного возникновения ВЗК — линия мышей SAMP1Yit/Fc. Для них характерно увеличение экспрессии цитокинов и хемокинов и связанных с ними рецепторов (в частности CCR 2), что приводит к развитию хронического воспалительного процесса в кишечнике, гистологическая картина которого практически полностью идентична таковой у больных БК [7].

Широко используемыми модельными животными являются ИЛ10(-/-) мыши, у которых воспаление кишечника из-за ингибирования синтеза ИЛ10,

важного противовоспалительного цитокина, наблюдают на 2–4 месяц жизни. Чаще всего ИЛ10(-/-) мышей используют для разработки схем лечения ВЗК человека с помощью различных иммунологических агентов, антибиотиков и пробиотиков.

Не меньший интерес представляет модель ФНО-опосредованного воспаления. У мышей линий TNF^{ARE/+} и VillinCreTnf^{fAREneo/+} в результате хронической гиперпродукции ФНО спонтанно развивается CD8+ Т лимфоцитозависимый илеит, напоминающий таковой при БК [11].

Одной из линий, используемых в схожей с ФНО-опосредованным воспалением модели, является линия T/I, у которой ингибирован синтез ИЛ-10, и ФНО. У данных генетических нокаутов уже к 4–5 неделе жизни спонтанно развивается тяжелая форма острого язвенного колита. При этом применение антибиотиков сразу после перехода мышей на самостоятельное питание предотвращало развитие язвенного колита (ЯК), что косвенно свидетельствует о значительной роли бактерий в развитии заболевания [11, 27].

Пересадка клеток иммунной системы иммунодефицитным животным

Отдельным методом получения спонтанного воспаления кишечника является пересадка CD 4⁺ CD 45RB^{high} Т клеток из селезенки мышей дикого типа иммунодефицитным мышам. Данный метод разработан достаточно давно, его методика оптимизирована и общедоступна. Помимо этого, модель унифицирует сроки наступления и тяжесть заболевания: на 6–8 неделю спонтанно развивается острый трансмуральный колит, связанный с клеточным ответом [23]. Данная модель является

одной из самых удобных для изучения роли регуляторных Т-клеток в развитии ВЗК. Гистологическая картина трансмурального колита после трансплантации CD 4⁺ Т-клеток схожа с таковой у человека [13]. Используя различные линии мышей в качестве донора и реципиента, можно добиться разной степени тяжести заболевания и скорости его развития, что позволяет исследовать не только терминальную стадию болезни, но и самые ранние ее проявления.

Заключение

Количество животных моделей, имитирующих тот или иной аспект БК, с каждым годом растет. На данный момент уже существуют модели, доказавшие свою эффективность и воспроизводимость результатов. Протоколы таких моделей, как химически индуцированные ВЗК и внедрение патогенных микроорганизмов, общедоступны и вариабельны.

Список сокращений

БК — болезнь Крона;

ВЗК — воспалительные заболевания кишечника;

ДСН — декстран сульфата натрия;

ЖКТ — желудочно-кишечный тракт;

ПГ-ПС — пептидогликан-полисахарид;

Перспективное направление подсадки микробиоты больных БК модельным животным и модели спонтанно возникающих ВЗК возможно применять не только в исследовательских, но и фармацевтических целях. Огромное количество накопленных данных делает возможным как изучение патогенеза БК, так и, в перспективе, установление причины данного заболевания.

СПФ — животные, в известной микрофлоре которых отсутствуют патогенные возбудители;

ТНБС — 2,4,6 — тринитробензолсульфоновая кислота;

ЯК — язвенный колит;

ФНО — фактор некроза опухоли;

ИЛ — интерлейкин

Литература

1. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях: учебное пособие для системы медицинского и фармацевтического послевузовского образования. — М.: Профиль, 2010. — 358 с.
2. Сидорчук А.А., Глушков А. А. Инфекционные болезни лабораторных животных. Учебное пособие, 1-е изд. — М.: Лань, 2009. —128 с.
3. Allan R.N., Rhodes J.M., Hanauer S. B. (eds) Inflammatory bowel diseases, 3rd edn. — London: Churchill Livingstone, 1997. — P. 863.
4. Barnich N. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease / Barnich N., Carvalho F. A., Glasser A. L. et al. // J Clin Invest. — 2007. — № 6 (117). — P. 1566–1574.
5. Carvalho F.A. Crohn's disease adherent-invasive Escherichia coli colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. // J Exp Med. — 2009. — № 10 (206). — P. 2179–89.
6. Corridonia D. Inflammatory bowel disease / Corridonia D., Arseneau K. O., Cominellia F. // Immunology Letters. — 2014. — № 2 (161). — P. 231–235.
7. Craven M. Inflammation drives dysbiosis and bacterial invasion in murine models of ileal Crohn's disease / Craven M., Egan C. E., Dowd S. E. et al. // PLoS One. — 2012. — № 7 (7). — e41594. doi: 10.1371/journal.pone.0041594.
8. Eckburg P.B. Diversity of the human intestinal microbial flora / Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N. et al. // Science. — 2005. — № 308 (5728). — P. 1635–1638.
9. Gevers D. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease / Gevers D., Kugathasan S., Denson L. A. et al. // Cell Host Microbe. — 2014. — № 3(15) — P. 382–392.
10. Golovics P.A. Inflammatory bowel disease course in Crohn's disease: Is the natural history changing? / Golovics P. A., Mandel M. D., Lovasz B. D. et al. // World J Gastroenterol. — 2014. — № 12 (20). — P. 3198–3207.
11. Hale L. P. A novel murine model of inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer with ulcerative colitis-like features / Hale L. P., Greer P. K. // PLoS ONE. — 2012. — № 7 (7). — e41797. doi:10.1371/journal.pone.0041797.
12. Kojima R. Oxazolone-induced colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative colitis / Kojima R., Kuroda S., Ohkishi T. et al. // J Pharmacol Sci. — 2004. — № 3 (96). — P. 307–313.
13. Laroux F.S. Regulation of chronic colitis in athymic nu/nu (nude) mice / Laroux F. S., Norris H. H., Houghton J. et al. // Int Immunol. — 2004. — № 1 (16). — P. 77–89.
14. Ley R.E. Obesity alters gut microbial ecology / Ley R. E., Bäckhed F., Turnbaugh P. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2005. — № 31(102). — P. 11070–11075.
15. Liao S.L. Maturation of Toll-like receptor 1–4 responsiveness during early life / Liao S. L., Yeh K. W., Lai S. H. et al. // Early Hum Dev. — 2013. — № 7 (89). — P. 473–478.
16. Louis E. From evidence-based medicine to personalized medicine in Crohn's disease / Louis E., Reenaers C., Van Kemseke C. et al. // Rev Med Liege. — 2015. — № 5 (70). — P. 316–320.
17. Mahler M. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis / Mahler M., Bristol I. J., Leiter E. H. et al. // American Journal of Physiology. — 1998. — № 3 (274). — P. 544–551.
18. Martinez-Medina M. Escherichia coli in chronic inflammatory bowel diseases: an update on adherent invasive Escherichia coli pathogenicity / Martinez-Medina M., Garcia-Gil L.J. // World J Gastrointest Pathophysiol. — 2014. — № 3(5). — P. 213–227.
19. Mizoguchi A. Animal models of inflammatory bowel disease. Progress in molecular biology and translational science // Prog Mol Biol Transl Sci. — 2012. — № 105. — P. 263–320.
20. Morampudi V. DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat / Morampudi V., Bhinder G., Wu X. et al. // J. Vis. Exp. — 2014. — № 84. — e51297. doi: 10.3791/51297.
21. Nguyen T. L. A. How informative is the mouse for human gut microbiota research? / Nguyen T. L. A., Vieira-Silva S., Liston A., Raes J. // Dis Model Mech. — 2015. — № 1(8). — P. 1–16.

22. *Pizarro T. T.* SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis / Pizarro T. T., Pastorelli L., Bamias G. et al. // *Inflammatory bowel diseases*. — 2011. — № 12 (17). — P. 2566–2584.
23. *Powrie F.* Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells / Powrie F., Leach M. W., Mauze S. et al. // *Immunity*. — 1994. — № 1(7). — P. 553–562.
24. *Randhawa P. K.* A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents / Randhawa P. K., Singh K., Singh N. // *Korean J Physiol*. — 2014. — № 4 (18). — P. 279–88.
25. *Reingold L.* Development of a peptidoglycan-polysaccharide murine model of Crohn's disease: effect of genetic background / Reingold L., Rahal K., Schmiedlin-Ren P. et al. // *Inflamm Bowel Dis*. — 2013. — № 6 (19). — P. 1238–1244.
26. *Remond D.* Intestinal inflammation increases gastrointestinal threonine uptake and mucin synthesis in enterally fed minipigs / Remond D., Buffiere C., Godin J. et al. // *J. Nutr.* — 2009. — № 4 (139). — P. 720–726.
27. *Roulis M.* Intestinal epithelial cells as producers but not targets of chronic TNF suffice to cause murine Crohn-like pathology / Roulis M., Armaka M., Manoloukos M. et al. // *PNAS*. — 2011. — № 13 (108). — P. 5396–5401.
28. *Treuting P. M.* Lower gastrointestinal tract / Treuting P. M., Dintzis S. M. // *Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas*, 1st edn. — 2012. — P. 177–192.
29. *van Mierlo G. J. D.* The minipig as an alternative non-rodent model for immunogenicity testing using the TNF α blockers adalimumab and infliximab / van Mierlo G. J. D., Cnubben N. H. P., Wouters D. et al. // *J Immunotoxicol.* — 2014. — № 1 (11). — P. 62–71.