

Оригинальная статья

@ Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В., Ушакова В.А., 2021

УДК: 616.348-002.44:615.356

DOI: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-8-15

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ВИТАМИНОМ D₃

М.В. Осиков, М.С. Бойко, Е.В. Симонян, В.А. Ушакова

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Челябинск, Российская Федерация

Введение. Витамин D₃ обладает антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и др. свойствами, продемонстрировал эффективность при некоторых аутоиммунных заболеваниях, что является предпосылкой для изучения его влияния при локальном применении на клинический статус и морфологию участка повреждения при язвенном колите (ЯК). **Цель исследования** — изучить влияние витамина D₃ в составе оригинальных ректальных суппозиториях на клинический статус и морфологию участка повреждения толстой кишки при экспериментальном ЯК. **Материалы и методы.** ЯК моделировали двухэтапным введением оксазолон. Ректальные суппозитории готовили на основе 10% водного раствора витамина D₃. Клинический статус оценивали по шкале Disease activity index (DAI). В участке повреждения толстой кишки исследовали на 1 мм² количество нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, гистиоцитов, плазмоцитов и фибробластов, подсчитывали индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI). **Результаты и обсуждение.** При экспериментальном ЯК увеличивается DAI, в толстой кишке фиксируется язвенный дефект, увеличивается количество нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, плазмоцитов, гистиоцитов, фибробластов, TDI. Применение оригинальных ректальных суппозиториях с витамином D₃ при экспериментальном ЯК приводит к уменьшению DAI, размера язвенного дефекта и TDI, снижению инфильтрации стенки кишки нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами и плазмócитами, увеличению инфильтрации гистиоцитами, фибробластами. **Заключение.** При экспериментальном оксазолон-индуцированном колите фиксируется характерная для ЯК клиническая картина и морфология участка повреждения. Применение оригинальных ректальных суппозиториях с витамином D₃ в суммарной дозе 18000 МЕ приводит к снижению выраженности клинических признаков и снижению представительства клеток, участвующих в деструкции тканей, увеличению представительства клеток, опосредующих репарацию, что отразилось в уменьшении площади язвенного дефекта и индекса повреждения тканей, выраженность клинических признаков по DAI ослабевает по мере снижения в участке повреждения толстой кишки лимфоцитов и плазмócитов, уменьшения размера язвенного дефекта и снижения TDI, увеличения гистиоцитов и фибробластов.

Ключевые слова: язвенный колит, витамин D₃, кишка, морфология, суппозитории.

Цитирование: Клинико-морфологическая характеристика экспериментального язвенного колита в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториях с витамином D₃ / М. В. Осиков, М. С. Бойко, Е. В. Симонян, В. А. Ушакова // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, №1. – С. 8-15. – Doi: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-8-15.

Cite as: Clinical and morphological characteristics of experimental ulcerative colitis in the conditions of using original rectal suppositories with vitamin D₃ / M. V. Osikov, M. S. Boyko, E. V. Simonyan, V. A. Ushakova // Ural medical journal. – 2021. – Vol. 20 (1). – P. 8-15. – Doi: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-8-15.

Рукопись поступила: 17.02.2021. Принята в печать: 24.02.2021

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS IN THE CONDITIONS OF USING ORIGINAL RECTAL SUPPOSITORIES WITH VITAMIN D₃

M.V. Osikov, M.S. Boyko, E.V. Simonyan, V.A. Ushakova

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Introduction. Vitamin D₃ possesses antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory, and other properties, has been shown to be effective in some autoimmune diseases, which is a prerequisite for studying its effect, when applied locally, on the clinical status and morphology of the site of injury in ulcerative colitis (UC). **The aims** was to study the effect of vitamin D₃ in the composition of original rectal suppositories on the clinical status and morphology of the lesion of colon in experimental UC. **Materials and methods.** UC was modeled by two-stage administration of oxazolone. Rectal suppositories were prepared on the basis of a 10% aqueous solution of vitamin D₃. The clinical status was assessed using the Disease activity index (DAI) scale. In the area of colon damage, the number of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, histiocytes, plasmocytes and fibroblasts was examined per mm², and the tissue damage index (TDI) was calculated. **Results and Discussion.** In experimental UC, DAI increases, an ulcerative defect is recorded in the colon, the number of neutrophils, lymphocytes, eosinophils, plasma cells, histiocytes, fibroblasts, TDI increases. The use of original rectal suppositories with vitamin D₃ in experimental UC leads to a decrease in DAI, the size of the ulcer and TDI, a decrease in the infiltration of the intestinal wall by neutrophils, lymphocytes, eosinophils and plasma cells, an increase in the infiltration of histiocytes, fibroblasts. **Conclusions.** In experimental oxazolone-induced colitis, the clinical picture and morphology of the injury site characteristic of UC are recorded. The use of original rectal suppositories with vitamin D₃ in a total dose of 18,000 IU leads to a decrease in the severity of clinical signs and a decrease in the representation in the colon wall of cells involved in tissue destruction, an increase in the representation of cells mediating repair, which was reflected in a decrease in the area of the ulcer and tissue damage index, the severity of clinical signs according to DAI weakens as lymphocytes and plasma cells decrease in the area of damage to the colon, decrease in the size of the ulcer and decrease in TDI, increase in histiocytes and fibroblasts.

Keywords: ulcerative colitis, vitamin D₃, intestine, morphology, suppositories.

ВВЕДЕНИЕ

Язвенный колит (ЯК) в Европе по распространенности достигает 505 случаев на 100 тысяч населения, ежегодный прирост составляет 5-20 случаев. В Российской Федерации ЯК по распространенности составляет 17 случаев на 100 тысяч, а её пик приходится на возрастной период от 20 до 40 лет [1, 2, 3]. По данным литературы, в патогенезе ЯК преимущественную значимость имеют Th2-зависимые реакции в деструкции стенки кишки с участием IgM, IgG, а также активация клеток, участвующих в фагоцитозе, и увеличение продукции IL-08, TNF-α и др. цитокинов со свойствами хемоаттрактантов, стимулирующих поглотительную, киллинговую активности нейтрофилов, моноцитов/макрофагов. Указанные изменения на морфологическом уровне приводят к повреждению дистальных отделов толстой кишки, деструкции кишечных крипт, гиперплазии бокаловидных клеток, язвообразованию в слизистой оболочке, фиброзу, что клинически проявляется тенезмами, изменением консистенции стула, примесью крови в каловых массах, дефицитом массы тела и др. симптомами, включая кишечные и внекишечные осложнения [4-7]. Для базисной терапии ЯК применяются топические и системные ингибиторы воспаления (5-аминосалицилаты, кортикостероиды), иммуносупрессоры (азатиоприн, 6-меркаптопурин и др.), средства биологической терапии (инфликсимаб), обладающие широким спектром побочных эффектов. У 30% больных с ЯК развивается резистентность к терапии и непереносимость препаратов при длительном применении, что говорит о необходимости поиска новых терапевтических подходов [8, 9]. В качестве альтернативного подхода интерес представляет витамин D₃, обладающий

плейотропными свойствами, положительные эффекты которого продемонстрированы при сахарном диабете I типа, ревматоидном артрите и др. аутоиммунных заболеваниях, что является предпосылкой для его применения при ЯК [10-12]. На сегодняшний день в РФ отсутствуют лекарственные формы с витамином D₃, позволяющие эффективно доставлять и локально воздействовать на участок воспаления и повреждённый участок толстой кишки при ЯК. Среди таких лекарственных форм наибольший интерес представляют ректальные суппозитории. Ранее нами показано, что суппозитории оригинального состава с витамином D₃ per rectum при экспериментальном ЯК демонстрирует антиоксидантные свойства за счет снижения содержания в стенке толстой кишки продуктов свободнорадикального окисления, обладает системным иммунотропным эффектом за счет снижения концентрации в сыворотке крови IgG, IgM, IL-6, IL-8 [13, 14]. Данные факты предполагают влияние витамина D₃ при локальном применении в составе ректальных суппозиториях на морфологию участка повреждения в толстой кишке и клинические проявления при ЯК.

Цель работы: исследовать влияние витамина D₃ в составе оригинальных ректальных суппозиториях на клинический статус и морфологию участка повреждения толстой кишки при экспериментальном язвенном колите.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Для эксперимента были отобраны 49 крыс-самцов с массой 215-235 г чистой линии Wistar, которые содержались согласно требованиям по

содержанию, уходу и выводу из эксперимента лабораторных животных в экспериментально-биологической клинике (виварий) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России [15]. Животных случайным образом разделили на 3 группы: I (n=7) — интактный контроль; II (n=21) — животные с ЯК; III (n=21) — животные с ЯК в условиях применения витамина D₃ каждые 12 ч per rectum до выведения из эксперимента на 6 сутки.

Описание медицинского вмешательства

ЯК моделировали путем двухэтапного введения оксазолана (Sigma-aldrich, USA): на первом этапе была проведена сенсбилизация животных путем нанесения на кожу области между лопаток 150 мкл 3% спиртового раствора оксазолана, на втором этапе производилось введение на глубину 7-8 см per rectum 150 мкл 3% спиртового раствора оксазолана [12, 16]. С целью проведения анестезии использовали препарат «Золетил-100» (Virbac Sante Animal, Франция) в дозе 20 мг/кг.

Методы регистрации исходов

Верификацию ЯК проводили по клинической картине и морфологии участка повреждения в толстой кишке. Суппозитории для использования per rectum готовили на основе 10% водного раствора витамина D₃, в качестве вспомогательных веществ использовали смесь полиэтиленгликолей с различной молекулярной массой, эмульгатор Т-2, кремофор RH-40 и колифор. Размер и форма суппозиторий соответствовали особенностям строения дистального отдела толстой кишки крыс, конечная масса каждого суппозитория составила 300 мг, содержание витамина D₃ в каждом суппозитории — 1500 МЕ [17]. Анализы проводили на 2, 4 и 6 сутки от моделирования ЯК. Клинический статус оценивали адаптированной для крыс модифицированной шкалой активности болезни (Disease activity index, DAI). Шкала включает в себя такие показатели, как масса тела, консистенция стула и примесь крови в кале [18]. Подсчёт показателей по 4-балльной шкале от 0 до 4 проводили ежедневно, максимально возможное значение индекса — 12. Полученные образцы дистальной части ободочной кишки в процессе вскрытия фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Подсчёт на 1 мм² количества нейтрофилов(НФ), лимфоцитов(ЛЦ), эозинофилов(ЭФ), гистиоцитов(ГЦ), плазматических клеток (ПЦ), фибробластов(ФБ) при увеличении x400, диаметр язвенного дефекта (в мкм) при увеличении x100 в 10-ти случайно отобранных полях зрения на микроскопе Leica DMRXA (Германия). Морфометрию выполняли с использованием программы ImageScore M (Россия). Повреждение тканей толстой кишки оценивали с помощью индекса повреждения тканей (tissue damage index, TDI), по шкале от 0 до 6 оценивалась относительная площадь повреждения, утолщение стенки кишки, ангиогенез, потеря бокаловидных клеток и наличие и уровень лейкоцитарной инфильтрации [19].

Этическая экспертиза

Содержание животных и выполнение манипуляций осуществляли согласно требованиям нормативных документов и Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Этическая экспер-

тиза — заключение этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России на проведение исследования (№ 11 от 27.12.2017 г.).

Статистический анализ

Для статистической обработки полученных результатов использовали программу IBM SPSS Statistics v.23 (США). Характеристики выборки представлены форматом 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 (Краскелла-Уоллиса, Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова). Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Статистически значимые отличия считали при p<0,01.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При экспериментальном ЯК у животных на 2-е сутки наблюдается дефицит массы тела, учащается дефекация, консистенция кала меняется на жидкую, примесь крови определяется как зрительная, так и с проведением бензидиновой пробы, на 4 и 6 сутки клинические признаки усугубляются. Индекс DAI на 2, 4 и 6 сутки статистически значительно увеличивался по мере нарастания клинических признаков. DAI прогрессивно увеличивается от 2 к 6 суткам наблюдения, его значение на 6-е сутки достоверно выше (p>0,01) по сравнению со 2-ми сутками (табл. 1).

Таблица 1

Индекс активности болезни в условиях применения витамина D₃ per rectum при экспериментальном ЯК (Me (Q1; Q3))

Группы животных	Сроки эксперимента	Кол-во животных	DAI, у.е.
Группа I		7	0
Группа II	2 сутки	7	7,00 (3,00;7,00)*
Группа II	4 сутки	7	8,00 (6,00;10,00) *
Группа II	6 сутки	7	11,00 (11,00;11,00)*
Группа III	2 сутки	7	5,00 (5,00;5,00)*
Группа III	4 сутки	7	4,00 (4,00;5,00)*#
Группа III	6 сутки	7	4,00 (4,00;4,00)*#

Примечание: * — статистически значимые различия (p<0,05) с группой 1; # — с группой 2.

При морфометрии на вторые сутки ЯК в образцах толстой кишки определялись язвы, дно которых расположено в собственной пластинке слизистой и в некоторых случаях в поверхностных отделах подслизистого слоя (рис. 1). В собственной пластинке слизистой и подслизистом слое клеточная инфильтрация, спровоцировавшая разрыхление и утолщение данных структур, отек межучточной ткани, венозное и капиллярное полнокровие с набуханием сосудистых стенок. Эпителий крипт в состоянии тяжелой белковой дистрофии. На четвертые сутки ЯК сохранялись язвенные дефекты в слизистой оболочке (рис. 2). В подслизистом слое венозное и капиллярное полнокровие с лейкостазом и лейкодиapedезом, плазматическое пропитывание и набухание сосудистых стенок, отек межучточной ткани, инфильтрация стромы. В глубине стенок язвенных дефектов пролиферация сохранившихся камбиальных клеток кишечных желез и крипт, эпителий которых в состоянии тяжелой белковой дистрофии, на поверхности — пролифе-

рация эпителия. Просветы кишечных желез расширены. На шестые сутки ЯК язвенные дефекты, с наложением клеточного детрита в виде бесструктурных мелкозернистых масс (рис. 3), выраженный отек и разрыхление межзубчатой ткани; венозное и капиллярное полнокровие с плазматическим пропитыванием сосудистых стенок. Между участками инфильтрации видны поля пролиферации юных веретеновидных фибробластов и начальные явления неангиогенеза. По краям язвенных дефектов выраженная эпителизация. В перифокальных зонах сохранялись дистрофические изменения слизистой оболочки, отек, укорочение крипт с инфильтрацией соединительнотканых прослоек и расширение их просвета.

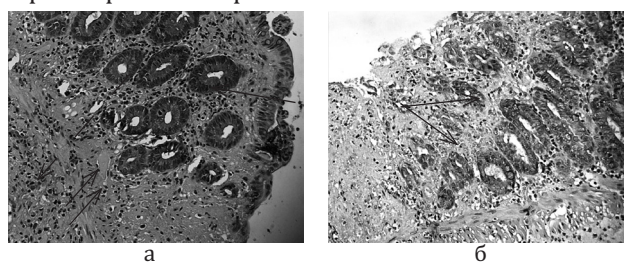


Рис. 1. Морфологические изменения в участке повреждения толстой кишки на вторые сутки ЯК: а) без лечения — дисконформация и укорочение крипт вследствие нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации (стрелки) межзубчатой ткани; утолщение собственной пластинки слизистой (двойная стрелка), распространение инфильтрата в подслизистый слой (пунктирная стрелка); ув. x 200; окр. гематоксилин-эозин; б) при применении витамина D₃ — в стенке язвенного дефекта нарушение архитектоники слизистой оболочки: укороченные крипты (стрелки) с расширенными просветами и белковой дистрофией эпителиальной выстилки; ув. x 200; окр. гематоксилин-эозин

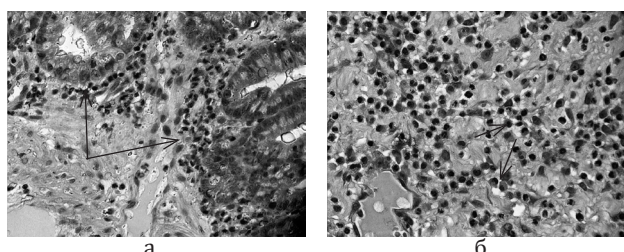


Рис. 2. Морфологические изменения в участке повреждения толстой кишки на 4 сутки ЯК: а) без лечения — нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация стромы (стрелки) вокруг крипт с примесью большого количества эозинофилов; ув. x 400; окр. гематоксилин-эозин; б) при применении витамина D₃ — пролиферирующие фибробласты (стрелки) на фоне нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации в подслизистом слое; ув. x 400; окр. гематоксилин-эозин

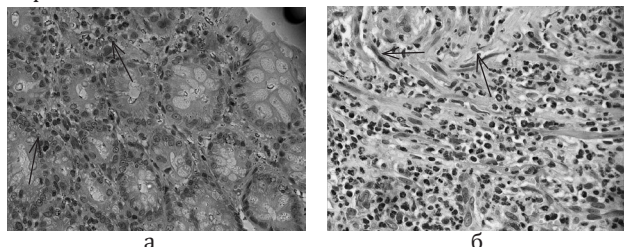


Рис. 3. Морфология участка повреждения на 6 сутки ЯК: а) без лечения — нейтрофильная инфильтрация соединительно-тканых прослоек (стрелки) между укороченными кишечными криптами в слизистой оболочке по краю язвенного дефекта; ув. x 400; окр. гематоксилин-эозин; б) при применении витамина D₃ — поля пролиферации фибробластов (стрелки) и фибриллогенез в грануляционной ткани в подслизистом слое; ув. x 400; окр. гематоксилин-эозин

Морфометрический анализ позволил установить, что на 2, 4 и 6 сутки экспериментального ЯК в участке повреждения толстой кишки на единицу площади увеличивается содержание НФ, ЛЦ, ЭФ, ПЦ, ГЦ и ФБ (табл. 2).

Площадь язвенного поражения и индекс повреждения тканей (TDI) увеличиваются на 2, 4 и 6 сутки наблюдения. В динамике ЯК в участке повреждения количество НФ на 4 сутки меньше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, а на 6 сутки без значимых изменений ($p > 0,01$) по сравнению с 4 сутками, но меньше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки; количество ЛЦ на 4 сутки без значимых изменений ($p > 0,01$) по сравнению со 2 сутками, а на 6 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 4 и 2 сутки; количество ЭФ на 4 сутки больше ($p < 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых изменений ($p > 0,01$) по сравнению с 4 сутками, но больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки; количество ГЦ на 4 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых изменений ($p > 0,01$) по сравнению с 4 сутками, но больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки; количество ПЦ на 4 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых изменений ($p > 0,01$) по сравнению с 4 сутками, но больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки; количество ФБ на 4 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 4 и 2 сутки. В процессе наблюдения экспериментального ЯК площадь язвенного поражения на 4 сутки не имеет значимых изменений ($p > 0,05$) по сравнению со 2 сутками, на 6 сутки не имеет значимых изменений ($p > 0,05$) по сравнению с 4 и 2 сутками. Показатели TDI колебались от 3 до 4, значимо не отличались ($p > 0,05$) на 4 сутки по сравнению со 2 сутками, на 6 сутки по сравнению с 4 и 2 сутками.

Как видно из таблицы 2, максимальная выраженность большей части морфометрических показателей зафиксирована на 4 и 6 сутки наблюдения, количество ЛЦ, ПЦ и ФБ увеличивается и достигает максимума на 6 сутки, максимальное количество ЭФ и ГЦ зафиксировано на 4 сутки наблюдения. Исключение составили нейтрофилы, максимальное количество которых зафиксировано на 2 сутки и постепенно снижается к 6 суткам.

В условиях локального применения витамина D₃ при экспериментальном ЯК наблюдалось изменение клинической картины у животных. Масса тела на фоне применения витамина D₃ не снижалась, каловые массы были более плотными, кровь в каловых массах определялась только в бензидиновой пробе, индекс DAI статистически значимо уменьшился на 4 и 6 сутки, а на 2 сутки уменьшился на правах тенденции (табл. 1). Независимо от снижения показатель DAI на 4 и 6 сутки значимо отличается от показателей в группе интактных животных, это значит, что произошедшее восстановление на фоне применения суппозитория с витамином D₃ per rectum при ЯК на данных сроках является частичным. Результаты динамического наблюдения говорят о том, что показатель DAI на 4 сутки не имеет значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению со 2 сутками, а на 6 сутки не имеет значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению с 4 и 2 сутками.

Морфометрические показатели очага повреждения толстой кишки в условиях применения витамина D₃ per rectum при экспериментальном ЯК (Ме (Q1; Q3))

Показатели	Группа I	Группа II 2 сутки	Группа II 4 сутки	Группа II 6 сутки	Группа III 2 сутки	Группа III 4 сутки	Группа III 6 сутки
n	7	7	7	7	7	7	7
НФ, 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)*#
ЛЦ, 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)*#
ЭФ, 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)*#
ГЦ, 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)*#
ПЦ, 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)*#
ФБ, 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)*#
Язвенный дефект, 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)*#
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)*#

Примечание. * — значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; # — с группой 2; ЛЦ — лимфоциты, НФ — нейтрофилы, ЭФ — эозинофилы; ГЦ — гистиоциты; ФБ — фибробласты, ПЦ — плазматические клетки.

Во время оценки изменений морфологии в стенке толстой кишки при ЯК в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D₃ на 2 сутки в исследованных образцах фиксировались язвенные дефекты в собственной пластинке слизистой оболочки (рис. 1). Собственная пластинка слизистой утолщена за счет разрыхления и набухания волокон, в подслизистом слое венозное и капиллярное полнокровие, умеренный отек межтканевой ткани. На соседних участках слизистая оболочка умеренно отечна, крипты укорочены, расширены. Эпителий кишечных желез в состоянии зернистой дистрофии. На 4 сутки выявлялись полностью эпителизированные участки замещения язвенных дефектов слизистой оболочкой примитивного строения с начальными этапами формирования кишечных желез и крипт, сохранялось утолщение собственной пластинки слизистой с очаговой инфильтрацией клетками гранулоцитарного ряда (рис. 2). Прослеживалась пролиферация молодых веретеновидных фибробластов, складывающихся в тяжи, распространяющиеся параллельно ходу волокон собственной пластики слизистой. В слизистой оболочке крипты дисконплексованы за счет инфильтрации соединительно-тканых прослоек, в подслизистом слое множественные диффузно-рассеянные участки инфильтрации. С поверхности язвенные дефекты укрыты многоядным столбчатым эпителием. На 6 сутки ЯК во всех образцах толстой кишки наблюдалась полная эпителизация язвенных дефектов (рис. 3). Собственная пластинка слизистой неравномерно утолщена, в подслизистом слое сохранялись очаговая инфильтрация и обширные поля веретеновидных пролиферирующих фибробластов. Новообразованные соединительно-тканые волокна тонкие, мало извитые, хаотично ориентированы. Новообразованные сосуды с дифференцированными стенками

и эндотелиальной выстилкой выявлялись в больших количествах. Цитоплазма эпителия кишечных желез зернистая, ядра с сохраненной поляризованностью, умеренно гиперхромные.

Результаты исследований морфометрии в участке повреждения толстой кишки при экспериментальном ЯК на фоне применения ректальных суппозиторий с витамином D₃ продемонстрированы в таблице 2. На 2 сутки наблюдения статистически значимо снижается количество НФ, ЛЦ, ЭФ и ПЦ, увеличивается количество ГЦ и ФБ. На 4 сутки статистически значимо снижается количество НФ, ЛЦ, ЭФ и ПЦ, увеличивается количество ФБ. На 6 сутки статистически значимо снижается количество НФ, ЛЦ, ЭФ и ПЦ, увеличивается количество ГЦ и ФБ. На фоне этого на все сутки исследования сокращается площадь язвенного поражения. Индекс TDI снижается на 4 и 6 сутки, что является отражением изменений морфометрических показателей.

В динамике экспериментального ЯК количество НФ в участке повреждения на 4 сутки без значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению со 2 сутками, а на 6 сутки без значимых отличий ($p > 0,01$) по сравнению с 4 и 2 сутками; количество ЛЦ на 4 сутки без значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению со 2 сутками, а на 6 сутки без значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению с 4 и 2 сутками; количество ЭФ на 4 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению с 4 сутками, но больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки; количество ГЦ на 4 сутки больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых отличий ($p > 0,05$) по сравнению с 4 сутками, но больше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки; количество плазматических клеток на 4 сутки меньше ($p > 0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых отличий ($p > 0,01$) по сравнению с 4 сутками, но меньше ($p > 0,01$), чем на 2 сут-

ки; количество ФБ на 4 сутки больше ($p>0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки больше ($p>0,01$), чем на 4 и 2 сутки. Площадь язвенного поражения на 4 сутки без значимых отличий ($p>0,01$) по сравнению со 2 сутками, на 6 сутки без значимых отличий ($p>0,01$) по сравнению с 4 и 2 сутками. Индекс повреждения тканей (TDI) на 4 сутки меньше ($p>0,01$), чем на 2 сутки, на 6 сутки без значимых отличий ($p>0,01$) по сравнению с 4 сутками, но меньше ($p>0,01$), чем на 2 сутки. Отметим, что каждый из исследуемых нами показателей морфометрии во все сутки эксперимента не достигал значений группы интактных животных, то есть произошедшее восстановление было частичным.

С помощью корреляционного анализа установлено наличие связей между показателем DAI и морфометрическими показателями в участке повреждения в динамике экспериментального ЯК в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D₃ (табл. 3). На 2 сутки наблюдения выявлены прямая сильная связь с индексом TDI, прямая связь средней силы с диаметром язвенного дефекта, отрицательная средней силы связь с количеством гистиоцитов. На 4 сутки зафиксированы отрицательная средней силы связь с количеством гистиоцитов, положительная средней силы связь с количеством плазмоцитов и размером язвенного дефекта, положительная сильная связь с индексом TDI. На 6 сутки выявлены положительная средней силы связь с количеством лимфоцитов и размером язвенного дефекта, отрицательная средней силы связь с количеством гистиоцитов и фибробластов, положительная сильная связь с индексом TDI и количеством плазмоцитов.

Таблица 3
Корреляция между индексом активности болезни (DAI, у.е.) и морфометрическими показателями при ЯК в условиях применения витамина D₃

Показатели	Показатели корреляции Группы 3 в различные сроки эксперимента		
	2 сутки	4 сутки	6 сутки
ЛЦ, ед./мм ²	R=0,34	R=0,22	R=0,55
НФ, ед./мм ²	R=0,20	R=0,24	R=0,18
ЭФ, ед./мм ²	R=0,24	R=0,15	R=0,15
ГЦ, ед./мм ²	R= - 0,58	R= - 0,52	R= - 0,56
ПЦ, ед./мм ²	R= 0,41	R= 0,58	R= 0,78
ФБ, ед./мм ²	R= - 0,38	R= - 0,35	R= - 0,55
Язв. дефект, мкм	R=0,54	R=0,58	R=0,69
TDI, у.е.	R=0,79	R=0,78	R=0,78

Примечание: приведены значения коэффициента корреляции Спирмена (R); полужирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

Нежелательные явления отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ

При экспериментальном ЯК, индуцированным оксазолоном, фиксируются клинические признаки (дефицит массы тела, появление жидкого стула с примесью крови) и морфологическая картина (язвенный дефект с лейкоцитарной инфильтрацией), характерные для данного заболевания, что позволяет применять данную модель для дальнейшего изучения патогенетических механизмов, а также для апробации новых терапевтических подходов. Ungaro R. et al полагают, что оксазол проявляет свойства гаптена, направляющего им-

мунный ответ по Th2-зависимому пути, что характерно для ЯК, который сопровождается повышением концентрации иммуноглобулинов (IgG, IgM) и цитокинов (IL-6, IL-8, TNF-α и др.) в крови, что приводит к накоплению в участке воспаления лейкоцитов, повреждению стенки кишки и расширению зоны вторичной альтерации [7].

Нами получен положительный эффект от применения оригинальных ректальных суппозиторий с витамином D₃ на клинические проявления по показателю DAI (стабилизация массы тела, изменение консистенции кала на более оформленный, отсутствие ректального кровотечения) и морфологическую картину участка повреждения, выражающийся в уменьшении инфильтрации стенки толстой кишки нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами и плазмоцитами, участвующими в альтерации стенки кишки, увеличении количества гистиоцитов и фибробластов — регуляторов и участников репарации соответственно.

Полагаем, что полученные результаты связаны с несколькими механизмами действия витамина D₃ при ЯК. В частности, витамин D₃ регулирует активность различных транскрипционных факторов, например, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), который известен как главный регулятор экспрессии антиоксидантных ферментов, что может опосредовать индукцию синтеза антиоксидантных ферментов и антиоксидантную защиту энтероцитов в условиях оксидативного стресса [20, 21, 22]. Витамин D₃ влияет на баланс Th1/Th17, Th2/Treg, участвующих в поддержании воспалительного процесса. Данный эффект реализуется посредством воздействия активного метаболита витамина D₃ кальцитриола на процессы дифференцировки Т-лимфоцитов — снижение пролиферации Th1 и Th17 за счет ингибирования IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, ИФН-γ и TNF-α, увеличение пролиферации Treg посредством стимуляции синтеза IL-10. Полагаем, что это приводит к восстановлению иммунологического профиля и снижению активности воспалительного процесса в толстой кишке [10, 11, 20, 21]. Имеются сведения о способности витамина D₃ тормозить миграцию макрофагов и выделение ими IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, что предотвращает прогрессирование воспалительного процесса и дальнейшую деструкцию слизистой оболочки толстой кишки. В частности, снижение синтеза IL-8 ограничивает накопление в стенке толстой кишки нейтрофилов, которые инициируют процессы свободно-радикального окисления. При воздействии на дендритные клетки витамин D₃ вызывает ингибирование транскрипции белков, для осуществления фагоцитирующей и антигенпрезентирующей функций, обеспечивая иммунологическую толерантность этих клеток, препятствует экспрессии TLR с подавлением продукции молекул CD40, CD80, CD83 и CD86 на поверхности, такие дендритные клетки, в свою очередь, производят меньше IL-2 и IFN-γ, больше выделяют IL-10 [23]. При взаимодействии с витамин-специфичными ядерными рецепторами эпителиоцитов толстой кишки (VDR) витамин D₃ влияет на увеличение экспрессии винкулина, зонулина (ZO-1 и ZO-2), окклюдина, клаудина — белков, модулирующих плотное соединение эпителиоцитов и проницаемость каналов между ними. Полагаем, что увеличение в участке повреждения количества гистиоцитов и фибробластов свидетельствует об активности процессов репарации в стенке кишки, способствует восстановлению целостности эпителиального барьера и, как следствие, уменьшению размеров язвенного дефекта.

Полученные результаты свидетельствуют об ассоциации клинических признаков с морфометрическими показателями участка повреждения в толстой кишке при экспериментальном ЯК в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D₃. Так, выраженность клинических проявлений ослабевает по мере снижения количества лимфоцитов в участке поражения на 6 сутки наблюдения, снижения количества плазмочитов на 4 и 6 сутки, уменьшения размера язвенного дефекта и снижения индекса повреждения тканей TDI на 2, 4 и 6 сутки, увеличения количества гистиоцитов на 2, 4 и 6 сутки, увеличения количества фибробластов на 6 сутки наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при экспериментальном оксазолон-индуцированном ЯК на 2, 4 и 6 сутки наблюдения зафиксированы клинические и морфологические признаки данного заболевания: повышается DAI, в стенке толстой кишки фиксируется язвенный дефект, увеличивается количество нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, плазмочитов, гистиоцитов, фибробластов и индекс повреждения ткани. Применение каждые 12 ч. оригинальных ректальных суппозиторий с витамином D₃ в суммарной дозе 18000 МЕ при экспериментальном ЯК приводит к максимальным эффектам на 4 и 6 сутки наблюдения к снижению выраженности клинических признаков и снижению пред-

ставительства в стенке толстой кишки клеток, участвующих в деструкции тканей, увеличению представительства клеток, опосредующих репарацию, что нашло отражение в уменьшении площади язвенного дефекта и индекса повреждения тканей. Установлено, что при экспериментальном ЯК в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D₃ выраженность клинических признаков ослабевает по мере снижения представительства в участке повреждения толстой кишки лимфоцитов и плазмочитов, уменьшения размера язвенного дефекта и снижения индекса повреждения тканей, увеличения представительства гистиоцитов и фибробластов. Полагаем, что полученные результаты обусловлены антиоксидантным и иммуностимулирующими эффектами витамина D₃ и являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований по уточнению механизма влияния витамина D₃ при ЯК и возможного применения в клинической практике.

Источник финансирования

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review / Molodecky N. A., Soon I. S., Rabi D. M. [et al.] // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 142 (1). – P. 46-54. – Doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001.
2. Kaplan, G. G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025 // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. – 2015. – Vol. 12 (12). – P. 720-727. – Doi:10.1038/nrgastro.2015.150.
3. Распространенность воспалительных заболеваний кишечника в Челябинской области / Долгушина А. И., Хусаинова Г. М., Василенко А. Г., Кононец В. А. // *Альманах клинической медицины*. – 2019. – № 47 (6). – С. 511-517. – Doi:10.18786/2072-0505-2019-47-066.
4. Сравнительная морфологическая, бактериологическая и иммунологическая характеристика индуцированного декстрансульфатом натрия острого язвенного колита у мышей Balb/c и C57BL/6 / Абдулаева С. О., Хомякова Т. И., Симонова Е. Ю. [и др.] // *Клин. и экспер. морфол.* – 2013. – № 4 (8). – С. 27-33.
5. Flightless I exacerbation of inflammatory responses contributes to increased colonic damage in a mouse model of dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis / Kopecki Z., Yang G., Treloar S. [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 12792. – Doi:10.1038/s41598-019-49129-6.
6. Ситкин, С. И. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии / Ситкин С. И., Вахитов Т. Я., Демьянова Е. В. // *Альманах клинической медицины*. – 2018. – № 46 (5). – С. 396-425. – Doi:10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425.
7. Ulcerative colitis / Ungaro R., Mehandru S., Allen P. B. [et al.] // *The Lancet*. – 2017. – Vol. 389 (10080). – P. 1756-1770. – Doi:10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
8. Yokoyama, Y. Granulomonocytapheresis as a cell-based therapy in an ulcerative colitis patient complicated by aminosalicylate-induced severe lymphocytopenia and pneumonia / Yokoyama Y., Kamikozuru K., Nakamura S. // *Cytotherapy*. – 2016. – Vol. 18 (9). – P. 1234-1236. – Doi:10.1016/j.jcyt.2016.05.016.
9. Клинические рекомендации российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению язвенного колита / Ивашкин В. Т., Шелыгин Ю. А., Халиф И. Л. [и др.] // *Колопроктология*. – 2017. – № 1 (59). – С. 6-30.
10. Драпкина, О. М. Плейтропные эффекты витамина D / Драпкина О. М., Шепель Р. Н. // *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*. – 2016. – № 12 (2). – С. 227-233. – Doi:10.20996/1819-6446-2016-12-2-227-233.
11. Мальцева, С. В. Витамин D и иммунитет / Мальцева С. В., Рылова Н. В. // *Практическая медицина*. – 2015. – № 1 (86). – С. 114-120.
12. Влияние витамина D₃ в составе оригинальных ректальных суппозиторий на показатели окислительной модификации белков в толстом кишечнике при экспериментальном язвенном колите / Осиков М. В., Симонян Е. В., Бойко М. С. [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2020. – № 170 (11). – С. 563-568. – Doi:10.47056/0365-9615-2020-170-11-563-568.
13. Симонян, Е. В. Концентрация IgG и IgM при экспериментальном язвенном колите в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D₃ / Симонян Е. В., Бойко М. С. // *Российский иммунологический журнал*. – 2019. – № 13 (22) (3). – С. 1280 – 1283.
14. Иммуностимулирующий эффект оригинальных ректальных суппозиторий с витамином D₃ в динамике экспериментального язвенного колита / Осиков М. В., Симонян Е. В., Бойко М. С., Богомолова А. М. // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2020. – № 6 (178). – С. 141-145. – Doi: 10.31146/1682-8658-esg-178-6-141-145.
15. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петербург, 2012.
16. IL-4 Receptor-Alpha Signalling of Intestinal Epithelial Cells, Smooth Muscle Cells, and Macrophages Plays a Redundant

- Role in Oxazolone Colitis / Hoving J. C., Keeton R., Höft M.A. [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2020. – 2020. – P. 4361043. – Doi:10.1155/2020/4361043.
17. Патент № 2019115328 Российская Федерация. Средство с витамином D3 для лечения язвенного колита в форме ректальных суппозиториях : 2019115328 заявл. 20.05.2019 : опубл. 17.12.2019 / Симонян Е. В., Осиков М. В., Бойко М. С., Бакеева А. Е. ; заявитель ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. – 11 с. : ил., табл. – Текст : непосредственный.
18. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD / Kim J. J., Shajib M. S., Manocha M. M., Khan W. I. // *Journal of visualised experiments.* – 2012. – Vol. 60 (60). – P. 3678. – Doi:10.3791/3678.
19. Dietary n 3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR γ /NFAT / Yao J., Lu Y., Zhi M. [et al.] // *Molecular medicine reports.* – 2017. – Vol. 16 (6). – P. 8315-8322. – Doi:10.3892/mmr.2017.7673.
20. Berridge, J. B. Vitamin D cell signalling in health and disease // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2015. – Vol. 460 (1). – P. 53-71. – Doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.008.
21. Activation of Nrf2-Antioxidant Signaling by 1,25-Dihydroxycholecalciferol Prevents Leptin-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Human Endothelial Cells / Teixeira T. M., Costa D. C., Resende A. C. [et al.] // *The Journal of Nutrition.* – 2017. – Vol. 147 (4). – P. 506-513. – Doi:10.3945/jn.116.239475.
22. Vitamin D protects human endothelial cells from H₂O₂ oxidant injury through the Mek/Erk-Sirt1 axis activation / Polidoro L., Properzi G., Marampon F. [et al.] // *J Cardiovasc Transl Res.* – 2013. – Vol. 6 (2). – P. 221-231. – Doi:10.1007/s12265-012-9436-x.
23. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3 / Jeffery L. E., Burke F., Mura M. [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183 (9). – P. 5458-5467. – Doi:10.4049/jimmunol.0803217.

Сведения об авторах

Осиков Михаил Владимирович, д.м.н., профессор
ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России,
г. Челябинск, Россия.
ORCID: 0000-0001-6487-9083
Email: prof.osikov@yandex.ru

Бойко Маргарита Сергеевна
ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России,
г. Челябинск, Россия.
ORCID: 0000-0002-4046-2424
Email: ri-tochka9@list.ru

Симонян Елена Владимировна, к. фарм. н., доцент
ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России,
г. Челябинск, Россия.

Ушакова Вера Алексеевна, к. фарм. н., доцент
ФГБОУ ВО «ЮУГМУ» Минздрава России,
г. Челябинск, Россия.
ORCID: 0000-0002-2157-3348
Email: va-ushakova@yandex.ru

Information about the authors

Mikhail V. Osikov, D.Sc (Medicine), Professor
South-Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russia.
ORCID: 0000-0001-6487-9083
Email: prof.osikov@yandex.ru

Margarita S. Boyko
South-Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russia.
ORCID: 0000-0002-4046-2424,
Email: ri-tochka9@list.ru

Elena V. Simonyan, PhD, Assistant Professor
South-Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russia.

Vera A. Ushakova, PhD, Assistant Professor
South-Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russia.
ORCID: 0000-0002-2157-3348
Email: va-ushakova@yandex.ru