

Уральский медицинский журнал. 2022. Т. 21, № 5. С. 41-50.
Ural medical journal. 2022; Vol. 21, No 5. P. 41-50.

Научная статья
УДК 616.348-002-092.4:615.454.2:[577.161.22+541.587.11]
DOI 10.52420/2071-5943-2022-21-5-41-50

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ВИТАМИНА D3 И 5-АМИНОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ

Михаил Владимирович Осиков¹, Маргарита Сергеевна Бойко²,
Вера Алексеевна Ушакова³

¹⁻³ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

¹ Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

¹ prof.osikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

² ri-tochka9@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4046-2424>

³ va-ushakova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2157-3348>

Аннотация

Введение. На данный момент в РФ отсутствуют лекарственные формы с витамином D3, позволяющие эффективно доставлять и локально воздействовать на очаг воспаления и повреждённый участок толстой кишки при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК). Среди таких лекарственных форм наибольший интерес представляют ректальные суппозитории. **Цель исследования** – провести сравнительный анализ эффективности локального применения витамина D3 и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите. **Материалы и методы.** Экспериментальный колит (ЭК) моделировали с помощью раствора оксазолон. Суппозитории с витамином D3 и с 5-АСК применяли per rectum каждые 12 ч. Оценивали клинический статус (DAI), морфометрию, индекс повреждения тканей толстой кишки (TDI), в очаге повреждения экспрессию миелопероксидазы (МРО) и TNF-α. **Результаты.** При ЭК повышается DAI, в очаге повреждения толстой кишки фиксируется язвенный дефект, увеличивается TDI, содержание нейтрофилов (НФ), лимфоцитов (ЛЦ), эозинофилов (ЭФ), гистиоцитов (ГЦ), плазматических клеток (ПЦ), фибробластов (ФБ), экспрессия МРО и TNF-α. Применение витамина D3 уменьшает DAI, язвенный дефект, TDI, экспрессию МРО и TNF-α, количество НФ, ЭФ, ЛЦ и ПЦ, увеличивает количество ГЦ и ФБ. Сравнение применения витамина D3 и 5-АСК выявило сопоставимую эффективность в отношении DAI. Морфометрическая оценка очага повреждения толстой кишки показала, что в условиях применения витамина D3 в отличие от 5-АСК при ЭК меньше инфильтрация, отек, признаки заживления и репарации язвенных дефектов фиксировались раньше; экспрессия МРО увеличивается на шестые сутки, экспрессия TNF-α на четвертые сутки. Индекс TDI на четвертые и шестые сутки ЭК снижался одинаково как в условиях применения витамина D3, так и применения 5-АСК. **Обсуждение.** Снижение выраженности клиники, морфологических признаков повреждения в стенке толстого кишечника при ЭК на фоне применения ректальных суппозиториях с витамином D3 может быть обусловлено плейотропными эффектами витамина D3. **Заключение.** Эффект витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиториях сопоставим с локальным применением 5-АСК при ЭК, снижает выраженность клинических признаков, представительство в стенке толстой кишки клеток, участвующих в деструкции тканей, экспрессии TNF-α и МРО, увеличивает представительство клеток, опосредующих репарацию.

Ключевые слова: экспериментальный колит, ректальные суппозитории, витамин D3, морфология, TNF-α, МРО

Для цитирования: Осиков М.В., Бойко М.С., Ушакова В.А. Сравнительный анализ эффективности локального применения витамина D3 и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите. Уральский медицинский журнал. 2022;21(5):41-50. <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-41-50>.

@ Осиков М.В., Бойко М.С., Ушакова В.А.

@ Osikov M.V., Boyko M.S., Ushakova V.A.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF LOCAL APPLICATION OF VITAMIN D3 AND 5-AMINOSALICYLIC ACID IN EXPERIMENTAL COLITISMikhail V. Osikov¹, Margarita S. Boyko², Vera A. Ushakova³¹⁻³ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia¹ Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia¹ prof.osikov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>² ri-tochka9@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4046-2424>³ va-ushakova@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2157-3348>**Abstract**

Introduction. At the moment in the Russian Federation there are no dosage forms with vitamin D3, allowing effective delivery and local effect on the focus of inflammation and the damaged area of the large intestine in inflammatory bowel disease (IBD). Among such dosage forms rectal suppositories are of the greatest interest. **The aim of the study** was to carry out a comparative analysis of the effectiveness of local administration of vitamin D3 and 5-aminosalicylic acid in experimental colitis. **Materials and methods.** Experimental colitis (EC) was modeled with oxazolone solution. Suppositories with vitamin D3 and with 5-ASA were applied per rectum every 12 h. Clinical status (DAI), morphometry, colon tissue injury index (TDI), myeloperoxidase (MPO) and TNF- α expression in the lesion were assessed. **Results.** In EC, DAI is increases, an ulcerative defect is fixed in the lesion of the colon, TDI, neutrophils (NF), lymphocytes (LC), eosinophils (EF), histiocytes (HC), plasma cells (PC), fibroblasts (FB), MPO and TNF- α expression are increased. Vitamin D3 administration reduces DAI, ulcer defect, TDI, MPO and TNF- α expression, the number of NF, EF, LC and PCs, and increases the number of GCs and FBs. Comparison of vitamin D3 and 5-ASA administration revealed comparable efficacy against DAI. Morphometric evaluation of colorectal lesions showed that under the conditions of vitamin D3 administration, in contrast to 5-ASC, less infiltration, edema, signs of healing and repair of ulcerous defects were fixed earlier in EC; MPO expression increased on the 6th day, TNF- α expression on the 4th day. The TDI index on the 4th and 6th days of EC decreased equally under the conditions of vitamin D3 and 5-ASC application. **Discussion.** The reduction of clinical severity and morphological signs of damage in the large intestine wall at EC against the background of using rectal suppositories with vitamin D3 could be due to pleiotropic effects of vitamin D3. **Conclusion.** The effect of vitamin D3 in original rectal suppositories is comparable with local application of 5-ASC at EC, it reduces severity of clinical signs, representation of cells involved in tissue destruction, TNF- α and MPO expression in the colon wall and increases representation of cells mediating reparation.

Keywords: experimental colitis, rectal suppositories, vitamin D3, morphology, TNF- α , MPO

For citation:

Osikov M.V., Boyko M.S., Ushakova V.A. Comparative analysis of the effectiveness of local application of vitamin D3 and 5-aminosalicylic acid in experimental colitis. Ural medical journal. 2022;21(5):41-50. (In Russ.). <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-41-50>

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – это полиэтиологические заболевания с хроническим воспалительно-деструктивным прогрессирующим поражением желудочно-кишечного тракта факторами иммунной системы в условиях дисрегуляции иммунного ответа. В России заболеваемость ВЗК составляет 4,1 на 100 тыс. населения для язвенного колита (ЯК) и 0,8 на 100 тыс. – для болезни Крона (БК) [1, 2]. В патогенезе ВЗК в деструкции стенки кишки имеют значение как Th2-зависимые реакции с участием IgM, IgG, так и Th1-зависимые реакции с увеличением продукции IL-8, TNF- α и др. цитокинов, активацией хемотаксиса, поглотительной, киллинговой активности нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, продукции активных форм кислорода (АФК) и азота [3]. Указанные изменения на морфологическом уровне приводят к язвообразованию в слизистой оболочке, что клинически проявляется тенезмами, изме-

нением консистенции стула, примесью крови в каловых массах, дефицитом массы тела и др. симптомами, включая кишечные и внекишечные осложнения [4]. Для базисной терапии ВЗК применяются топические и системные ингибиторы воспаления (5-аминосалицилаты, кортикостероиды), иммуносупрессоры (азатиоприн, 6-меркаптопурин и др.), средства биологической терапии (инфликсимаб), которые обладают широким спектром побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, системы крови, репродуктивной сферы и др., не всегда позволяющих добиться стойкой ремиссии. У пациентов с ВЗК развивается резистентность к терапии и непереносимость препаратов при длительном применении примерно в 30 % случаев, в связи с чем актуальной является разработка новых терапевтических подходов [5, 6]. Определенный интерес представляет витамин D3, обладающий плеiotропными свойствами, включая антиоксидантные, противовоспалительные,

иммуномодулирующие и др. [7, 8]. Применение витамина D3 при рассеянном склерозе и псориазе ограничивает выраженность воспалительного процесса и клинических проявлений за счет увеличения продукции IL-10 и количества Treg в крови, изменения баланса Th1/Th2 в сторону Th2-зависимого иммунного ответа [9, 10]. При ревматоидном артрите витамин D3 ингиби-

рует активность Th17 и продукцию IL-17 [11]. Указанные факты являются предпосылкой для применения витамина D3 при ВЗК [12]. На данный момент в РФ отсутствуют лекарственные формы с витамином D3 для локального применения per rectum с учетом воздействия на очаг воспаления и поврежденный участок толстой кишки при ВЗК. Нами разработаны оригиналь-

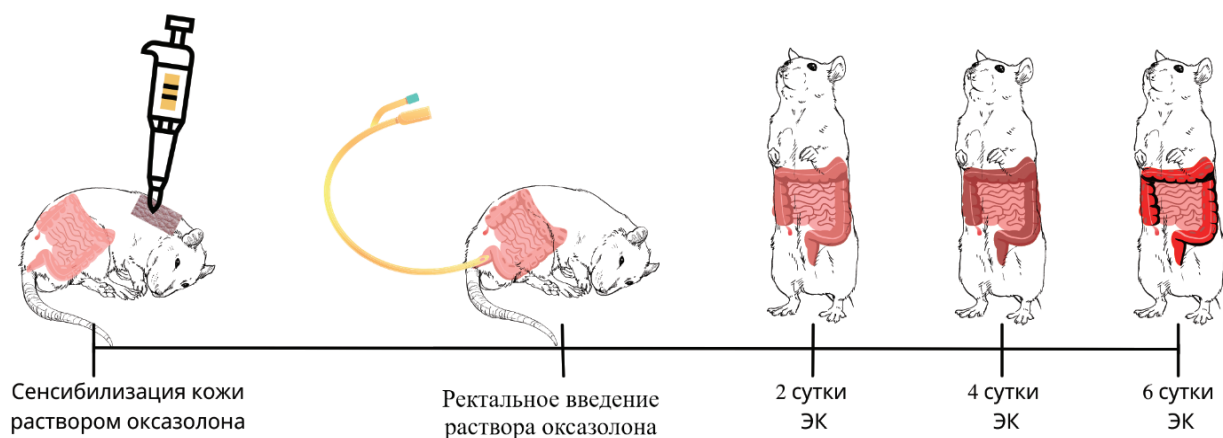


Рис. 1. Моделирование экспериментального колита

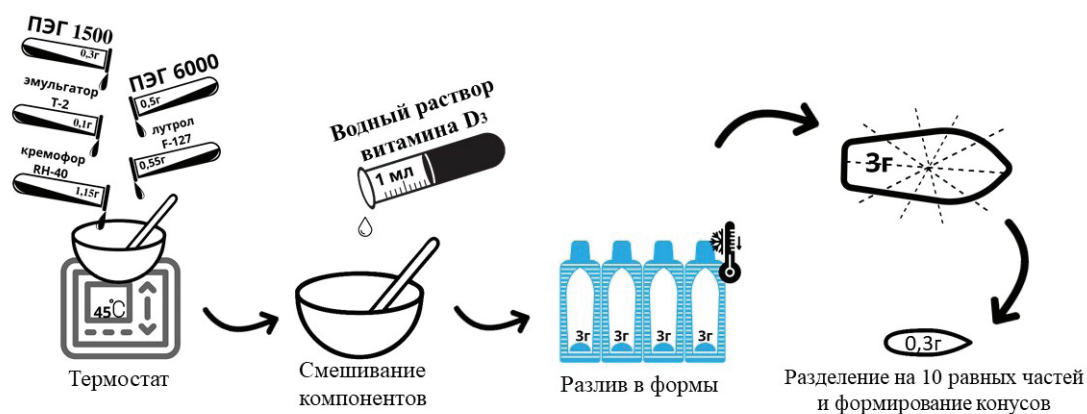


Рис. 2. Технология изготовления ректальных суппозитория с витамином D3

Таблица 1
Влияние витамина D3 и 5-АСК в составе ректальных суппозитория на активность патологического процесса, оцениваемого с использованием индекса при ЭК (Ме (Q1; Q3))

Показатели	Группа I Интактные	Группа II ЭК			Группа III ЭК+VD3			Группа IV ЭК+5-АСК		
		2 сутки	4 сутки	6 сутки	2 сутки	4 сутки	6 сутки	2 сутки	4 сутки	6 сутки
Кол-во	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
DAI, у.е.	0	7,00 (3,00; 7,00)*	8,00 (6,00; 10,00)*	11,00 (11,00; 11,00)*	5,00 (5,00; 5,00)*	4,00 (4,00; 5,00)* #	4,00 (4,00; 4,00)* #	5,00 (4,00; 5,00)*	5,00 (5,00; 5,00)* #	4,00 (2,00; 4,00) * # & &

Примечание: * – статистически значимые (p < 0,01) различия с группой I, # – с группой II, \$ – с группой III на вторые сутки, €€ – с группой III на четвертые сутки, & – с группой IV на вторые сутки, && – с группой IV на четвертые сутки. ЭК – экспериментальный колит, VD3 – витамин D3, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

ные ректальные суппозитории с витамином D3 на основе 10%-го водного раствора витамина D3 [13]. Ранее нами продемонстрировано, что витамин D3 в составе оригинальных ректальных суппозиториях при экспериментальном колите (ЭК) обладает системным иммуноотропным действием за счет снижения количества нейтрофилов, восстановления поглотительной и НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов, снижения количества лимфоцитов, в том числе CD3+ и CD45RA+, снижения концентрации IgM, IgG, IL-6 и IL-8 и антиоксидантного действия за счет снижения содержания в стенке толстой кишки продуктов перекисного окисления липидов и продуктов окислительной модификации белков [14, 15, 16, 17, 18]. Полагаем, что системные иммуноотропные эффекты витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиториях при ЭК обусловлены его локальным протекторным действием в очаге повреждения толстой кишки.

Цель исследования – провести сравнительный анализ эффективности локального применения витамина D3 и 5-аминосалициловой кислоты при ЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на самцах крыс линии Wistar массой 210–230 г, содержащихся в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами гуманного отношения и выведения из опыта животных, изложенных в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [19]. 98 крыс случайным образом разделили на четыре группы: I группа (n = 14) – интактный контроль; II группа (n = 42) – животные с ЭК; III группа (n = 42) – животные с ЭК, получавшие ректальные суппозитории с витамином D3 каждые 12 ч до выведения из эксперимента на шестые сутки; IV группа (n = 42) – животные с ЭК, получавшие ректальные суппозитории с 5-АСК каждые 12 ч до выведения из эксперимента на шестые сутки. ЭК моделировали путем двухэтапного применения оксазолна (Sigma-aldrich, USA). На первом этапе была проведена сенсбилизация путем нанесения на кожу области между лопаток 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолна, на втором этапе вводили на глубину 7–8 см *per rectum* 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолна (рис. 1) [20, 21]. Для анестезии использовали Золетил-100 (Virbac Sante Animal, Франция) в дозе 20 мг/кг. Верификацию ЭК проводили по оценке клинической картины и морфологии участка повреждения в толстой кишке. Суппозитории с витамином D3 готовили на основе 10%-го водного раствора витамина D3, в качестве веномогательных веществ использовали смесь полиэтиленгликолей с различной молекулярной массой, эмульгатор Т-2, кремофор RH-40 и колифор. Размер и форма суппозитория соответствовали особенностям строения

дистального отдела толстой кишки крыс, конечная масса каждого суппозитория составила 0,3 г, с 1500 МЕ содержания витамина D3 в каждом суппозитории (рис. 2) [13]. Суппозитории с 50 мг 5-АСК в каждом суппозитории для крыс готовили на основе препарата Салофальк (МНН: Месалазин, Doctor Falk Pharma GmbH, Германия). Исследования проводили на вторые, четвертые и шестые сутки от индукции ЭК. Для оценки клинического статуса применяли адаптированную для крыс шкалу активности болезни (Disease activity index, DAI), включающую такие показатели, как масса тела, консистенция стула и примесь крови в кале [22]. Подсчет показателей по 5-балльной шкале от 0 до 4 проводили ежедневно, максимально возможное значение DAI – 12. Фрагменты дистальной части ободочной кишки фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина, серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. В десяти случайно отобранных полях зрения на микроскопе Leica DMRXA (Германия) при увеличении ×400 подсчитывали на 1 мм² количество нейтрофилов (НФ), лимфоцитов (ЛЦ), эозинофилов (ЭФ), гистиоцитов (ГЦ), плазматических клеток (ПЦ), фибробластов (ФБ), при увеличении ×100 определяли диаметр язвенного дефекта (в мкм). Морфометрию выполняли с использованием программы Image Score M (Россия). Повреждение тканей толстой кишки оценивали по шкале от 0 до 6 с определением относительной площади повреждения, толщины стенки кишки, ангиогенеза, потери бокаловидных клеток, выраженности лейкоцитарной инфильтрации и расчетом индекса повреждения тканей (tissue damage index, TDI) [23]. Иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию миелопероксидазы (MPO) и TNF-α в слизистой оболочке толстой кишки с использованием наборов специфических для крыс антител (Cloud. Clon. Corp., Китай) и высокоадгезивных стекол (Super Frost Plus), результат выражали в ед./мм². Постановка реакции проводилась в иммуногистостейнере Bench Mark XT (Ventana, USA) с соблюдением протокола исследования. Для визуализации применяли систему Ultra VIEW Universal DAB (Ventana, USA) и комплекс вторичных антител и хромогена. Для статистической обработки полученных результатов использовали программу IBM SPSS Statistics v.23 (США). Характеристики выборки представлены в формате Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Краскела – Уоллиса, Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца, Колмогорова – Смирнова).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При ЭК на вторые сутки наблюдения дефицит массы тела, учащается дефекация, консистен-

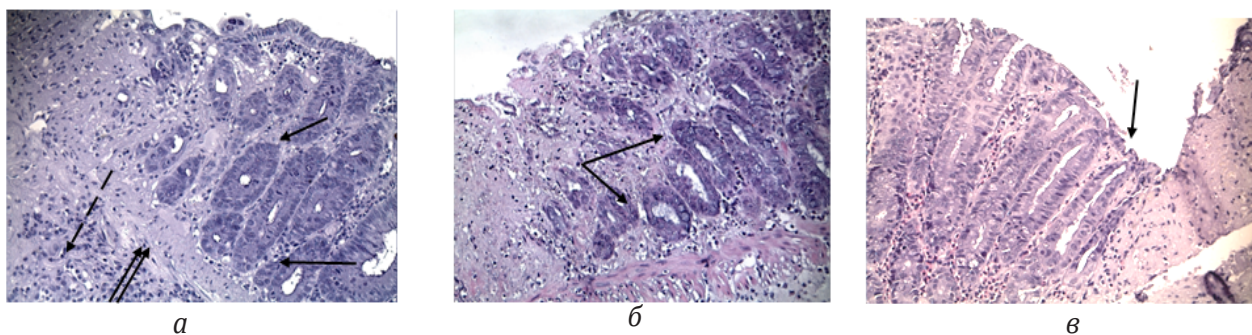


Рис. 3. Морфологические изменения в участке повреждения толстой кишки на вторые сутки ЭК, окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 200$: а – группа II, нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация межучточной ткани (стрелки), утолщение собственной пластинки слизистой (двойная стрелка), инфильтрация подслизистого слоя (пунктирная стрелка); б – группа III, укороченные крипты; в – группа IV, пролиферация покровного столбчатого эпителия (стрелка)

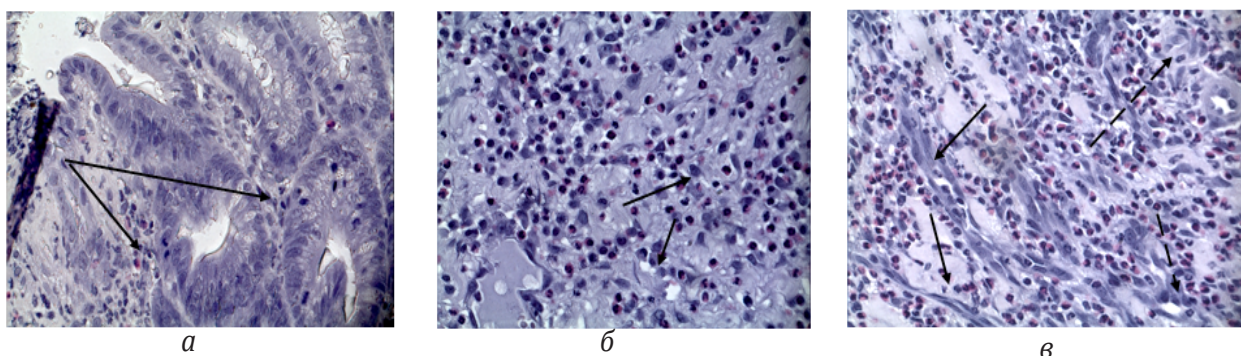


Рис. 4. Морфологические изменения в участке повреждения толстой кишки на четвертые сутки ЭК, окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 400$: а – группа II, нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация стромы с большим количеством эозинофилов; б – группа III, пролиферирующие фибробласты; в – группа IV, формирование псевдополипа: участок неравномерного утолщения собственной пластинки (пунктирная стрелка) окружен слизистой оболочкой с густой воспалительной инфильтрацией и единичными кишечными железами (стрелки)

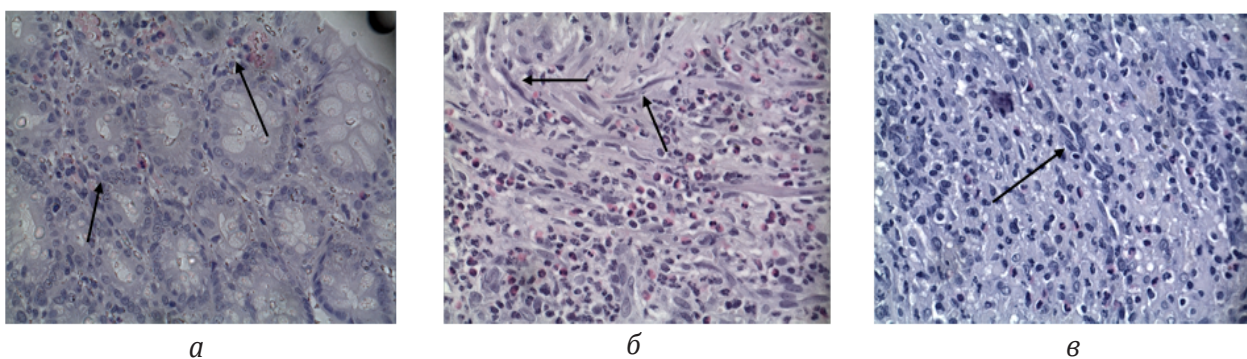


Рис. 5. Морфологические изменения в участке повреждения толстой кишки на шестые сутки ЭК, окраска гематоксилин-эозин, ув. $\times 400$: а – группа II, нейтрофильная инфильтрация соединительно-тканых прослоек; б – группа III, пролиферация фибробластов и фибриллогенез; в – группа IV, новообразованный капилляр (стрелка) с эндотелиальной выстилкой в составе незрелой грануляционной ткани

ция кала меняется на жидкий, примесь крови определяется как с проведением бензидиновой пробы, так и визуально. На четвертые и шестые сутки клинические признаки утяжеляются. Индекс DAI на вторые, четвертые и шестые сутки значительно увеличивается, его значение на шестые сутки выше, по сравнению с четвертыми и вторыми сутками (табл. 1).

На вторые сутки ЭК при гистологическом исследовании стенки толстой кишки в очаге

повреждения определяются язвы, дно которых расположено в собственной пластинке слизистой и в поверхностных отделах подслизистого слоя, здесь же клеточная инфильтрация с отеком межучточной ткани, смешанное полнокровие, эпителий крипт в состоянии белковой дистрофии (рис. 3а). На четвертые сутки ЭК сохранялись язвенные дефекты, отек межучточной ткани, полнокровие с лейкостазом и лейкодиapedезом, плазматическое пропитывание и набу-

хание сосудистых стенок, инфильтрация стромы (рис. 4а).

В глубине язвенных дефектов пролиферация сохранившихся камбиальных клеток кишечных желез. На шестые сутки ЭК видны язвенные дефекты с клеточным детритом, отек и разрыхление межучасточной ткани, полнокровные сосуды (рис. 5а). Между участками инфильтрации видна пролиферация юных веретеновидных фибробластов и начальные явления неоангиогенеза, по краям язвенных дефектов выраженная эпителизация. Морфометрическая оценка клеточного состава инфильтрата в очаге повреждения толстой кишки позволила установить, что на вторые, четвертые и шестые сутки ЭК значительно увеличивается содержание НФ, ЛЦ, ЭФ, ПЦ, ГЦ и ФБ, площадь язвенного дефекта и TDI (табл. 2).

В динамике ЭК количество НФ на шестые и четвертые сутки меньше, чем на вторые сутки; количество ЛЦ на шестые сутки больше, чем на вторые и четвертые сутки; количество ЭФ, ГЦ и ПЦ на четвертые и шестые сутки больше, чем на вторые сутки; количество ФБ на четвертые сутки больше, чем на вторые сутки, на шестые сутки больше, чем на вторые и четвертые сутки. Площадь язвенного дефекта на четвертые и шестые сутки больше, чем на вторые сутки. Как видно, максимальная выраженность количественного представительства в очаге НФ зафиксирована на вторые сутки, ЭФ, ГЦ, ПЦ и ФБ – на вторые и четвертые сутки, ЛЦ – на шестые сутки ЭК. На вторые, четвертые и шестые сутки ЭК в очаге повреждения толстой кишки значительно повышается экспрессия MPO и TNF- α (табл. 3). В динамике ЭК экспрессия MPO на шестые сутки ниже, чем на вторые сутки; экспрессия TNF- α на шестые сутки ниже, чем на вторые и четвертые сутки. В условиях локального применения витамина D3 при ЭК наблюдается изменение клинической картины у животных. Масса тела не снижается, каловые массы более плотные, кровь в каловых массах определяется только в бензидиновой пробе, как следствие DAI значительно уменьшается и частично восстанавливается на четвертые и шестые сутки (табл. 1).

При гистологическом исследовании стенки толстой кишки в очаге повреждения при ЭК в условиях применения витамина D3 на вторые сутки зафиксированы язвенные дефекты в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистом слое со смешанным полнокровием, слизистая умеренно отечна, крипты укорочены, расширены, их эпителий в состоянии зернистой дистрофии (рис. 3б).

На четвертые сутки в слизистой оболочке выявлены полностью эпителизированные фрагменты язвенных дефектов с начальным формированием кишечных желез и крипт, очаговая инфильтрация гранулоцитами, пролиферация молодых фибробластов (рис. 4б).

На шестые сутки наблюдается полная эпителизация язвенных дефектов, очаговая инфильтрация

и обширные поля пролиферирующих фибробластов, новообразованные соединительно-тканые волокна и сосуды в больших количествах (рис. 5б). Морфометрическая оценка клеточного состава инфильтрата в очаге повреждения толстой кишки при ЭК на фоне применения витамина D3 позволила установить, что на вторые, четвертые и шестые сутки снижается количество НФ, ЛЦ, ЭФ и ПЦ, на вторые и шестые сутки увеличивается количество ГЦ, на вторые, четвертые и шестые сутки наблюдения – количество ФБ. На вторые, четвертые и шестые сутки сокращается площадь язвенного поражения, на четвертые и шестые сутки снижается TDI (табл. 2).

В динамике ЭК количество ЭФ и ГЦ на четвертые и шестые сутки больше, чем на вторые сутки, количество ФБ на шестые сутки больше, чем на четвертые и вторые сутки. TDI на четвертые и шестые сутки меньше, чем на вторые сутки. Все морфометрические показатели во все сутки эксперимента частично восстанавливались, не достигая значений группы интактных животных. На фоне применения витамина D3 при ЭК на четвертые и шестые сутки в очаге повреждения снижается экспрессия MPO и TNF- α (табл. 3). В динамике экспрессия MPO на четвертые сутки меньше, чем на вторые сутки, на шестые сутки меньше, чем на четвертые и вторые сутки; экспрессия TNF- α на шестые сутки меньше, чем на четвертые и вторые сутки. На фоне применения 5-АСК у животных со вторых суток улучшилась клиническая картина, что нашло отражение в изменении индекса активности болезни DAI, который на вторые, четвертые и шестые сутки снижается по сравнению со значениями в группе животных с ЭК (табл. 1).

В динамике ЭК параметр DAI на шестые сутки ниже, чем на вторые и четвертые сутки эксперимента. Клиническая картина при ЭК в условиях применения 5-АСК нашла отражение и в морфологии очага повреждения (рис. 3в, 4в, 5в). Морфометрический анализ очага повреждения в толстой кишке при ЭК при применении ректальных суппозиторий с 5-АСК установил, что на вторые сутки снижается количество НФ, ПЦ, на четвертые сутки – количество НФ, ЭФ и ПЦ, на шестые сутки – количество НФ, ЛФ, ЭФ и ПЦ, на вторые и четвертые сутки увеличивается количество ФБ (табл. 2). В динамике ЭК в условиях применения 5-АСК количество ЛФ на шестые сутки ниже, чем на вторые сутки; количество ФБ на шестые сутки выше, чем на вторые сутки. На фоне применения 5-АСК при ЭК на четвертые и шестые сутки в очаге повреждения снижается экспрессия MPO и TNF- α (табл. 3). В динамике ЭК экспрессия MPO и TNF- α на шестые сутки ниже, чем на вторые и четвертые сутки наблюдения.

Сравнительный анализ параметра DAI в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D3 и 5-АСК выявил отсутствие ста-

Таблица 2

Влияние витамина D3 и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на морфометрические показатели в очаге повреждения толстого кишечника при ЭК (Ме (Q1; Q3))

Показатели	Группа I Интактные (n = 7)	Группа II ЭК			Группа III ЭК+ V D3			Группа IV ЭК+5-АСК		
		вторые сутки (n = 7)	четвертые сутки (n = 7)	шестые сутки (n = 7)	вторые сутки (n = 7)	четвертые сутки (n = 7)	шестые сутки (n = 7)	вторые сутки (n = 7)	четвертые сутки (n = 7)	шестые сутки (n = 7)
Нейтрофилы, ед./мм ²	204,56 (189,71; 223,57)	2651,41 (2558,85; 2813,85) *	1518,48 (1121,49; 2100,00) *	1333,33 (1213,34; 1608,04) *	873,78 (666,67; 925,92) *#	550,45 (370,37; 1006,03) *#	654,21 (582,53; 804,83) *#	926,81 (571,42; 1063,83) *#	803,57 (737,71; 1592,92) *#	833,07 (706,52; 983,607) *#
Лимфоциты, ед./мм ²	338,99 (305,14; 368,35)	1104,48 (947,67; 1333,34) *	1004,55 (880,09; 1238,11) *	1667,02 (1302,62; 2038,84) *	680,07 (511,78; 849,32) *#	710,67 (495,06; 733,95) *#	642,19 (582,61; 891,11) *#	1229,83 (983,61; 1259,84) *\$	796,46 (555,56; 1095,89) *	596,51 (452,26; 1034,48) *#&
Эозинофилы, ед./мм ²	146,91 (120,83; 176,18)	852,34 (839,46; 857,45) *	2671,29 (2352,95; 3553,31) *	2380,11 (2110,11; 2613,05) *	467,29 (304,57; 611,13) *#	852,89 (635,86; 1094,25) *#€	805,12 (685,42; 867,49) *#€	807,65 (514,28; 1105,52) *#	1587,31 (707,96; 2232,143) *#	726,42 (483,87; 1475,41) *#
Гистиоциты, ед./мм ²	13,47 (13,42; 13,65)	571,94 (198,02; 750,26) *	1197,11 (1049,31; 1614,91) *	1006,03 (970,87; 1009,17) *	913,31 (759,37; 1102,82) *#	1395,36 (1313,13; 1600,00) *€	1617,79 (1512,09; 1809,04) *#€	698,91 (351,75; 862,06) *	821,91 (655,73; 1415,92) *	1097,96 (800,01; 1338,58) *\$
Плазмоциты, ед./мм ²	13,42 (12,87; 13,56)	673,13 (549,12; 704,52) *	804,02 (713,06; 910,01) *	810,13 (804,82; 1210,12) *	480,81 (370,37; 560,74) *#	401,06 (372,67; 411,77) *#	373,83 (297,03; 545,56) *#	495,84 (201,01; 549,45) *#	530,97 (446,42; 540,54) *#&	517,52 (480,01; 655,73) *#
Фибробласты, ед./мм ²	22,66 (13,56; 26,82)	512,77 (281,37; 711,65) *	1146,77 (866,81; 1358,22) *	1685,27 (1523,84; 2057,07) *	1821,02 (1817,34; 1845,66) *#	2353,94 (2311,23; 2401,00) *#€	2467,89 (2413,88; 3047,61) *#€€	856,07 (790,96; 1318,68) *#&	1506,84 (1250,01; 1858,41) *\$	2048,21 (1612,91; 2240,01) *\$&
Диаметр язвенного дефекта, мкм	0	575,00 (305,00; 780,60) *	735,00 (635,52; 976,50) *	753,00 (372,00; 882,50) *	294,00 (197,00; 357,00) *#	242,00 (151,00; 539,00) *#	238,50 (169,00; 299,00) *#	250,82 (211,35; 284,64) *#	492,26 (267,16; 564,21) *#	213,49 (183,47; 241,85) *#
TDI, у.е.	0	3,71 (3,00;4,00) *	3,57 (3,00;4,00) *	3,42 (3,00;4,00) *	3,00 (3,00;4,00) *	2,17 (1,00;3,00) *#€	2,12 (1,00;3,00) *#€	3,61 (3,00;4,00) *	2,00 (1,00;3,00) *#	1,81 (1,00;2,00) *#

Примечание: * – статистически значимые (p < 0,01) различия с группой I: # – с группой II, \$ – с группой III, € – с группой III на вторые сутки, €€ – с группой III на четвертые сутки, & – с группой IV на вторые сутки, && – с группой IV на четвертые сутки. ЭК – экспериментальный колит, VD3 – витамин D3, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 3

Влияние витамин D3 и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на содержание MPO и TNF-α в очаге повреждения толстой кишки при ЭК (Ме (Q1; Q3))

Показатели, ед./мм ²	Группа I Интактные (n = 7)	Группа II ЭК			Группа III ЭК+VD3			Группа IV ЭК+5-АСК		
		вторые сутки (n = 7)	четвертые сутки (n = 7)	шестые сутки (n = 7)	вторые сутки (n = 7)	четвертые сутки (n = 7)	шестые сутки; (n = 7)	вторые сутки (n = 7)	четвертые сутки (n = 7)	шестые сутки; (n = 7)
MPO	16,28 (7,66;26,81)	1241,37 (967,04; 1486,59)*	938,69 (770,15; 1109,19)*	775,86 (766,28; 814,17)*	1053,64 (977,01; 1091,95)*	498,08 (478,92; 593,86)* #€	287,35 (268,19; 287,35)* #€€€	984,67 (773,94- 1112,83)*	555,55 (478,92- 574,71)* #&	249,04 (210,72- 249,04)* #\$& &&
TNF-α	52,68 (44,06; 63,21)	1321,83 (919,54; 1475,09)*	1302,68 (1264,36; 1321,83)*	752,87 (703,06; 814,17)*	766,28 (670,49; 957,85)*	727,96 (727,97; 766,28)* #	210,72 (172,41; 229,88)* #€€€	766,28 (545,97- 967,43)*	402,29 (344,82- 440,61)* #\$&	191,57 (172,41- 191,57)* #&&

Примечание: * – статистически значимые (p < 0,01) различия с группой I: # – с группой II, \$ – с группой III, € – с группой III на вторые сутки, €€ – с группой III на четвертые сутки, & – с группой IV на вторые сутки, && – с группой IV на четвертые сутки. ЭК – экспериментальный колит, VD3 – витамин D3, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

статистически значимых различий на вторые, четвертые и шестые сутки наблюдения (табл. 1).

Сравнительный анализ морфологии очага повреждения при ЭК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D3 и 5-АСК выявил на вторые сутки наблюдения

уменьшение диаметра язвенного дефекта и нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации (рис. 3). На четвертые сутки в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D3 в отличие от 5-АСК во всех препаратах поверхность язвенных дефектов укрыта многорядной

столбчатым эпителием (рис 4). На шестые сутки эксперимента в условиях применения ректальных суппозиториев с витамином D3 в отличие от 5-АСК во всех препаратах наблюдалась полная эпителизация язвенных дефектов, менее густая нейтрофильная инфильтрация, отсутствие гиперплазии лимфоидной ткани (рис. 5).

При применении ректальных суппозиториев с витамином D3 по сравнению с ректальными суппозиториями с 5-АСК на вторые сутки отмечено снижение количества ЛФ, увеличение количества ФБ; на четвертые сутки отмечено снижение количества ПЦ, увеличение количества ФБ; на шестые сутки увеличение количества ГЦ и ФБ (табл. 2).

При исследовании показателей иммуногистохимии в ткани кишки в условиях применения ректальных суппозиториев с витамином D3 по сравнению с ректальными суппозиториями с 5-АСК выявлено, что экспрессия МРО выше на шестые сутки, экспрессия TNF- α – на четвертые сутки (табл. 3).

Таким образом, ректальные суппозитории с витамином D3 продемонстрировали аналогичный эффект с 5-АСК в составе ректальных суппозиториев на клинико-морфологические параметры при ЭК на вторые, четвертые и шестые сутки, наблюдалась менее выраженная инфильтрация, отек, признаки заживления и репарации язвенных дефектов фиксировались раньше в группе с применением витамина D3. Интегральный параметр повреждения ткани кишки индекс TDI одинаково снижается на четвертые и шестые сутки ЭК и при применении витамина D3 и 5-АСК.

Протекторный эффект витамина D3 ограничивающий инфильтрацию и деструкцию ткани кишки, активирующий процессы репарации, был зафиксирован со вторых суток ЭК.

ОБСУЖДЕНИЕ

При ЭК фиксируются клинические признаки (снижение массы тела, появление жидкого стула с примесью крови) и морфологическая картина, характерные для ВЗК, что позволяет применять данную модель для дальнейшего изучения патогенеза и экспериментальной терапии ВЗК. Полагают, что оксазолон проявляет свойства гаптена, направляющего иммунный ответ преимущественно по Th2-зависимому пути, что сопровождается повышением секреции иммуноглобулинов (IgG, IgM) и цитокинов (IL-6, IL-8, TNF- α и др.) в крови, приводит к накоплению в участке воспаления лейкоцитов, повреждению стенки кишки и расширению зоны вторичной альтерации [24, 25]. Источником АФК, инициирующих деструкцию липидов и белков, накопление продуктов ПОЛ в стенке толстой кишки являются преимущественно нейтрофилы, моноциты/макрофаги, инфильтрация которыми является характерным морфологическим признаком колита [26]. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α и др. провос-

палительные цитокины активируют миелопоэз, выход из костного мозга зрелых нейтрофилов и моноцитов, их миграцию в очаг воспаления [27, 28]. В образовании АФК могут участвовать эндотелиоциты, в том числе в связи с активацией eNOS, синтезом NO и пероксинитрита.

Снижение выраженности клинических проявлений, морфологических признаков повреждения в стенке толстого кишечника при ЭК на фоне применения ректальных суппозиториев с витамином D3 может быть обусловлено плейотропными эффектами витамина D3.

Полагаем, что полученные результаты связаны с несколькими механизмами действия витамина D3 при ЭК. Во-первых, иммуотропный эффект витамина D3 реализуется воздействием активного метаболита витамина D3 кальцитриола на пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, снижение содержания Th1, Th17 и увеличение – Treg за счет снижения синтеза IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ и TNF- α , увеличение синтеза IL-10. Витамин D3 тормозит миграцию макрофагов и выделение ими IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, хемотаксис и накопление нейтрофилов [26]. Витамин D3 препятствует экспрессии на поверхности дендритных клеток TLR, CD40, CD80, CD83 и CD86, снижает секрецию ими IL-2 и IFN- γ , увеличивает – синтез IL-10 [29]. Это ограничивает активность воспалительного процесса и альтерацию тканей в толстой кишке [30].

Во-вторых, антиоксидантный эффект витамина D3 обеспечивается напрямую через активацию транскрипционного фактора nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) – регулятора экспрессии антиоксидантных ферментов, индукцию синтеза антиоксидантных ферментов и антиоксидантную защиту энтероцитов в условиях оксидативного стресса [30]. Опосредованный антиоксидантный эффект витамина D3 связан с уменьшением инфильтрации очага повреждения клетками-продуцентами АФК: нейтрофилами и моноцитами/макрофагами в условиях восстановления кооперации иммунокомпетентных клеток.

В-третьих, витамин D3 ускоряет репарацию в очаге повреждения толстой кишки при ЭК. При взаимодействии со специфичными ядерными рецепторами эпителиоцитов толстой кишки (VDR) витамин D3 увеличивает экспрессию винкулина, зонулина, окклюдина, клаудина – белков, участвующих в формировании эпителиоцитов [31, 32]. Увеличение в очаге повреждения количества гистиоцитов и фибробластов свидетельствует об активности процессов репарации в стенке кишки. Кроме этого, ограничение сосудисто-экссудативных и лейкоцитарных реакций за счет противовоспалительного и антиоксидантного действия ускоряет репарацию в условиях применения витамина D3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При оксазолон-индуцированном ЭК на вторые, четвертые, шестые сутки зафиксированы клини-

ческие и лабораторные признаки ВЗК: повышается индекс активности болезни (максимум на шестые сутки), в очаге повреждения толстой кишки фиксируется язвенный дефект, увеличивается индекс повреждения тканей, содержание нейтрофилов (максимум на вторые сутки), лимфоцитов (максимум на шестые сутки), эозинофилов, плазмочитов, гистиоцитов, фибробластов, экспрессия МРО (максимум на вторые сутки) и TNF- α (максимум на вторые и четвертые сутки), увеличивается содержание первичных, вторичных, конечных продуктов окислительной деструкции липидов. Применение ректальных суппозитория с 1500 МЕ витамина D3 каждые 12 ч в течение шести суток при оксазолон-индуцированном ЭК уменьшает выраженность клинических проявлений, индекс активности болезни; снижает площадь язвенного дефекта и индекс повреждения тканей на четвертые и шестые сутки, снижает представительство в очаге повреждения нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов и плазмочитов, увеличивает представительство гистиоцитов

и фибробластов на вторые, четвертые, шестые сутки; уменьшает экспрессию МРО и TNF- α на четвертые и шестые сутки. В очаге повреждения толстой кишки уменьшается содержание первичных, вторичных, конечных продуктов окислительной деструкции липидов на четвертые и шестые сутки. Выраженность клинических проявлений ЭК ослабевает по мере снижения индекса повреждения тканей, величины язвенного дефекта, содержания в очаге повреждения МРО и TNF- α , продуктов окислительной деструкции липидов. Эффект применения ректальных суппозитория с витамином D3 аналогичен 5-АСК при ЭК в отношении клинико-морфологических параметров при ЭК на вторые, четвертые и шестые сутки наблюдения, на содержание в ткани кишки МРО и TNF- α на шестые сутки наблюдения. Более выраженный эффект витамина D3 и 5-АСК зафиксирован на шестые сутки эксперимента, когда были зафиксированы максимальные клинико-морфологические показатели.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Князев О.В., Шкурко Т.В., Каграманова А.В., Веселов А.В., Никонов Е.Л. Эпидемиология воспалительных заболеваний кишечника. Современное состояние проблемы (обзор литературы). Доказательная гастроэнтерология. 2020;9(2):66–73. <https://doi.org/10.17116/dokgastro2020902166>.
2. Wing Y.M., Zhao M., Siew Chien Ng., Burisch J. The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets west. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020;35(3):380–389. <https://doi.org/10.1111/jgh.14872>.
3. Tohari A.M., Alhasani R.H., Biswas L. et al. Vitamin D Attenuates Oxidative Damage and Inflammation in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090341>.
4. Kopecki Z., Yang G., Treloar S. et al. Flightless I exacerbation of inflammatory responses contributes to increased colonic damage in a mouse model of dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis. *Scientific Reports.* 2019;9:12792. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49129-6>.
5. Yokoyama Y., Kamikozuru K., Nakamura S. Granulomonocytapheresis as a cell-based therapy in an ulcerative colitis patient complicated by aminosalicilate-induced severe lymphocytopenia and pneumonia. *Cytotherapy.* 2016;18(9):1234–1236. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.05.016>.
6. Ивашкин В.Т., Шелыгин Ю.А., Халиф И.Л. с соавт. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита. *Колопроктология.* 2017;1(59):6–30.
7. Šimoliūnas E., Rinkūnaitė I., Bukelskienė Ž., Bukelskienė V. Bioavailability of Different Vitamin D Oral Supplements in Laboratory Animal Model. *Medicina.* 2019;55(6):265. <https://doi.org/10.3390/medicina55060265>.
8. Yamamoto E., Jørgensen T.N. Immunological effects of vitamin D and their relations to autoimmunity. *J of Autoimmunity.* 2019;100:7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.03.002>.
9. Harrison S.R., Li D., Jeffery L.E. et al. Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis. *Calcif Tissue Int.* 2020;106(1):58–75. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00577-2>.
10. Liu J., Wang W., Liu K. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with psoriasis susceptibility and the clinical response to calcipotriol in psoriatic patients. *Exp Dermatol.* 2020;29(12):1186–1190. <https://doi.org/10.1111/exd.14202>.
11. Del Pinto R., Ferri C., Cominelli F. Vitamin D Axis in Inflammatory Bowel Diseases: Role, Current Uses and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2360. <https://doi.org/10.3390/ijms18112360>.
12. Naderpoor N., Mousa A., Arango L.F.G. et al. Effect of Vitamin D Supplementation on Faecal Microbiota: A Randomised Clinical Trial. *Nutrients.* 2019;11(12):2888. <https://doi.org/10.3390/nu11122888>.
13. Средство с витамином D3 для лечения язвенного колита в форме ректальных суппозитория: пат. 2709209 Рос. Федерация. № 2019115328; заявл. 20.05.2019; опубл. 17.12.2019. Бюл. № 35.
14. Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В., Ушакова В.А. Иммунотропные эффекты витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозитория при экспериментальном язвенном колите. *Медицинская иммунология.* 2021;23(3):497–508. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IE0-2176>.
15. Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В. Выраженность ответа острой фазы при экспериментальном язвенном колите в условиях применения витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозитория. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021;65(4):80–88. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.04.80-88>.
16. Osikov M.V., Boyko M.S., Fedosov A.A., Ilyinykh M.A. Effectiveness of Experimental Colitis Therapy with Original Vitamin D3 Rectal Suppositories. *International Journal of Biomedicine.* 2022;12(1):124–133. [https://doi.org/10.21103/Article12\(1\)_OA13](https://doi.org/10.21103/Article12(1)_OA13).
17. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бойко М.С. с соавт. Влияние витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозитория на показатели окислительной модификации белков в толстом кишечнике при экспериментальном язвенном колите. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2020;170(11):563–568. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2020-170-11-563-568>.
18. Осиков М.В., Симонян Е.А., Бойко М.С. Влияние витамина D3 в составе ректальных суппозитория оригинального состава на показатели свободнорадикального окисления в слизистой оболочке толстой кишки в динамике экспери-

- ментального язвенного колита. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020;17(1):42–52. <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2020-17-1-42-52>.
19. Директива Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей. URL: <https://base.garant.ru/70350564> (дата обращения: 22.09.2022).
20. Hoving J.C., Keeton R., Höft M.A. et al. IL-4 Receptor-Alpha Signalling of Intestinal Epithelial Cells, Smooth Muscle Cells, and Macrophages Plays a Redundant Role in Oxazolone Colitis. *Mediators Inflamm.* 2020;4361043. <https://doi.org/10.1155/2020/4361043>.
21. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е. с соавт. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника. *Аспирантский вестник Поволжья.* 2018;1-2:153–160. <https://doi.org/10.17816/2075-2354.2018.18.153-160>.
22. Kim J.J., Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualised experiments.* 2012;60:3678.
23. Yao J., Lu Y., Zhi M. et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR-γ/NFAT. *Molecular medicine reports.* 2017;16(6):8315–8322. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7673>.
24. Larabi A., Barnich N., Nguyen H.T. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy.* 2020;16(1):38–51. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1635384>.
25. Lynch W.D., Hsu R. *Ulcerative Colitis.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459282> (дата обращения: 22.09.2022).
26. Tian T., Wang Z., Zhang J. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017;2017:4535194. <https://doi.org/10.1155/2017/4535194>.
27. De Schepper S., Stakenborg N., Matteoli G. et al. Muscularis macrophages: Key players in intestinal homeostasis and disease. *Cell Immunol.* 2018;330:142–150. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.12.009>.
28. Володченко А.М. Патогенетическое обоснование комбинированного применения эритропэтина и лазерного излучения при ишемии спинного мозга (экспериментальное исследование): дисс. ... канд. мед. наук. Омск, 2019. 191 с.
29. Murdaca G., Tonacci A., Negrini S. et al. Emerging role of vitamin D in autoimmune diseases: An update on evidence and therapeutic implications. *Autoimmunity Rev.* 2019;18(9):102350. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102350>.
30. Teixeira T.M., da Costa D.C., Resende A.C. et al. Activation of Nrf2-Antioxidant Signaling by 1,25-Dihydroxycholecalciferol Prevents Leptin-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Human Endothelial Cells. *The Journal of Nutrition.* 2017;147(4):506–513. <https://doi.org/10.3945/jn.116.239475>.
31. Charoenngam N., Holick M.F. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients.* 2020;12(7):2097. <https://doi.org/10.3390/nu12072097>.
32. Fakhoury H.M.A., Kvietyts P.R., Al Kattan W. et al. Vitamin D and intestinal homeostasis: Barrier, microbiota, and immune modulation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;200. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105663>. consultant.ru/document/cons_doc_LAW_131573/

Сведения об авторах:

М. В. Осиков – доктор медицинских наук, профессор;
 М. С. Бойко – ассистент кафедры;
 В. А. Ушакова – кандидат фармацевтических наук.

Information about the authors

M. V. Osikov – Doctor of Science (Medicine),
 Professor;
 M. S. Boyko – Department Assistant;
 V. A. Ushakova – Ph.D. in pharmacy.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflicts of interests. The authors declare no conflicts of interests.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Этическая экспертиза. Эксперимент выполняли в соответствии с правилами гуманного отношения и выведения из опыта животных, изложенных в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Ethics approval. The experiment was performed in accordance with the rules for the humane treatment and exhumation of animals set forth in Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of September 22, 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Информированное согласие не требуется.
Informed consent is not required.

Статья поступила в редакцию 23.05.2022; одобрена после рецензирования 20.07.2022; принята к публикации 26.09.2022.

The article was submitted 23.05.2022; approved after reviewing 20.07.2022; accepted for publication 26.09.2022.