Источник:
Hindawi
Mediators of Inflammation
Volume 2017, Article ID 6567432, 10 pages
https://doi.org/10.1155/2017/6567432

Научная статья

Фруктовый сок *Morinda citrifolia* (нони) уменьшает экспрессию воспалительных цитокинов и способствует поддержанию целостности слизистой оболочки кишечника при экспериментальном DSS-колите

Беатрис Кутинью де Соуза,[1] Джулиана РейсМачадо,[2] Маркос Виниций да Силва,[1] Тьяго Альварес да Коста,[1] Хавьер Эмилио Лазо-Чика,[1] Татьяне До Прадо Дегаспери, [1] Вирмондес Родригес Джуниор,[1] Хелиосвилтон Салес деКампос,[1] Элизабет Убер Бучек,3 и Карло Хосе Фрейре Оливейра[1]

[1]*Институт естественных и биологических наук, Федеральный университет Триангуло Минейро, 38025-180 Uberaba, MG, Бразилия*
[2]*Институт тропической патологии и общественного здравоохранения, Федеральный университет Гояс, 74605-050 Гояния, штат Джорджия, Бразилия*
[3]*Департамент фармацевтических наук, Университет Убераба, 38050-501 Uberaba, MG, Бразилия*

Переписка должна быть адресована Карло Хосе Фрейре Оливейре; carlo@icbn.uftm.edu.br

Получено 11 октября 2016 г.;

Пересмотрено 9 декабря 2016 года;

Принято 25 декабря 2016 г ;

Опубликовано 17 января 2017 г.

Академический редактор: Судханшу Шехар

Copyright © 2017 Беатрис Кутинью де Соуза и соавт.

Это статья открытого доступа, распространяемая в рамках Creative Commons

Лицензия на атрибуцию, которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что оригинальное произведение правильно цитируется.

***Morinda citrifolia* L., (нони),** как было показано, лечит различные расстройства. Тем не менее, данные о его роли в лечении воспалительных заболеваний кишечника все еще требуют уточнения. В текущем исследовании мы исследовали эффекты фруктового сока нони (NFJ) в лечении мышей C57BL/6, которые непрерывно подвергались воздействию декстрансульфата натрия (DSS) в течение 9 дней подряд. Потребление сока нони не оказывало влияния на уменьшение клинических признаков заболевания или потерю веса. Тем не менее, когда было применено разбавление 1: 10, кишечная структура мышей сохранялась, что сопровождалось уменьшением воспалительного инфильтрата. Независимо от концентрации сока нони, наблюдалось снижение активности миелопероксидазы и ключевых воспалительных цитокинов, в том числе - TNF-α и IFN-γ в кишечнике. Более того, когда сок нони был разбавлен в пропорции 1: 10 и 1: 100, было обнаружено уменьшение продукции азотоводородной окиси и IL-17 в гомогенатах кишки. В целом, лечение соком нони было эффективно по разным параметрам, характеризующим прогрессирование заболевания и ухудшение его течения.
Эти результаты могут указывать, что фрукт нони является важным источником противовоспалительных молекул с большим потенциалом ингибирования прогрессирования воспалительных заболеваний таких, как хронический колит.

1. Введение

Потенциальная противовоспалительная активность нескольких природных соединений в подавлении ключевых игроков развития воспаления были исследованы в разных сценариях, включая модуляцию цитокинов, транскрипцию факторов, ферментов и производство белка и небелковых медиаторов воспаления. Их действие включает: модуляцию цитокинов (например, IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-17 и IL-12), факторов транскрипции, ферментов (например, миелопероксидазы-МПО и циклооксигеназы ЦОГ-1 и ЦОГ-2), а также производство оксида азота (NO) [1–3].

Из-за их важной роли в борьбе с воспалением, нацеливание терапии на такие молекулы было предложено в качестве возможных целей воздействия для профилактики и/или лечения воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит [4], **дерматит** [5] **и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК)** [6].

ВЗК — это хронические воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта, которые клинически проявляются как одно из двух заболеваний, - болезнь Крона (CD) или язвенный колит (ЯК) [7, 8]. Эти патологии имеют особое значение, поскольку они затрагивают миллионы людей во всем мире, и современные методы лечения все еще не полностью эффективны в контроле прогрессирования этих заболеваний или предотвращение появления побочных эффектов [6].

***Morinda citrifolia* L. (Нони)** принадлежит к семейству Мареновых, и это источник природных молекул, которые используются в качестве лекарственного растения полинезийцами на протяжении более чем 2000 лет [9]. Пока что речь идёт о нескольких биологически активных соединениях, включая жирные кислоты, флавоноиды, полисахариды и стеролы [10–13].

Противовоспалительный потенциал соединений сока нони был продемонстрирован в экспериментальной модели инфекции Helicobacter *pylori,* в которой были использованы этанольные и этилацетатные экстракты нони. Эти экстракты были способны уменьшить как нейтрофильный хемотаксис, так и производство индуцируемого оксида азота (iNOS) и COX-2 [14]. Соответственно, мышам C57BL / 6 перорально давали сок нони в дозе 500 мг на 1 кг веса в день в течение 60 дней, что показало в итоге снижение воспалительной инфильтрации и экспрессии цитокинов для IL-12, TNF-α, TGF-β, and IL-10 в подушечке стопы, зараженной ***Leishmania amazonensis* [15].** Важно отметить, что такие цитокины, как IL-12, IL-6, TNF-α, IFN-γ, IL-17, and IL-23, связаны с развитием и ухудшением **ВЗК**, поэтому были исследованы разные подходы к тому, чтобы лечить это воспалительное заболевание [7]. Кроме того, показателем противовоспалительного потенциала экстракта листьев ***Morinda citrifolia*** стало снижение уровней TNF-α, IL-1β и NO в макрофагах после стимуляции липополисахаридом (LPS) [16]. Хотя роль соединений нони в контроле воспалительных игроков имеет особое значение, их эффекты в развитии кишечного воспаления до сих пор плохо изучены. Таким образом, это исследование показало влияние сока плодов нони на взаимодействие цитокинов и кишечную архитектуру в модели колита, вызванного у мышей декстрансульфатом натрия, как основного механизма его иммуномодулирующей активности.

2. Материалы и методы

2.1. Сбор и ботаническая идентификация растения.

Плоды, использованные в этом исследовании, были получены из монокультуры 150 растений нони *Фазенды Боа Vontade*, ферме в муниципалитете Арагуари, Триангуло Минейро/MG, в Бразилии, в местности с координатами 18°4347,23S, 48°649.50O (данные из Google Земля, 2013). Все образцы были подготовлены в соответствии с традиционными методами гербаризации [17] и депонированы в гербарии Федерального университета Уберляндии (HUFU Herbarium) под регистрационным номером HUFU-67210, как ***Morinda citrifolia* L.** (Мареновые).

2.2. Процесс экстракции сока.

Сок **Morinda citrifolia**, (Нони), был подготовлен в лаборатории фармакогнозии университета Убераба, в Убераба, Минас-Жерайс, Бразилия. Плоды **M. Citrifolia** были вручную и случайно собраны со 150 растений, промыты в озонированной воде и хранились при комнатной температуре 3–5 дней. Затем фрукты были очищены механически с использованием средства для удаления мякоти с фруктов и, после удаления семян, полученная мякоть центрифугировалась при 4000 об/мин в охлаждённом состоянии до получения прозрачных супернатантов, и тогда это считалось 100% (v/v) соком и хранилось при (-70° C) до дальнейшего использования.

2.3. Исследования на животных.

Самцы C57BL/6 мышей в возрасте 6–8 недель и весом 20–25 г были помещены в особые условия: без патогенов и с возможностью соблюдения стандартных условий окружающей среды при постоянной температуре (25° C) в течение 12-часового цикла свет/темнота, с доступом к пище и воде в помещении для содержания животных по потребности, в Федеральном университете Триангуло Минейро (UFTM), в Бразилии. Все исследования на животных проводились в соответствии с протоколом комитета по уходу и использованию животных (Протокол UFTM под протокол 275).

Эксперименты проводились с 8 мышами из группы, с распределением воздействия следующим образом:

- ф*изиологический раствор*, здоровые контрольные мыши, обработанные физиологическим раствором; мыши, которые подвергались воздействию 2,5 % раствора декстрансульфата натрия (DSS 2,5%);
- мыши, подвергнутые воздействию DSS 2,5% + чистого *нони*, и
- мыши, подвергшиеся воздействию DSS, обработанные чисто фруктовым соком Noni;
- мыши, обработанные DSS 2.5% + соком нони в разведении *1:* 10 и мыши, которых подвергли действию DSS и обработанные разбавленным в соотношении сока нони с водой 1:10; и DSS 2.5% + нони в разведении *1* : 100,
- а также ещё и мыши, подвергнутые действию DSS и обработанные разбавленным в соотношении 1: 100 фруктовым соком нони.

Объём сока нони 100 мл на мышь вводили перорально в течение 9 дней подряд.

2.4. DSS-индуцированный колит и клиническая оценка.

Колит вызывался добавлением в питьевую воду мышам 2,5% DSS (MP Biomedicals, Illkirch, France, Молекулярный вес: 36 000–50 000 кДа) в течение 9 дней подряд, на фоне чего брались образцы. В дополнение к записи ежедневного рациона еды и объёма употребляемой воды, проводились ежедневные изменения массы тела и оценка клинических признаков заболевания для оценки в баллах клинической картины заболевания у каждой мыши. Каждый признак заболевания соответствовал одному баллу, а сумма баллов для каждой мыши определяла клинический балл. Баллы клинической оценки определялись, как описано ранее в настоящем документе [18].

2.5. Эвтаназия и сбор образцов.

Мыши были умерщвлены на 9 день и для дальнейшего исследования была удалена толстая кишка. Образцы толстой кишки разделены на более мелкие срезы, которые были погружены в PBS/10% формальдегид для получения парафиновых блоков или были немедленно заморожены в жидком азоте для количественного определения миелопероксидазы (МПО) или количественного определения активности оксида азота (NO). Кроме того, одна из секций кишечника от каждой мыши собиралась в раствор, содержащий ингибиторы протеазы (Complete^{R}, Roche Pharmaceuticals, Мангейм, Германия) для количественного определения цитокинов иммуноферментным анализом (ИФА).

2.6. Миелопероксидаза (MPO) и оксид азота (NO).

Кратко процесс можно представить так: для анализа MPO срезы гомогенизировали, и эритроциты лизировали. А полученный после центрифугирования лизат ресуспендировали с последующими тремя циклами замораживания и оттаивания. После центрифугирования, супернатант помещали в 96-луночные планшеты и проводили реакцию с субстратом тетраметилбензидина (TMB) (BD OptEIA™, Сан-Диего, Калифорния) при 37°C. Реакцию останавливали при показаниях на спектрофотометре в 450 нм. Активность МПО определяли как было описано ранее [19]. Результаты были нормализованы к сухому весу каждой кишечной секции (среза) и выражены в формате оптической плотности на грамм ткани (нм/г ткани).

Для измерения NO, накопленного гомогенате кишечника, в гомогенатах измеряли показатель продукции NO с использованием реакции Грисса [20]. Затем 100 мл гомогената ткани смешивали с 100 мл реактива Грисса, который состоит из равных объемов 1% (вес / объем) сульфаниламида в 5% (об./об.) фосфорной кислоте и 0,1% (об./ об.) нафтилэтилендиамина-HCl и инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Поглощение измеряли при 540 нм в 96-луночном устройстве для считывания (Perkin Elmer Cetus, Калифорния, США).

Объём нитрита в образцах рассчитывали с помощью линейного регрессионного анализа абсорбции серий растворений нитрита натрия по стандартной кривой. Результаты были нормализованы к сухому весу каждого кишечного сечения и выражались в пикограммах на миллиметр на грамм на грамм ткани (пг/мл/г).

2.7. Количественное определение цитокинов методом ИФА.

Цитокины IL-10, IL-17, IFN-γ, TNF-α, IL-12, IL-4 и IL-23 определялись количественно в гомогенате ткани методом ИФА по данным инструкции производителя (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния, США). Результаты были нормализованы к сухому весу каждого отдела кишечника и выражались в нанограммах на миллилитр на грамм ткани (нг/мл/г ткани).

2.8. Гистология и гистопатологический анализ.

Для оценки степени микроскопических повреждений, кишечные срезы были продольно разрезаны, промыты в PBS, зафиксированы в 10% буфере - формалине - в течение 24 ч, а затем обработанные срезы заливались парафином, с последующим секционированием микротомом. Разделы ткани (5мм) были получены и окрашены гематоксилином и эозином (H&E). Для гистопатологического анализа брали слизистую оболочку, подслизистую оболочку, мышечные слои и серозу. Эти срезы кишечника также оценивали на наличие отека, воспалительного инфильтрата и аномалий эпителия. Изображения были получены с помощью цифровой видеокамеры (*Evolution MP 5.0 color Media Cybernetics, Silver Spring, MD, США*), с 10-кратным увеличением, соединённой со световым микроскопом (*Nikon Eclipse 50i, Melville, NY, США*). Морфометрия была выполнена с спользованием средств Image-Pro Insight (Media Cybernetics). Количественная оценка воспалительных инфильтратов проводилась в процентном соотношении к общему объёму визуализированной на снимках ткани. Гистопатологический анализ проводил заслеплённый в отношении проводимого животным лечения патолог.

2.9. Анализ данных и статистика.

Нормальное распределение и однородные дисперсии были характерны для всех переменных. Когда распределение считалось нормальным и дисперсия была однородной, были использованы параметрические статистические методы: непарный t - тест Стьюдента или односторонний ANOVA с последующим post hoc-тестом Тьюки. В случаях негауссовского распределения данных использовались следующие непараметрические критерии: критерий Манна–Уитни или критерий Крускала-Уоллиса, сопровождаемый post hoc-тестом Данна. Результаты были выражены как среднее ± SD (стандартное отклонение, СД). Различия считались значимыми при разнице их <0,05 (5%). Наблюдаемые различия считались значимыми при p <0,05 (5%). Статистический анализ проводился с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (La Jolla, CA, USA).

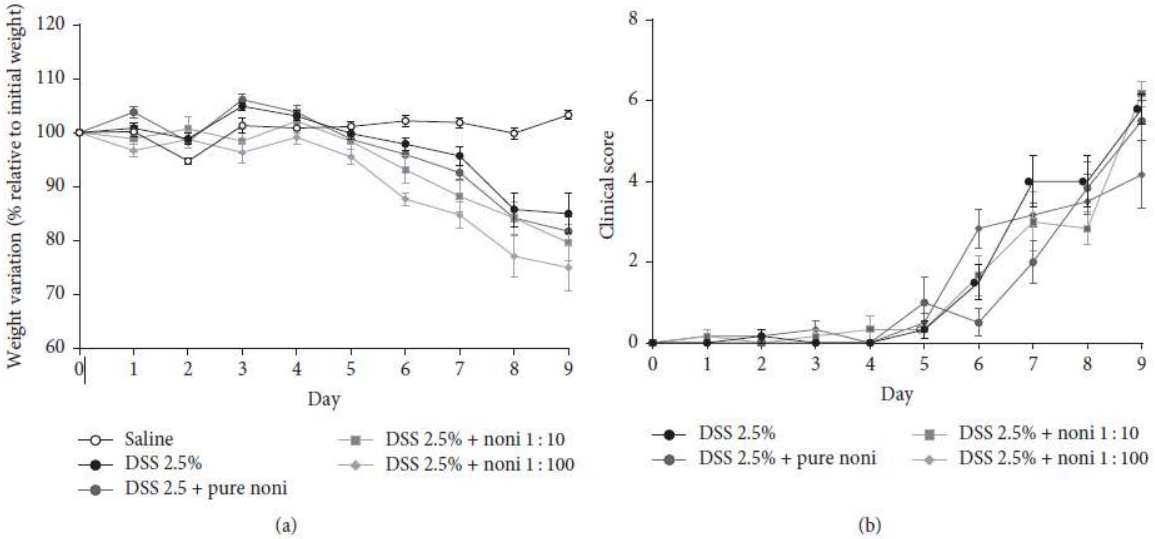

Рисунок 1: Лечение фруктовым соком нони и исход болезни.

Мышей C57BL/6 подвергали воздействию декстрансульфата натрия (DSS) 2,5% и им ежедневно давали сок нони. На 9-й день мышей умерщвляли для получения срезов кишечника: (а) процент изменения веса, (б) шкала клинических проявлений заболевания.

Физ. раствор, здоровые контрольные мыши, получавшие физиологический раствор;

DSS 2,5%, мыши подвергались воздействию DSS;

DSS 2,5% + *чистый нони*, мыши, подвергшиеся воздействию DSS и обработанные чистым фруктовым соком нони;

DSS 2,5% + *Noni* 1: 10 мыши, подвергшиеся воздействию DSS и обработанные разведением фруктового сока 1: 10;

DSS мыши, которых подвергли действию DSS и обработанные разбавленным соком нони в соотношении сока нони с водой 1:10.

3. Результаты

3.1. Лечение фруктовым соком нони и исход болезни.

Во-первых, чтобы оценить, смог ли фруктовый сок нони предотвратить потерю веса и исход колита, вызванного DSS, мышей подвергали воздействию DSS в течение 9 дней, а затем лечили фруктовым соком, как описано выше.

Материалы и методы. В группе мышей, которым давали фруктовый сок нони, не снижался вес, по сравнению с контрольной группой (DSS 2,5%. Диаграмма 1а).

Кроме того, независимо от использованной концентрации сока, не обнаружено влияния сока на проявление клинических признаков заболевания у мышей, получавших фруктовый сок нони, по сравнению с мышами не получавшими сок (Диаграмма. 1 (б)).

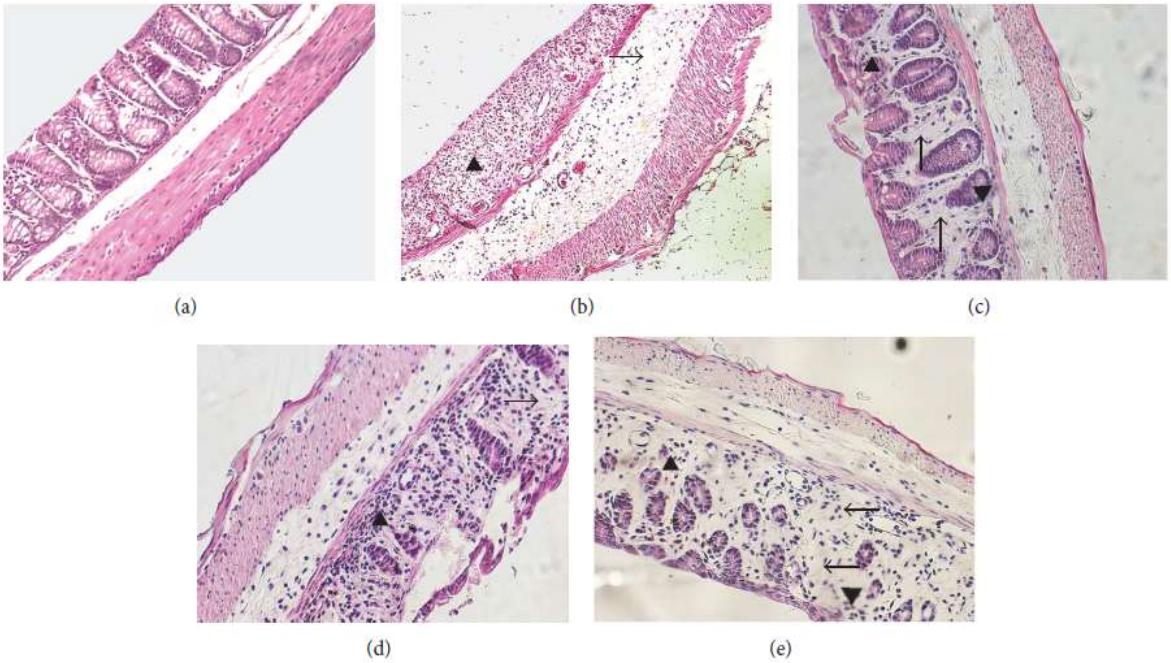

Рисунок 2: Потребление фруктового сока нони сохраняет кишечную структуру в зависимости от дозы. Мыши C57BL/6 подвергались воздействию декстрана сульфата натрия (DSS) 2,5% и ежедневно получали фруктовый сок нони. Образец толстой кишки брали на 9-й день для гистопатологического анализа.
(a) Здоровые мыши без колита;
(b) мыши, подвергшиеся воздействию DSS: собственная пластинка с умеренным отеком и инфильтрацией мононуклеарных клеток (указано стрелкой), подслизистая оболочка с умеренным мононуклеарным инфильтратом и сильным отеком (указано стрелкой);
(c) мыши, подвергшиеся воздействию DSS и пролеченные чистым фруктовым соком нони: собственная пластинка с умеренным отеком (указано стрелкой) и мононуклеарным инфильтратом (указано стрелкой);
(d) мыши, подвергшиеся воздействию DSS и пролеченные соком плода нони в разведении 1: 10: крипты с сохраненными неровностями (звездочка); собственная пластинка с умеренным отеком (указано стрелкой) и мононуклеарным инфильтратом (указано стрелкой);
(e) мыши, подвергшиеся воздействию DSS и получавшие фруктовый сок нони, разведенный 1: 100: обычные и атрофические крипты (звездочка); собственная пластинка
с умеренным отеком (стрелка) и мононуклеарным инфильтратом (стрелка).

TABLE 1: Histopathological scores of mice exposed to DSS in different conditions.

	DSS 2.5%	DSS 2.5% + pure noni	DSS 2.5% + noni 1 : 10	DSS 2.5% + noni 1 : 100
Lamina propria edema	Moderate	Moderate	Mild	Moderate
Submucosal edema	Severe	Moderate	Moderate	Moderate
Mucosal mononuclear infiltrate	Moderate	Mild	Mild	Moderate
Submucosal mononuclear infiltrate	Moderate	Mild	Mild	Mild
Intestinal crypts	Absent	Continuous	Irregular	Irregular

3.2. Потребление фруктового сока нони подавляет воспаление и сохраняет структуру кишечника в зависимости от дозы.

Поскольку никаких макроскопических эффектов после лечения соком нони не наблюдалось, мы определяли, оказывает ли лечение фруктовым соком нони какое-либо влияние на структуру кишечника на микроскопическом уровне. И было выяснено, что в группе, получавшей фруктовый сок нони, отмечалась сохранность структуры кишечника, причём величина эффекта зависела от дозы. Здоровые мыши (Рисунок 2 (a)) сохранная эпителиальная поверхность, прямолинейное расположение крипт, составленные из обычного количества кубических клеток. В собственной пластинке, наблюдается обычный мононуклеарных инфильтрат. Подслизистый, мышечный и серозномышечный слои имеют нормальную архитектуру. У мышей, подвергшихся воздействию DSS, были эрозии на поверхности кишечного эпителия и отсутствие крипт (табл.1). В собственной

пластинке отмечался умеренный отек и инфильтрация мононуклеарными клетками (рис. 2 (б), стрелка), в подслизистой оболочке отмечалась умеренная инфильтрация мононуклеарами и выраженный отёк (рис. 2 (б), стрелка), и мышечный слой был незначительно утолщен, пропорционально активности колита.

У мышей, подвергшихся воздействию DSS и получавших лечение чистым соком нони, неровности крипт были лёгкими и встречались редко (Таблица 1), и собственная пластинка была умеренно отёчной (рис. 2 (в), стрелка) и отмечался мононуклеарный инфильтрат (рис. 2 (с), указано стрелкой); однако, в подслизистом слое инфильтрация была совсем незначительной и выраженность отека - умеренной, а утолщение мышечного слоя - незначительным.

С другой стороны, у мышей, получавших лечение соком фрукта нони в разведении 1:10, крипты сохранили свои неровности (Рисунок 2 (d), звездочка), в собственной пластинке отмечался как умеренный отек (рис. 2 (г), стрелка), так и мононуклеарный инфильтрат (Рисунок 2 (d), указано стрелкой), и подслизистая оболочка имела только лёгкий мононуклеарный инфильтрат и умеренный отек (таблица 1). У мышей, получавших лечение фруктовым соком нони, разведенным 1:100, крипты были нерегулярными и атрофичными (рис. 2 (е), звездочка), собственная пластинка имела умеренный отек и мононуклеарный инфильтрат, и в подслизистом слое отмечался лёгкий мононуклеарный инфильтрат и умеренный отек (Таблица 1).

Если обобщить представленные выше данные, то можно заключить следующее: архитектура кишечных крипт была сохранена у мышей, получавших сок нони, и отмечалась большая степень сохранности у тех мышей, которые получили сок нони в разведении 1: 10 или 1: 100 по сравнению с мышами, получавшими чистый сок нони или обработанными только DSS. Продукция NO была снижена у мышей, получавших лечение фруктовым соком нони в разведении 1:10 и 1:100 по сравнению с теми, которые получили чистый нони или DSS (рис. 3 (а)). Более того, независимо от используемой концентрации, мыши, получавшие сок нони, имели пониженную активность МПО (рис. 3 (б)) в сравнении с мышами, подвергшимися воздействию DSS. Хотя и не отмечалось зависимости между потерей веса и исходом болезни в зависимости от потребления мышами сока фруктов нони, но сохранение кишечной архитектуры и снижение активности ферментов, ответственных за воспаление, были связаны с потреблением фруктового сока и зависели от его дозы.

3.3. Потребление фруктового сока нони уменьшает количество основных воспалительных цитокинов в кишечнике в зависимости от дозы.

Наконец, мы стремились оценить, является ли улучшение в кишечной архитектуре связанным с модуляцией ключевых цитокинов, связанных с ухудшением заболевания / или цитопротекцией. Мыши, обработанные фруктовым соком нони, независимо от используемой концентрации, показали снижение выработки провоспалительных цитокинов TNF-α and IFN-γ (фигуры 4 (а) и 4 (с), соответственно). Сокращение IL-17, другого ключевого цитокина, связанного с ухудшением заболевания, наблюдался только у мышей, получавших лечение соком нони в разведении 1:10 и 1:100 (рис. 4 (е)).

Тем не менее, не было никаких различий в производстве IL-12 (Фиг.4 (b)), IL-4 (Фиг.4 (d)), IL-23 (Фиг.4 (f)) и IL-10 (фиг.4 (g)). Все эти вместе взятые результаты предполагают, что улучшение кишечной архитектуры также может быть связано с местным уменьшением ключевых воспалительных цитокинов.

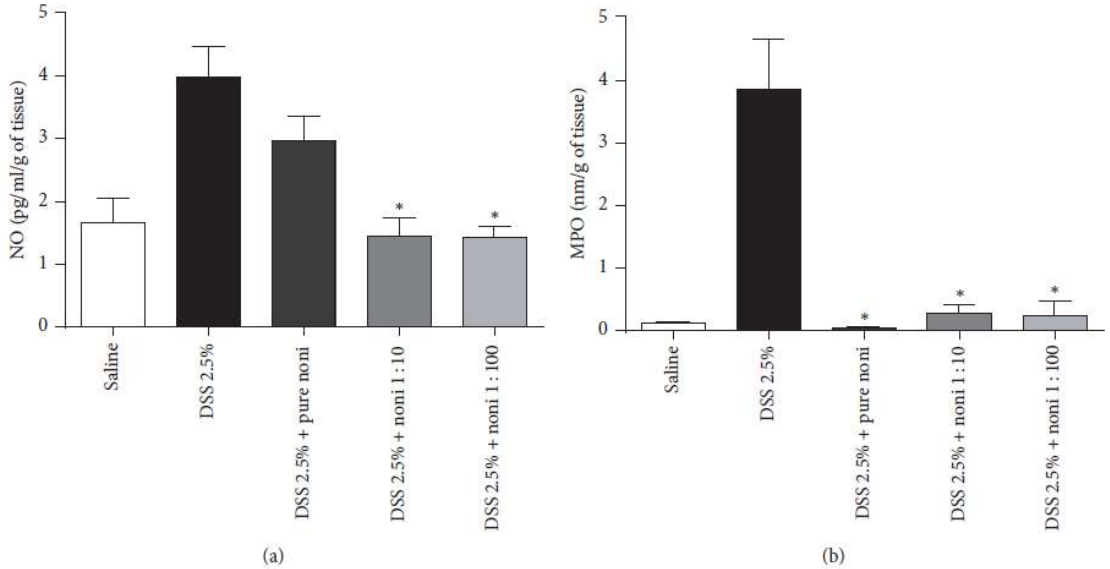

Рисунок 3: Потребление фруктового сока нони подавляет воспаление, уменьшая активность оксида азота и миелопероксидазы. Мыши C57BL/6 были подвергнуты воздействию 2,5% сульфата натрия (DSS) и ежедневно получали терапию фруктовым соком нони. На 9 день мышей умерщвляли, чтобы получить кишечные срезы. Количественная оценка кишечной продукции оксида (а) и активности миелопероксидазы (МПО) в кишечнике, была выражена в итоге в пикограммах на миллилитр на грамм ткани (пг / мл / г) и как оптическая плотность на грамм ткани (нм / г ткани) соответственно. Данные представлены в виде среднего ± SEM ∗ <0,05.

4. Обсуждение.

Представленные здесь результаты показывают, что сок фруктов нони может уменьшить продукцию ключевых воспалительных цитокинов, участвующих в развитии воспаления в кишечнике.

Кроме того, также было показано, что лечение с использованием фруктового сока улучшает кишечную архитектуру, в основном при использовании разведения 1: 10. Однако, никаких эффектов, по крайней мере, видимых, не было выявлено на проявления клинических признаков заболевания. Полезные свойства лечения с использованием фруктов нони в борьбе с колитом продемонстрированы улучшением в кишечной архитектуре наряду с сокращением воспалительной инфильтрации. Это сопровождалось снижением активности NO (только при употреблении сока нони в разведении 1: 10 и 1: 100) и МПО (в любой концентрации). Оксид азота (NO) - сильный провоспалительный агент, в основном образующийся под действием синтазы окиси азота (iNOS) после стимулирования бактериальными токсинами и про воспалительные цитокины, такими, как IL-1β, TNF-α и IFN-γ в разных типах клеток, включая макрофаги, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, и гладкомышечныеклетки [21, 22]. Сверхэкспрессия iNOS, особенно на участках слизистой оболочки, таких как желудочно-кишечный тракт, связанна с развитием воспалительных заболеваний, в том числе ВЗК [23]. В этом контексте производство высоких уровней NO клетками воспалительных инфильтратов, такими, как макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты, а также эпителием толстой кишки непосредственно связано с локальным повреждением тканей и ухудшением состояния при ВЗК [24]. Эти наблюдения были подкреплены тем фактом, что сверх экспрессия iNOS, индуцированная воспалительными цитокинами IL-1β, TNF-α и IFN-γ , ИЛ-6, ИЛ-17 и ИЛ-23 была обнаружены в плазме, в мононуклеарных клетках собственной пластинки и в эпителиальных клетках толстой кишки пациентов с ВЗК и мышей с воспалением кишечника [25–28], тем самым подтверждая роль производных iNOS, таких как NO и воспалительные цитокины, в обострении заболевания и его исходах. Поэтому представляется разумным полагать, что терапия,

направленная на модуляцию таких аспектов, может представлять интерес как инструмент для сдерживания воспаления и прогрессирования болезни. В этом контексте монотропин, выделенный из корней *Morinda officinalis*, представителя семейства Мареновые, как и *M. citrifolia*, снижает образование NO in vitro в мышиных макрофагах после стимуляции ЛПС в зависимости от дозы [29]. Положительная корреляция между NO и степенью тяжести **ВЗК** была показана в клинических исследованиях, продемонстрировавших возникновение высоких уровней нитрита / нитрата в плазме, моче и собственной пластинке слизистой у пациентов с ВЗК [27, 30, 31].

Шин и соавт. также продемонстрировал активность монотропеина, когда мышей подвергали воздействию 4% DSS в течение 9 дней подряд. В этом случае лечение позволило снизить активность провоспалительных агентов ЦОГ-2 и МПО [29]. Исследование активности МПО — это определение критического маркёра инфильтрации нейтрофилов в слизистой оболочке кишечника [32]. В исследованиях с использованием разных протоколов с индуцированным колитом, продемонстрирована положительная корреляция между активностью МПО и тяжестью проявлений заболевания [33–36]. Хотя экспрессия ЦОГ- 2 и iNOS не были определены в нашем исследовании, но его результаты предполагают, что разные члены семейства Rubiaceae могут модулировать воспаление аналогичным образом, тем самым подавляя прогресс и тяжесть DSS-индуцированного колита, используя аналогичные механизмы. Способность модулировать ключевые воспалительные компоненты с помощью методов лечения, направленных на контроль активности различных типов клеток, таких, как макрофаги, помимо уменьшения продукции цитокинов и NO, таких, как наблюдаемые в нашем исследовании, когда был использован NFJ, представляет собой многообещающий подход для сдерживания прогрессирования воспаления при ВЗК. Контроль воспаления этими механизмами может объяснить поддержание кишечной архитектуры, которое наблюдалось в нашем исследовании, когда использовались разведения 1:10 и 1:100.

Сложные и гетерогенные механизмы, связанные с развитием кишечного воспаления включают генетику хозяина, экологические триггеры и расстройства как в составе микробиоты, так и иммунный баланс [7]. Тяжесть воспаления кишечника связана с повышенным производством провоспалительных цитокинов (например, TNF-α и IFN-γ, IL-6, IL-17 и IL-23), что делает терапию, направленную на снижение уровня этих цитокинов актуальным. В нашем исследовании лечение фруктовым соком нони, в зависимости от дозы, продемонстрировало снижение производства TNF-α и IFN-γ и IL-17 в кишечнике.

TNF-α является одним из центральных игроков в развитии воспаления кишечника [37], и его количество возрастает в слизистой оболочке кишечника у пациентов с ВЗК [38]. Этот цитокин также играет ключевую роль в выработке NO, и это увеличивает производство металлопротеиназы, которая способствует потере целостности эпителия [39] и ухудшению течения болезни. Эффекты TNF-α опосредованы двумя рецепторами, рецептором TNF-1 (TNFR-1) и рецептором TNF- 2 (TNFR-2). Последний может вырабатываться в любой иммунной или не иммунной клетке, что приводит к активации NF-кB, цитотоксичности и продукции воспалительных цитокинов [40].

В нашем исследовании лечение фруктовым соком нони значительно уменьшило выработку TNF-α в кишечнике независимо от используемого разведения. Это влияние может быть, по крайней мере, частично объяснено ингибированием NF-B аскорбиновой кислотой и флавоноидным гликозидом, которые были выделены из ферментированного фруктового сока нони [41]. Тем не менее, можно говорить о том, что эти молекулы могут снижать уровни TNF-α в кишечнике путем подавления TNFR-1. Действительно, из-за важности этого цитокина в развитии и обострении ВЗК, терапия, направленная на таргетирование TNF-α на способна предотвратить развитие воспаления кишечника. Применение моноклональных антител к IL-6 и TNF-α помогают уменьшить тяжесть проявления заболевания и ослабить воспаление кишечника при DSS-индуцированном колите [42]. Тем не менее, значительное количество пациентов теряют ответ на такое лечение особенно из-за производства антител к таким лекарственным препаратам и ускорению элиминации их из организма [43], и это увеличивает потребность в новых терапевтических подходах, направленных на лучший контроль над прогрессированием ВЗК (IBD) и уменьшение побочных эффектов.

IFN-γ является про-воспалительным цитокином, продуцируемым широким спектром клеток, включая Т-хелперные клетки ($CD4^+$Т-клеток) и цитотоксические Т-клетки ($CD8^+$Т-клетки),

натуральные клетки-киллеры и группу 1 врожденной лимфоидной клетки [44]. У пациентов с ВЗК была показана более высокая частота продукции IFN-γ клетками $CD4^+$T и $CD8^+$T по сравнению с их контрольными аналогами [44]. Уровни IFN и TNF-α повышены в слизистой оболочке пациентов с ВЗК (IBD) и они действуют синергетически, способствуя развитию и поддержание воспаления, которое достигает максимума при нарушении барьера [45]. Было показано, что эти цитокины способны разрушать белки межклеточного соединения при воспалительных процессах, что не наблюдается в не воспалённых областях нездоровых тканей [46]. Некоторые из механизмов, лежащих в основе этих расстройств, включают эпителиальный апоптоз [47] и снижение транскрипции белков, обеспечивающих плотное соединение [48]. Поэтому методы лечения, направленные на уменьшение уровня этих цитокинов, могут быть полезными в контроле воспаления и улучшении исхода заболевания. В этом контексте, краткосрочное лечение глюкокортикоидами у мышей, подвергнутых воздействию DSS в течение шести дней, смогло уменьшить количество ИФН - продуцирующих $CD4^+$ клеток в селезенке и уменьшить экспрессию этого цитокина и IL-1β в кишечнике [стр. 74] Снижение активности IL-1β сопровождалось улучшением клинического исхода и восстановлением иммунного баланса [49]. Кроме того, полезные эффекты, связанные со снижением воспалительных цитокинов, таких как IL-1β и IL-1β, были дополнительно изучены на мышиной модели колита. В этом случае колит был вызван внутрикишечным введением нитробензолсульфоновой кислоты (DNBS) и мышей лечили с помощью непсихотропного каннабиноида, известного как каннабигерол [50].

Даже несмотря на то, что влияние лечения фруктовым соком нони на апоптоз и проницаемость кишечника и не были изучены в этом исследовании, однако, улучшение кишечной архитектуры и уменьшение воспалительных инфильтратов может было бы частично объяснить сокращением IFN-γ.

ИЛ-17-продуцирующие клетки участвуют в патогенезе многочисленных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, и было показано, что они опосредуют патогенез заболевания при ВЗК [51]. Роль клеток Th17 в патогенезе **ВЗК** была в первую очередь приписана мутации в гене *IL-23R*, которая была идентифицирована у пациентов с **ВЗК,** и которая регулирует продукцию Th17-связанных цитокинов [52]. Действительно, увеличение продукции IL-17 клетками собственной пластинки в обоих случаях - при язвенном колите, и при болезни Крона, - уже было показано ранее [53]. Кроме того, было обнаружено, что цитокины, продуцируемые клетками Th17, такие как IL-17 и IL-21, повышают экспрессию TNF-α, IL-1β, IL-6, а также ИЛ-8 и активацию нейтрофилов [54], что, в свою очередь, может способствовать ухудшению ВЗК. В дополнение к классическому представлению о роли Th17 лимфоцитов в патогенезе ВЗК, врожденная группа 3 лимфоидных клеток также вовлечена в выработку IL-17 и патогенез заболевания в экспериментальных моделях и человеческих субъектах [55, 56].

В нашем исследовании сниженные уровни IL-17 были обнаружены в толстой кишке мышей, получавших сок фруктов нони, но только когда использовались разведения 1:10 и 1:100. Хотя мы и не определяли, является ли снижение уровня ИЛ-17 в кишечнике врожденным, или адаптивным проявлением иммунитета, или - и тем, и другим, но мы не можем недооценивать важность терапии, направленной на производство этих цитокинов с целью ингибирования воспаление при колите.

В целом наши данные показали, что лечение фруктовым соком нони играет важную роль в подавлении воспаления при развитии экспериментального колита. Одним из ключевых аспектов использования фруктового сока в качестве лечебного средства является использование его иммуномодулирующего эффекта, который имеет влияние на улучшение структуры кишечника. Тем не менее, должны быть выполнены дальнейшие исследования для определения молекул, лежащих в основе сокращения воспалительных цитокинов в этой модели.

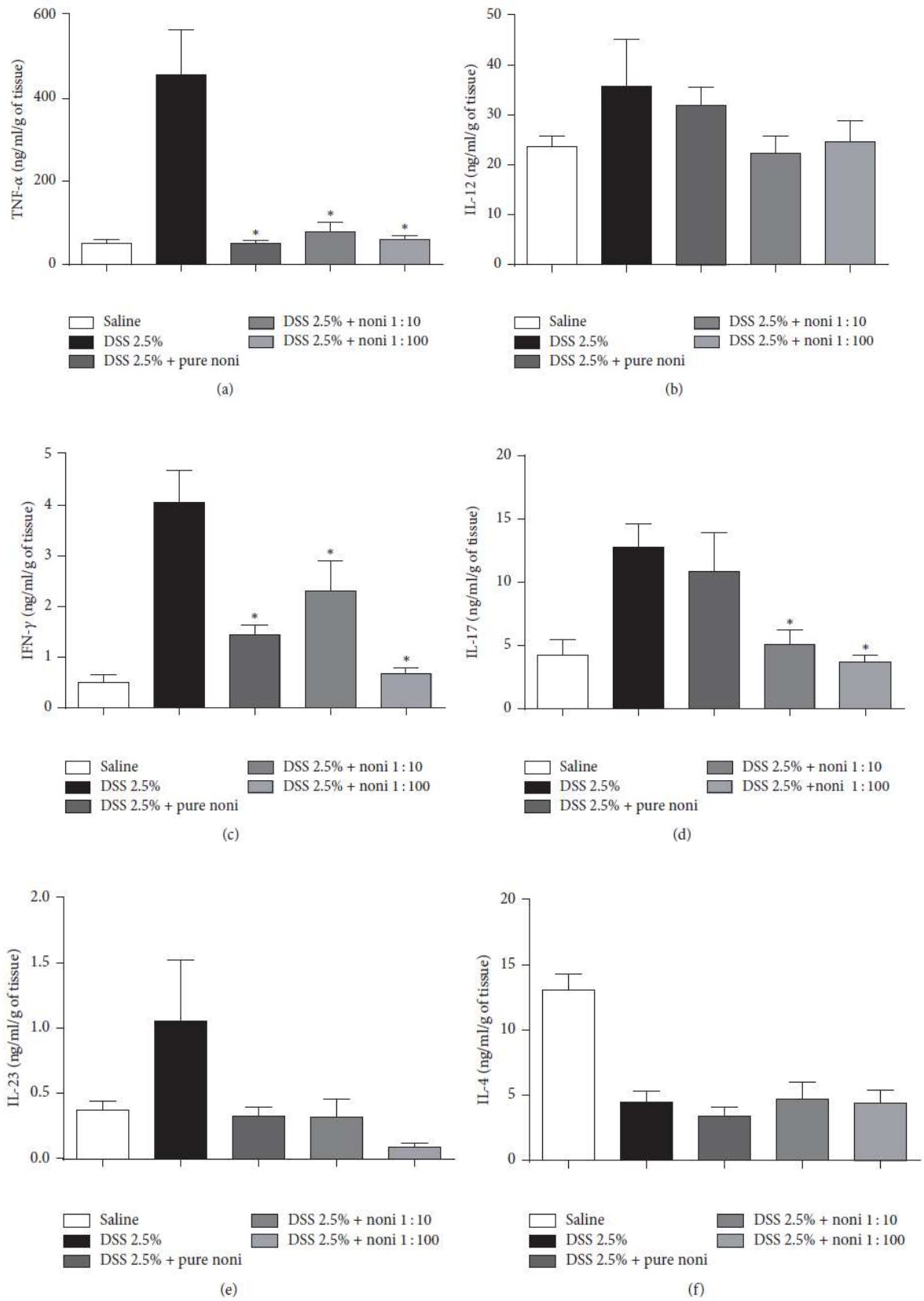

FIGURE 4: Continued.

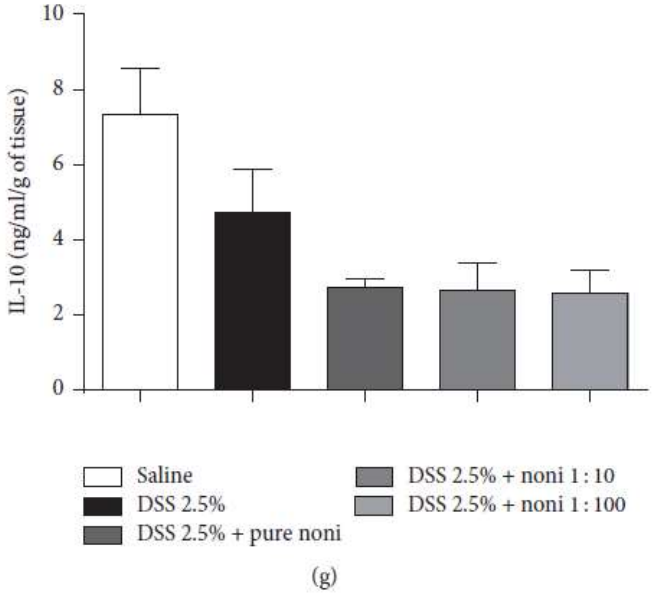

Рисунок 4: Потребление фруктового сока нони снижает уровень ключевых воспалительных цитокинов в кишечнике в зависимости от дозы. C57BL/6 мышей подвергали воздействию декстрана сульфата натрия (DSS) 2.5% и ежедневно лечили фруктовым соком нони. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в гомогенатах кишечника. (a) TNF-.., (b) IL-12, (c) IFN-.., (d) IL-17, (e) IL-23, (f) IL-4, and (g) IL-10. Результаты выражали в виде нанограмм цитокинов на миллилитр на грамм ткани (нг/мл/г ткани), нормализованных по сухой массе ткани. Данные представлены в виде среднего значения ±SEM. * $p < 0.05$.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Это исследование было поддержано Fundacë˜ao deAmparo `a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenacë˜ao de Aperfeicëoamento de Pessoal de Nrıvel Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientrıfico e Tecnolrogico (CNPq, 150075/2016-2).

Литература

[1] R. Grzanna, L. Lindmark, and C. G. Frondoza, “Ginger—an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions,” *Journal of Medicinal Food*, vol. 8, no. 2, pp. 125–132,2005.

[2] T. Ringbom, U. Huss, ˚ A. Stenholm et al., “COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids,” *Journal of Natural Products*, vol. 64, no. 6, pp. 745–749, 2001.

[3] B. B. Aggarwal and S. Shishodia, “Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 71, no. 10, pp. 1397–1421, 2006.

[4] S.W. Tas, C. X.Maracle, E. Balogh, andZ. Szekanecz, “Targeting of proangiogenic signalling pathways in chronic inflammation,” *Nature Reviews Rheumatology*, vol. 12, no. 2, pp. 111–122, 2016.

[5] M. Amagai, “Cracking the code of skin inflammation with CD1a,” *Nature Immunology*, vol. 17, no. 10, pp. 1133–1134, 2016.

[6] H. Sales-Campos, P. J. Basso, V. B. F. Alves et al., “Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,vol. 48, no. 2, pp. 96–107, 2015. Mediators of Inflammation 9

[7] P. J. Basso, M. T. C. Fonseca, G. Bonfra et al., “Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease,” *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 47, no. 9, pp. 727–737, 2014.

[8] G. Rogler, “Update in inflammatory bowel disease pathogenesis,”*Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 20, no. 4, pp. 311–317, 2004.

[9] M.-Y. Wang, B. J. West, C. J. Jensen et al., “Morinda citrifolia (Noni): a literature review and recent advances in Noni research,” *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 23, no. 12, pp. 1127–1141, 2002.

[10] A. Hirazumi and E. Furusawa, “An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity,” *Phytotherapy Research*, vol. 13, no. 5, pp. 380–387, 1999.

[11] M. Wang, H. Kikuzaki, K. Csiszar et al., “Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni),” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 4880–4882, 1999.

[12] K.Kamiya, Y. Tanaka,H.Endang,M. Umar, andT. Satake, “New anthraquinone and iridoid fromthe fruits ofMorinda citrifolia,” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 53, no. 12, pp. 1597–1599, 2005.

[13] A. D. Pawlus, B.-N. Su, W. J. Keller, and A. D. Kinghorn,“An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits ofMorinda citrifolia (Noni),” *Journal of Natural Products*, vol. 68, no. 12, pp. 1720–1722, 2005.

[14] H.-L. Huang, C.-H. Ko, Y.-Y. Yan, and C.-K. Wang, “Antiadhesion and anti-inflammation effects of noni (Morinda citrifolia) fruit extracts onAGS cells duringHelicobacter pylori infection,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 62, no. 11, pp. 2374–2383, 2014.

[15] F. Almeida-Souza, O. Cardoso Fde, B. V. Souza et al., “*Morinda citrifolia* Linn. Reduces parasite load and modulates cytokines and extracellular matrix proteins in C57BL/6 mice infectedwith *Leishmania* (*Leishmania*)*amazonensis*,” *PLoSNeglected Tropical Diseases*, vol. 10, no. 8, Article ID e0004900, 2016.

[16] A. Saraphanchotiwitthaya and P. Sripalakit, “Anti-inflammatory effect of *Morinda citrifolia* leaf extract on macrophage RAW 264.7 cells,” *ScienceAsia*, vol. 41, no. 1, pp. 5–11, 2015.

[17] F. Oliveira and G. Akisue, “Coleta de Plantas Fanerrogamas,” in *Fundamentos de Farmacobot ˆanica*, pp. 9–12, Editora Ed Atheneu, S˜ao Paulo, Brazil, 2000.

[18] H. Sales-Campos, P. R. De Souza,P. J.Basso et al., “Aedes aegypti salivary gland extract ameliorates experimental inflammatory bowel disease,” *International Immunopharmacology*, vol. 26, no.1, pp. 13–22, 2015.

[19] A. F. Bento, D. F. P. Leite, R. F. Claudino, D. B. Hara, P. C. Leal, and J. B. Calixto, “The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 84, no. 4, pp. 1213–1221, 2008.

[20] I. C. Huygen, “Reaction of nitrogen dioxide with Griess type reagents,” *Analytical Chemistry*, vol. 42,no. 3, pp. 407–409, 1970.

[21] I. I. Singer, D.W. Kawka, S. Scott et al., “Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease,” *Gastroenterology*, vol. 111, no. 4, pp. 871–885, 1996.

[22] C. Nathan and Q.-W. Xie, “Nitric oxide synthases: roles, tolls,and controls,” *Cell*, vol. 78, no. 6, pp. 915–918, 1994. [23] R. K. Cross and K. T. Wilson, “Nitric oxide in inflammatory bowel disease,” *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 9, no. 3, pp.179–189, 2003.

[24] I. Soufli, R. Toumi, H. Rafa, and C. Touil-Boukoffa, “Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases,” *World Journal of*

Gastrointestinal Pharmacology andTherapeutics, vol. 7, no. 3,pp.353–360, 2016.

[25] H. Rafa, H. Saoula, M. Belkhelfa et al., “IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: immunomodulatory effect of retinoic acid,” *Journal of Interferon & Cytokine Research*, vol. 33, no. 7, pp. 355–368, 2013.

[26] H. Rafa, M. Amri, H. Saoula et al., “Involvement of interferon- in bowel disease pathogenesis by nitric oxide pathway: a study in algerian patients,” *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 30, no. 9, pp. 691–697, 2010.

[27] H. Kimura, R. Hokari, S. Miura et al., “Increased expression of an inducible isoformof nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis,” *Gut*, vol. 42, no. 2, pp. 180–187, 1998.

[28] F. Obermeier, G. Kojouharoff, W. Hans, J. SchËolmerich, V Gross, andW. Falk, “Interferon- (IFN-)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice,” *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 116, no. 2, pp. 238–245, 1999.

[29] J.-S. Shin, K.-J. Yun, K.-S. Chung et al., "Monotropein isolated from the roots of *Morinda officinalis* ameliorates proinflammatory mediators in RAW264.7 macrophages and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis via NF-B inactivation," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 53, pp. 263–271, 2013.

[30] D. Rachmilewitz, R. Eliakim, Z. Ackerman, and F. Karmeli, "Direct determination of colonic nitric oxide level—a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis," *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 93, no. 3, pp. 409–412, 1998.

[31] N. Avdagic, A. Zaciragic, N. Babic et al., "Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease," *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 13, no. 1, pp. 5–9, 2013.

[32] C. J. Pfeiffer and B. S. Qiu, "Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on TNB-induced colitis in rats," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 47, no. 10, pp. 827–832, 1995.

[33] N. K. Boughton-Smith, J. L. Wallace, and B. J. R. Whitle, "Relationship between arachidonic acidmetabolism, myeloperoxidase activity and leukocyte infiltration in a rat model of inflammatory bowel disease," *Agents and Actions*, vol. 25, no. 1-2, pp. 115–123, 1988.

[34] T. Takagi, Y. Naito, Y. Higashimura et al., "Partially hydrolysed guar gum ameliorates murine intestinal inflammation in association with modulating luminal microbiota and SCFA," *British Journal of Nutrition*, vol. 116, no. 07, pp. 1199–1205, 2016.

[35] M. S. Zarzecki, V. C. Bortolotto, M. R. Poetini et al., "Antiinflammatory and antioxidant effects of p-chloro-phenylselenoesterol on TNBS-induced inflammatory bowel disease in mice," *Journal of Cellular Biochemistry*, 2016.

[36] I. A. Kirpich, W. Feng, Y. Wang et al., "Ethanol and dietary unsaturated fat (corn oil/linoleic acid enriched) cause intestinal inflammation and impaired intestinal barrier defense in mice chronically fed alcohol," *Alcohol*, vol. 47,no. 3, pp. 257–264, 2013.

[37] T. T.MacDonald, P. Hutchings, M.-Y. Choy, S. Murch, and A. Cooke, "Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and

10 Mediators of Inflammation inflamed human intestine," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 81, no. 2, pp. 301–305, 1990.

[38] E. J. Breese, C. A. Michie, S. W. Nicholls et al., "Tumor necrosis factor -producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease," *Gastroenterology*, vol. 106, no. 6, pp. 1455–1466, 1994.

[39] B. Begue, H.Wajant, J.-C. Bambou et al., "Implication of TNF related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions," *Gastroenterology*, vol. 130, no. 7, pp. 1962–1974, 2006.

[40] D. J. MacEwan, "TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences," *Cellular Signalling*, vol. 14, no. 6, pp. 477–492, 2002.

[41] U. J.Youn, E.-J. Park, T. P.Kondratyuk et al., "Anti-inflammatory and quinone reductase inducing compounds from fermented noni (morinda citrifolia) juice exudates," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 6, pp. 1508–1513, 2016.

[42] Y.-T. Xiao,W.-H. Yan, Y. Cao, J.-K. Yan, and W. Cai, "Neutralization of IL-6 and TNF- ameliorates intestinal permeability in DSS-induced colitis," *Cytokine*, vol. 83, pp. 189–192, 2016.

[43] F. Baert, M. Noman, S. Vermeire et al., "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, no. 7, pp. 601–608, 2003.

[44] N. T. Funderburg, S. R. Stubblefield Park, H. C. Sung et al., "Circulating CD4+ and CD8+ T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation," *Immunology*, vol. 140, no. 1, pp. 87–97, 2013.

[45] N. Gassler, C. Rohr, A. Schneider et al., "Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions," *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 281, no. 1, pp. G216–G228, 2001.

[46] M. Bruewer, A. Luegering, T. Kucharzik et al., "Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosisindependent mechanisms," *Journal of Immunology*, vol. 171, no. 11, pp. 6164–6172, 2003.

[47] J.-D. Schulzke, C. Bojarski, S. Zeissig, F. Heller, A. H. Gitter, and M. Fromm, "Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1072, pp. 288–299, 2006.

[48] J. Mankertz, S. Tavalali, H. Schmitz et al., “Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor and interferon ,” *Journal of Cell Science*, vol. 113, part 11, pp. 2085–2090, 2000.

[49] H. Sales-Campos, P. R. de Souza, P. J. Basso et al., “Amelioration of experimental colitis after short-termtherapy with glucocorticoid and its relationship to the induction of different regulatory markers,” *Immunology*, vol. 150, no. 1, pp. 115–126, 2017.

[50] F. Borrelli, I. Fasolino, B. Romano et al., “Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 85, no. 9, pp. 1306–1316, 2013.

[51] D. D. Patel and V. K. Kuchroo, “Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions,” *Immunity*, vol. 43, no. 6, pp. 1040–1051, 2015.

[52] J. Seiderer, I. Elben, J. Diegelmann et al., “Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD):upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn’s disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD,” *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 14, no. 4, pp. 437–445, 2008.

[53] N. Kamada, T. Hisamatsu, H. Honda et al., “TL1A produced by lamina propria macrophages induces Th1 andTh17 immune responses in cooperation with IL-23 in patients with Crohn’s disease,” *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 16, no. 4, pp. 568–575, 2010.

[54] S. I. Siakavellas and G. Bamias, “Role of the IL-23/IL-17 axis in Crohn’s disease,” *DiscoveryMedicine*, vol. 14,no. 77,pp. 253–262, 2012.

[55] S. Buonocore, P. P. Ahern, H. H. Uhlig et al., “Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology,” *Nature*, vol. 464, no. 7293, pp. 1371–1375, 2010.

[56] A. Geremia, C. V. Arancibia-Cŕarcamo, M. P. P. Fleming et al., “IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease,” *Journal of ExperimentalMedicine*, vol. 208, no. 6, pp. 1127–1133, 2011.