

# Модели на възпалителни чревни заболявания в експерименталната фармакология

Д-р Веселин Маринов, д-р Антоанета Георгиева, маг. фарм. Мирослав Ефтимов,  
доц. Мария Желязкова-Савова, доц. Стефка Вълчева-Кузманова

*Катедра по предклинична и клинична фармакология, Медицински университет, Варна*

## Резюме

Към възпалителните чревни заболявания се отнасят две различни по същество, но тясно свързани състояния – болест на Крон и улцерозен колит. Важна информация за тези болести може да се получи при изследването на експериментално предизвикан колит при животни. В експерименталната фармакология има утвърдени животински модели, целящи да имитират една или повече черти на човешкото заболяване. Целта на настоящия обзор е да се направи преглед на три често използвани химически модела на чревно възпаление, при които се използват съответно тринитробензенсулфонова киселина, натриев декстрансулфат и оцетна киселина.

**Ключови думи:** възпалителни чревни заболявания, експериментални модели, тринитробензенсулфонова киселина, натриев декстрансулфат, оцетна киселина

## Models of Inflammatory Bowel Diseases in Experimental Pharmacology

Veselin Marinov, Antoaneta Georgieva,  
Miroslav Eftimov, Maria Zhelyazkova-Savova,  
Stefka Valcheva-Kuzmanova

Department of Preclinical and Clinical Pharmacology,  
Medical University of Varna

## Abstract

The inflammatory bowel diseases (IBD) refer essentially to two different but closely related conditions, Crohn's disease and ulcerative colitis. Important insight into the nature of human disease may be understood from the study of experimentally induced colitis in animals. In experimental pharmacology there are validated animal models, which aim to mimic one or more features of human disease. The purpose of this review is to provide an overview of the three commonly used chemical models of intestinal inflammation induced respectively by trinitrobenzenesulphonic acid, dextran sulfate sodium, and acetic acid.

**Key words:** inflammatory bowel diseases, experimental models, trinitrobenzenesulphonic acid, dextran sulfate sodium, acetic acid

## Увод

Данните от епидемиологични проучвания показват увеличение на честотата на хроничните възпалителни заболявания на червата, а именно – улцерозен колит и болест на Крон. И двете са многофакторни заболявания, които се проявяват с дисария, ректално кървене и коремна болка. Точните етиологични фактори на тези заболявания не са идентифицирани, но е ясно, че има повишен имунен отговор към иначе безвредни стимули, вероятно принадлежащи към бактерии, които са нормална част на чревната флора. Поради сложността на патогенезата на тези заболявания няма идеален модел на чревно възпаление. Все пак има няколко ценни експериментални модела за изучаване на различните компоненти на чревното възпаление и тяхното използване зависи от поставените въпроси. Химически индуцираните модели се състоят обикновено от интралуменно инстилиране на вещества, които

са токсични за чревната лигавица или са в състояние да предизвика имунен отговор.

## Модел на колит, индуциран от тринитробензенсулфонова киселина

Тринитробензенсулфоновата киселина (ТНБС) се използва за индуциране на възпалителни промени в дебелото черво на плъхове чрез ректална апликация. Получените в резултат клинични и хистопатологични увреди много наподобяват аналогичните промени при възпалителните заболявания на дебелото черво при човека – болест на Крон и улцерозен колит. По този начин чрез експерименталния модел на колит, индуциран от ТНБС при плъхове, могат да се изследват патогенезата и възможностите за лечение на възпалителните заболявания на дебелото черво при хората.

ТНБС притежава силни оксидативни свойства. Като химически хаптен ТНБС се свързва с тъканни

те протеини и по този начин ги уврежда и стимулира клетъчно-медиурния имунитет, осъществяван от Th1-лимфоцитите. Максималната увреда се наблюдава от три дни до една седмица след приложението на ТНБС. За експеримента обикновено се използват лабораторни Wistar плъхове. Животните се отглеждат при стандартни условия. Преди експеримента гладуват за период от 12–24 часа, но имат свободен достъп до вода за пиене. Обикновено подът на клетката е от телена мрежа с цел предотвратяване на копрофагията и изчистване на дебелото черво преди апликацията.

Съществуват много варианти за провеждането на протокола за индуциране на възпаление чрез ТНБС. Най-общото описание на модела е следното: ТНБС, разтворена във водно-етанолов разтвор с етанолова концентрация от 25 до 50%, се въвежда в лумена на колона чрез гъвкава сонда с външен диаметър 1–2 mm. Ролята на етанола е да осъществи проникването на ТНБС през мукозния слой и през лигавицата в дълбочина. Инстилацията се осъществява на 8 cm или на 4 cm проксимално от ануса – съответно в границата между напречната и низходящата или на нивото на низходящата част на дебелото черво. Преди въвеждането на сондата, поради болезненост на процедурата, животните се анестезират чрез пари на халотан или диетилов етер, интраперитонеално приложение на хлоралхидрат, ксилазин + кетамин интрамускулно или друг метод, като видът на анестезията няма отношение към резултатите от експеримента. Оптималната дозировка на ТНБС се изчислява или на килограм телесна маса или се използва фиксирана доза на опитно животно. Обемът на инстилирания разтвор е от 0.25 до 0.8 mL. След въвеждане на разтвора животните се държат с главата надолу в продължение на 1–3 min или повече с цел предотвратяване на изтичане на разтвора през ректума. След това опитните животни се връщат в клетките си, където се възстановяват от анестезията и отглеждането им продължава отново при първоначалните условия.

При последваща оценка на степента на увреда изследователите наблюдават следните зависимости:

1. По-високите концентрации на етанол (50%) водят до по-изразен ефект, отколкото по-ниските (25%), което се обяснява с по-доброто проникване на ТНБС през мукозната бариера<sup>12</sup>. Освен това етанолът в концентрации 30–50% сам по себе си индуцира остро възпаление и хиперемия<sup>3</sup>.

2. При по-малък обем на инстилираното съдържимо (съответно по-голяма концентрация на ТНБС при еквивалентна дозировка) степента на увреда е по-голяма и е по-малка вероятността за изтичане на разтвора през ректума.

3. Ефективните дози на ТНБС, предизвикващи възпалителните промени, са от 50–150 mg/kg, което се равнява на 10–30 mg ТНБС за стандартен плъх с тегло около 200 g. При дози над 150 mg/kg започва

да се наблюдава смъртност при опитните животни. Дози под 50 mg/kg не водят до съществени и дълготрайни възпалителни промени на лигавицата.

В ТНБС-индуцирания модел на колит се изследва фармакологичната активност на експериментални субстанции по отношение на способността им да възстановяват увредената лигавица. Третирането в повечето случаи започва едно денонощие след увреждането и продължава 1–2 седмици. Обособява се и контролна група, третирана с неактивни субстанции, за да се сравни ефективността на лечението. Възможно е и третиране на групи с доказано ефективни вещества, използвани за лечение на колит, като 5-аминосалицилова киселина, будезонид, преднизолон, сулфасалазин и други.

По време на опита се проследява и оценява състоянието на плъховете: промяна в теглото, брой дефекации и консистенция, наличие на кръв в изпражненията. След приключване на срока на третиране (обикновено 5–14 дни) опитните животни се евтаназират и промените се изследват макроскопски от един или повече независими наблюдатели, които не са информирани относно приложеното лечение на групата изследвани животни.

Макроскопското морфологично изследване може да бъде оценено по следната скала<sup>2</sup>:

По отношение на адхезиите: 0 – без адхезии, 1 – трудно отпрепарирани, 2 – видими адхезии, 3 – множество адхезии.

Изследва се за стесняване на лумена и обструкция: 0 – без обструкция, 1 – лека обструкция, 2 – значителна обструкция с фекални маси.

След това дебелото черво се отваря по дължина, внимателно се почиства от фекални маси, мезентериум и мастна тъкан. Измерва се дължината на цялото дебело черво, като се сравнява за скъсяване: 0 – нормална дължина (над 15 cm), 1 – под 15 cm, 2 – под 14 cm, 3 – под 13.5 cm.

Наблюдава се за участъци със задебелена лигавица и се оценява: 0 – няма разлика с нормално черво, 1 – задебеляване с 1–2 mm, 2 – задебеляване над 2 mm.

Оценява се степента на хиперемия: 0 – няма разлика с нормално черво, 1 – лека хиперемия, 2 – интензивна и генерализирана хиперемия, 3 – хеморагии.

Наличието на некрози се оценява по следния начин: 0 – няма признаци на некроза, 1 – малки участъци на некроза, 2 – малки сливащи се участъци на некроза, 3 – фокална некроза с диаметър под 0.8 cm, 4 – фокална некроза с диаметър над 0.8 cm, 5 – обширни некротични лезии.

Допълнителните критерии за тежестта на увреждането са: проксимална от стенозата дилатация +2 точки, деформации +2 точки, късливост +1 точка, цикатрикси +1 точка.

Друг обективен критерий за възпаление и оток е теглото на увредената част от органа. При инстилация на ТНБС на 8 cm от ануса се изрязват дисталните 10 cm от червото и се претеглят. Полу-

ченото съотношение д/ст служи за сравнителен критерий при преценка на увреждането.

При хистопатологичното изследване променените участъци от органа се фиксират в 4% буферизиран формалдехид и се оцветяват с хематоксилин и еозин. Предложена е скала за оценка и описание на промените в раличните слоеве от стената на дебелото черво<sup>14</sup>. Описват се последователно промените в: мукозен епител с ламина проприя, крипти, субмукоза, мускулен слой. Отделните слоеве се описват по следните критерии: оток, полиморфонуклеарна инфилтрация, мононуклеарна инфилтрация, улцерации, дилатации на крипти, митотична активност, редуциране на броя на гоблетовите клетки. Всеки критерий се оценява по скала от 0 до 4 в зависимост от промените: 0 – без промени, 1 – незначителни изменения, 2 – слаби промени, 3 – умерено изразени промени, 4 – силно изразени промени. Накрая точките се сумират, като максималният резултат е 59 точки.

Важни за оценка на степента на увреждането са и промените в някои биохимични показатели. Активността на миелопероксидазата (МПО) корелира с полиморфонуклеарната инфилтрация на тъканта. МПО е лизозомен ензим, експресиран в най-голяма степен в неутрофилните гранулоцити.

Тумор-некротизиращ фактор (TNF, предишно име TNF- $\alpha$ ) се произвежда главно от активирани макрофази, както и от други имунни клетки. Продукцията на TNF при възпалителните реакции индуцира покачване на температурата, кахексия, апоптоза, възпаление. Той е хемоатрактант за неутрофили и стимулира фагоцитозата. Предполага се, че играе роля и в патогенезата на възпалителните болести на дебелото черво.

IL-10 е антиинфламаторен цитокин, произвеждан главно от моноцити. Той намалява експресията на Th1-цитокени и ко-стимулаторни молекули на макрофагите. Може да блокира активността на нуклеарния фактор NF- $\kappa$ B. Играе съществена роля в имунорегулацията на гастроинтестиналния тракт. Пациенти с болест на Крон се повлияват благоприятно от терапия с рекомбинантни IL-10-продуциращи бактерии.

NF- $\kappa$ B е протеинов транскрипционен фактор, който играе ключова роля в регулирането на имунния отговор към инфекции, включително продукцията на цитокини и имуноглобулини. Индуцира се от TNF, свободни радикали, бактериални липополизахариди и други. Нивата на експресия на циклооксигеназа-2 (COX-2) и на индуцируемата азотен оксид синтаза (iNOS) също са асоциирани с тежестта на макроскопското увреждане.

### Модел на колит, индуциран от натриев декстрансулфат

Натриев декстрансулфат (НДС, dextran sulphate sodium, DSS)-индуцираният колит е широко използван, възпроизводим и лесно приложим животински модел (мишки, плъхове), въведен от Ohkusa et al.<sup>11</sup>,

чиято морфология и симптоматика наподобяват улцерозния колит при човека. Той притежава някои предимства в сравнение с другите животински модели на колит. Например чрез промяна в концентрацията и схемата на приложение на НДС може да се получи остър, хроничен или повтарящ се модел на чревно възпаление при животните. Освен това дисплазия, която наподобява клиничното протичане на улцерозен колит при хора, се среща в хроничната фаза на НДС-индуцирания колит. Трябва да се отбележи, че този модел често се използва за изучаването на свързаната с колит канцерогенеза. Изследвания, валидиращи НДС модела, показват, че получените резултати при миши модел на НДС-индуцирания колит могат да се съпоставят с човешкото заболяване<sup>9</sup>.

НДС е полианионна натриева сол на декстран, естерифициран с хлорсулфонова киселина. Представлява бял прах, разтворим във вода. При класическия модел на остър колит у плъхове или мишки НДС се добавя към питейната вода до получаването на 2–5% разтвор и се прилага за кратък период от 4 до 9 последователни дни. Начини за индуциране на хроничен колит са продължително приемане на ниски концентрации НДС (0.5% разтвор за 15 дни) или циклично приложение: например три последователни цикъла на приложение на 4% разтвор на НДС за период от 6 дни, последван от 6-дневен период на приемане на питейна вода<sup>4</sup>. Тежестта на колита може да бъде контролирана чрез промяна на продължителността на приема. Лека форма на колит се индуцира при 7-дневно приложение на 3% разтвор, а умерена – при приложение на 3% разтвор в два периода от по 7 дни с 14-дневен интервал между тях. Тежък колит се развива при приложение на 3% НДС в три 7-дневни периода с 14-дневни интервали между тях<sup>15</sup>.

Разтворът на НДС уврежда основно дисталното тънко черво, средното и дисталното дебело черво. НДС причинява ерозии с пълна загуба на повърхностния епител поради директния си токсичен ефект върху епителните клетки. Нарушава интегритета на епитела и увеличава пропускливостта на мукозата на колона. По този начин НДС причинява остър колит, морфологично и хистологично характеризира се с хиперемия, улцерации, чиято симптоматична изява е кървавата диария, умерен до силен субмукозен едем и лезии, съпроводени с хистопатологични изменения като инфилтрация от гранулоцити. Други симптоми са загубата на тегло, окултно кървене, пилоерекция, анемия.

Хистологичните изменения при острия колит се наблюдават първоначално след 3-дневно третиране. Те включват изчерпване на муцина, епителна дегенерация и некроза и загуба на базални крипти. Това е съпроводено от неутрофилна инфилтрация на ламина проприя и на субмукоза, крипти (трансепителна миграция на неутрофили в мукозния епител) и криптабсцеси (миграция на неутрофили през мукозния епи-

## Модел на колит, индуциран от оцетна киселина

тел в лумена на криптите) и флегмонозно възпаление на мукозата и субмукозата. В острата фаза на колита увреждането на бариерната епителна функция се демонстрира със загуба и преразпределение на протеините на плътните връзки и увеличен епителен апоптотичен индекс. Такива промени са докладвани и при възпалителните чревни заболявания у човека. Предполага се, че дисбалансът между апоптоза (увеличена) и пролиферация (намалена) е ангажиран в патогенезата на острата фаза на колита.

Хроничните изменения настъпват няколко седмици след приложението на веществото. Те включват инфилтрация на мононуклеарни левкоцити, промени в архитектурата на криптите, увеличаване на разстоянието между основите на криптите и lamina muscularis mucosae, дълбока мукозна лимфоцитоза и трансмурално възпаление, дори до степен образуване на лимфни фоликули.

Много възпалителни медиатори са замесени в патогенезата на НДС-индуцирания колит. Те включват цитокини, ейкозаноиди, кислородни радикали, азотен оксид, iNOS и продукти от активацията на комплемента. Характерно за НДС-индуцирания колит е повишението в нивата на TNF. Освен това НДС причинява нарушение в метаболизма на фосфолипидите и намаление в нивата на нуклеотидите.

В острата и хроничната фаза на колита са ангажирани различни възпалителни медиатори. В острата фаза са повишени TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 и IL-12<sup>19</sup>. Изследват се редица параметри като TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , муцин, МПО, както и броят на празни и запълнени гоблетови клетки. Отчитат се и загубата на тегло, ректалното кръвотечение и консистенцията на изпражненията като клинични параметри на т.нар. индекс на болестна активност.

Цикличното приложение на НДС освен хроничен улцерозен колит може да причини и развитие на колоректална дисплазия и рак с патологични находки, подобни на колит-индуцирана неоплазия при хора. Рискът от поява на неоплазия и прогресията ѝ до инвазивен рак се повишава при добавянето на познати колоректални карциногени azoxymethane (AOM), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)) или желязо.

НДС е със силно вариращо молекулно тегло от 5 до 1400 kDa. При мишки, третиран с НДС с различно молекулно тегло, е наблюдавано, че третираните с 5 kDa НДС животни развиват леки форми на колит, а третираните с 40 kDa НДС – по-тежки. Мишките, третиран с 500 kDa НДС, не развиват чревни лезии. Това се дължи на високото молекулно тегло, което не позволява навлизане в мукозата<sup>7</sup>.

При изследване на карциногенната активност на НДС е установено, че такава притежава само НДС със средно молекулно тегло. Молекулното тегло има значение и за локализацията на лезиите – при повишаване на молекулното тегло те се разполагат по-дистално в сравнение с тези при прилагане на НДС със средно молекулно тегло.

Моделът на колит, индуциран от оцетна киселина (ОК)<sup>1</sup> е предложен първоначално от McPherson и Pfeiffer<sup>8</sup>. Във времето методът се е наложил като класически поради някои предимства. Той е достъпен, евтин, лесно се осъществява, има добра възпроизводимост и ниска смъртност на животните.

Интра ректалното приложение на ОК предизвиква дозозависимо преходно увреждане, наподобяващо по патогенеза, хистопатологични белези и медиаторен профил улцерозния колит при човека. Съвременните модификации на метода най-често използват 1–2 mL от 4% (3–5%) разтвор на ОК (pH 2.3), бавно въведен на дълбочина 6–8 cm от ануса в лумена на ректума на леко анестезирани плъхове, гладували 24–36 часа преди това. В някои случаи е използвана и по-висока, 10% концентрация на ОК<sup>17</sup>. След експозиция от 15–30 s, при което животните се оставят в положение Тренделенбург, остатъкът от течността се евакуира и евентуално луменът се изплаква с 5 mL физиологичен разтвор. Някои автори използват инжектиране на въздух (2–3 mL) след инстилирането на ОК за равномерно и пълното ѝ разпределение в колона<sup>13</sup>. По аналогичен начин се процедурира и при използване на мишки като опитни животни.

Локалното приложение на ОК предизвиква възпаление на ректума. Моделът се базира на директно дразнене на епитела, водещо до кратко живеещи улцерации и възпаление. Началното въздействие се състои в епителна некроза, дължаща се на протонираната форма на киселината, предизвикваща интрацелуларно подкиселяване и значително клетъчно увреждане. Индуцираното от ОК нетрансмурално възпаление е ограничено в дисталната половина на колона и се характеризира с изразена неутрофилна инфилтрация на интестиналната тъкан, с масивна некроза на мукозата и субмукозата, с вазодилатация, оток и субмукозна улцерация, характерни и за човешкото заболяване<sup>8</sup>. Счита се, че възпалението при този модел е доминирано от Th2 тип имунна реакция. Най-често настъпилите промени се отчитат през първите 24–48 часа, но трябва да се има предвид, че в тази ранна фаза увреждането няма имунологична природа<sup>6</sup>. Отделни автори проследяват измененията и в по-дълги срокове от 1–2 седмици<sup>6, 20</sup>.

След индуцирането на колита животните се наблюдават по отношение на клиничната картина, характера и съдържанието (слуз, кръв) на изпражненията, следи се телесното тегло. След евтаназия на животните макроскопската оценка на настъпилите увреждания се прави чрез ранкиране на промените по определена скала<sup>10</sup>. Определя се и индекс на болестна активност като отношение на теглото на колона спрямо телесното тегло, отразяващо степента на тъканиния оток и тежестта на възпалението. Друг макроскопски показател – от-

ношението на тежлото на възпаления и уплътнен ректум към дължината му, също дава представа за тежестта на болестния процес.

Хистопатологичното изследване се прави най-често при хематоксилин-еозиново оцветяване. Наблюдават се деструкции на криптите, ерозии на мукозата, оток на субмукозата, клетъчна инфилтрация от лимфоцити и полиморфонуклеарни клетки, некроза, конгестия на капилярите, кръвоизливи<sup>6</sup>.

От маркерите на възпаление в чревната тъкан повишената МПО активност е често използван инфламаторен показател<sup>5, 17</sup>. Характерно за този модел е и активирането на метаболизма на арахидоновата киселина – увеличени са продуктите и активността на COX-2 и липооксигеназата<sup>1, 20</sup>. Цитокинният профил на модела с ОК е целенасочено проучван с имунохистохимични методи. Установено е повишено ниво на IL-1 като белег на възпаление и на IL-6 и INF- $\gamma$  като израз на некроза. Нивата на TNF- $\alpha$  обаче не са променени. Негативната находка за TNF- $\alpha$  не се потвърждава от други проучвания, които демонстрират повишение на този проинфламаторен цитокин<sup>1, 20</sup>. Съвременни литературни обзори определят TNF- $\alpha$ , освободен от активираните макрофази и имунни клетки, като ключов цитокин в патогенезата на възпалителните чревни заболявания<sup>16</sup>. Други автори обаче разграничават болестта на Крон и улцерозния колит на базата на техния имунологичен тип, като болестта на Крон се свързва главно с Th1-секретирани цитокини TNF- $\alpha$  и INF- $\gamma$ , а улцерозният колит – с тези, секретирани от Th2-клетките. В клинични проучвания се установяват повишени нива на TNF- $\alpha$  в мукоза на болни от улцерозен колит<sup>18</sup>. Не на последно място сред маркерите за възпаление при модела с ОК са нуклеарни фактори. NF- $\kappa$ B се включва като фактор, хронифициращ възпалителната реакция чрез активиране на проинфламаторни каскадни процеси. От друга страна, PPAR- $\gamma$ , член на суперфамилията на нуклеарни хормонални рецептори, инхибира активирането на NF- $\kappa$ B чрез няколко механизма и потиска транскрипцията на проинфламаторни цитокини. Повишена експресия на NF- $\kappa$ B и силно редуцирана експресия на PPAR- $\gamma$  е наблюдавана при модел на колит, индуциран с ОК при мишки<sup>20</sup>.

Измежду факторите, на които се приписва много важна роля в патогенезата на възпалителните чревни заболявания, са реактивните кислородни форми (РКФ), получени в резултат на масивната левкоцитна инфилтрация. При модела на колит с ОК, в условията на изразена вазодилатация и струпване на левкоцити се наблюдава увеличена продукция на РКФ и прояви на изразен оксидативен стрес. Много проучвания, използващи този модел, показват повишени стойности на малонов диалдехид – най-често използвания маркер на липидна пероксидация<sup>1, 6, 20</sup>. Повишени са нивата и на азотен оксиг<sup>1, 6</sup>. В резултат на увеличената активност на iNOS. Увеличената податливост към увреждащото действие на РКФ се

дължи и на понижена антиоксидантна защита, проявена в намалени нива на редуцирания глутатион и на ензимите супероксиддисмутаза и каталаза<sup>1, 5</sup>. Счита се, че за експерименталния модел на колит при гризачи, индуциран с ОК, е особено характерен патогенетичният механизъм на дисбаланс между оксидативните и антиоксидативните системи в организма<sup>13</sup>.

Изброените особености на модела на улцерозен колит, предизвикан от ОК, го правят особено подходящ за тестване на лекарства, действащи чрез потискане на инфламаторната и/или оксидативната патогенеза на заболяването.

## Литература

1. Al-Rejaie S. S., H. M. Abuhashish, M. M. Al-Enazi, et al. Protective effect of naringenin on acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol*. 2013;19(34):5633-5644.
2. Daddaoua A, V. Puerta, A. Zarzuelo, et al. Bovine glycomacropeptide is anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J Nutr*. 2005;135(5):1164-1170.
3. Diop L., F. Raymond, H. Fargeau, et al. Pregabalin (CF-1008) inhibits the trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colonic allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:1013-1022.
4. Gaudio E., G. Taddei, A. Vetuschi, et al. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1458-1475.
5. Kandhare A. D., K. S. Raygude, P. Ghosh, et al. Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. leaves in experimental colitis in rats. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012;2(5):337-344.
6. Kawada M, A. Arihiro, et al. Mizoguchi. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007;13(42):5581-5593.
7. Kitajima S., S. Takuma, et M. Morimoto. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights. *Exp Anim*. 2000;49(1):9-15.
8. MacPherson B. R. et C. J. Pfeiffer. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*. 1978;17(2):135-150.
9. Melgar S., L. Karlsson, E. Rehnstrom, et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Intern Immunopharmacol*. 2008;8(6):836-844.
10. Morris G. P., P. L. Beck, M. S. Herridge, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989;96:795-803.
11. Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 1985;82(5):1327-1336.
12. Qin H-Y., H-T. Xiao, J-C. Wu, et al. Key factors in developing the trinitrobenzene sulfonic acid-induced post-inflammatory irritable bowel syndrome model in rats. *World J Gastroenterol*. 2012;18(20):2481-2492.
13. Randhawa P. K., K. Singh, N. Singh, et al. A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18:279-288.
14. Stucchi A. F., S. Shofer, S. Leeman, et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(6):1298-1306.
15. Trivedi, P. P. et G. B. Jena. Dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis leads to increased hematopoiesis and induces both local as well as systemic genotoxicity in mice. *Mutat Res*. 2012;744:172-183.
16. Tsianos E. V. et K. Katsanos. Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean? *World J Gastroenterol*. 2009;15(5):521-525.

**Пълната библиографска справка е на разположение в издателството и може да бъде представена при поискване.**