

ДИНАМИКА ИММУННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В ОЧАГЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ НА ФОНЕ ОЗОНОТЕРАПИИ

Давыдова Е.В., Осиков М.В., Кайгородцева Н.В.

*ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Челябинск, Россия*

Резюме. Ключевыми звеньями патогенеза воспалительных заболеваний кишечника являются нарушение иммунорегуляции и формирование аутоиммунного профиля ответа по отношению к антигенам собственной кишечной микробиоты и воспалительно-измененным антигенам колоноцитов. Мультимодальные биологические эффекты озона являются основанием для применения локальной и системной озонотерапии в комплексном лечении практически любых воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Цель работы – изучить влияние внутрибрюшинной и ректальной озонотерапии на иммунные показатели очага повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите в динамике эксперимента.

Исследование проводили на 64 половозрелых крысах-самцах чистой линии Wistar массой 240 ± 20 г. Моделирование язвенного колита проводилось с помощью оксазолон (4-этоксиметилен-2-фенил-2-оксазолин-5-он) (Sigma-Aldrich, США). Озоно-кислородную смесь вводили внутрибрюшинно или ректально в концентрации 1,0-1,2 мг/л ежедневно, 1 раз в сутки, в объеме 10 мл, курс 6 дней.

Исходы эксперимента фиксировали на 2-е, 4-е и 6-е сутки. Концентрацию IL-17 и IL-23 определяли в гомогенате тканей кишечника (Bender Medsystems, Австрия) на анализаторе Personal LAB, экспрессию CD4 и FoxP3 на лимфоцитах кишечника иммуногистохимически (ElisaKit, China)

Повреждение тканей толстого кишечника в динамике оксазолон-индуцированного язвенного колита нарастало от 2-х к 6-м суткам. Общее количество лимфоцитов значимо увеличивалось в динамике экспериментального колита с параллельным снижением численности CD4⁺ лимфоцитов и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов. Концентрация IL-17 и IL-23 в тканях нарастала по мере выраженности воспалительных изменений в очаге повреждения.

Внутрибрюшинное введение озона значимо снизило уровень лимфоцитов в тканях очага поражения на 6-е сутки, с нормализацией количества CD4⁺ и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов к 6-м суткам. Уровни IL-17 и IL-23 нарастали от 2-х к 6-м суткам, с более низким значением IL-23 на 6-е сутки в сравнении с группой животных без лечения.

Ректальное введение ОКС привело к нормализации FoxP3-клеток на на 6-е сутки относительно интактных. Уровни провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-23 значимо снижались на 6-е сутки в

Адрес для переписки:

*Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Davydova Evgeniya V.
South Ural State Medical University
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (351) 232-73-71.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru*

Образец цитирования:

*Е.В. Давыдова, М.В. Осиков, Н.В. Кайгородцева
«Динамика иммунных изменений в очаге повреждения
при оксазолон-индуцированном язвенном колите на
фоне озонотерапии» // Медицинская иммунология,
2022. Т. 24, № 2. С. 379-388.
doi: 10.15789/1563-0625-ICA-2467
© Давыдова Е.В. и соавт., 2022*

For citation:

*E.V. Davydova, M.V. Osikov, N.V. Kaigorodtseva "Immune
changes at the injured sites in oxazolone-induced ulcerous
colitis: Influence of ozone therapy", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 2,
pp. 379-388.
doi: 10.15789/1563-0625-ICA-2467
DOI: 10.15789/1563-0625-ICA-2467*

сравнении с группой животных без лечения, что, вероятно, связано с проявлением противовоспалительных свойств у озона.

Ключевые слова: оксазолон, колит, гомогенат, IL-17, IL-23, Т-хелперы, Т-регуляторные лимфоциты

IMMUNE CHANGES AT THE INJURED SITES IN OXAZOLONE-INDUCED ULCEROUS COLITIS: INFLUENCE OF OZONE THERAPY

Davydova E.V., Osikov M.V., Kaigorodtseva N.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Impaired immunoregulation and development of autoimmune response to antigens of own intestinal microbiota and inflammation-altered antigens of colonic cells represent the key links in pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Multimodal biological effects of ozone presume the usage of local and systemic ozone therapy in complex treatment of many inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. The aim of our work was to study effects of intraperitoneal and rectal ozone therapy upon immune parameters of the lesion focus in oxazolone-induced ulcerative colitis in the course of time.

The study was carried out on 64 adult male inbred Wistar rats weighing 240 ± 20 g. Experimental ulcerative colitis was produced by oxazolone treatment (4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one) (Sigma-Aldrich, USA). The ozone-oxygen mixture was injected intraperitoneally or rectally at a concentration of 1.0-1.2 mg/l, once a day, in a volume of 10 ml, at the 6-day course.

The results of experiments were recorded on the days +2, +4 and +6. The concentrations of IL-17 and IL-23 was determined in a homogenate of intestinal tissues (Bender Medsystems, Austria) using a Personal LAB analyzer; expression of CD4 and FoxP3 on intestinal lymphocytes was determined by immunohistochemistry technique (ElisaKit, China).

The observed tissue damage of large intestine showed an increase from day 2 to day 6 of oxazolone-induced ulcerative colitis. The total number of lymphocytes significantly increased upon development of experimental colitis, with parallel decrease in the number of CD4⁺ lymphocytes and FoxP3-positive T lymphocytes. IL-17 and IL-23 concentrations in the tissues increased with the severity of inflammatory changes in the lesion focus. Intraperitoneal ozone administration was associated with significant reduction of lymphocyte contents in the damaged tissues on the 6th day, whereas the numbers of CD4⁺ and FoxP3 positive T lymphocytes normalized by the 6th day. The levels of IL-17 and IL-23 increased from day 2 to day 6, with a lower IL-23 values on day 6 as compared with non-treated animals. Rectal administration of ACS led to the normalization of FoxP3 cells on the 6th day to the values of intact animals. The levels of proinflammatory cytokines (IL-17 and IL-23) significantly decreased on the 6th day as compared to the group of animals without treatment, which could be due to anti-inflammatory properties of ozone.

Keywords: oxazolone, colitis, homogenate, IL-17, IL-23, T helpers, T regulatory lymphocytes

Введение

Современные эпидемиологические исследования указывают на неуклонный рост воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) в мире. В различных регионах земного шара частота встречаемости ВЗК имеет достаточную вариабельность от 21 до 268 случаев на 100 тыс. населения, в России составляет 20,4 на 100 тысяч населения [3]. Современные представления

об этиологии и факторах, способствующих развитию заболевания, предполагают совокупное влияние генетических, иммунологических и дисбиотических факторов. В основе патогенеза ВЗК, по мнению ряда авторов [4], лежит нарушение иммунорегуляции и формирование аутоиммунного профиля ответа по отношению к антигенам собственной кишечной микробиоты и воспалительно-измененным антигенам колоноцитов.

Одной из важнейших составляющих здорового кишечника является кишечно-ассоциированная лимфоидная ткань, которая обеспечивает регулируемую и интегрирующую роль между всеми компонентами кишечного барьера.

Изменение морфофункциональных свойств и функции кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани приводит к нарушению клеточной сигнализации, опосредованной дефектами распознавания патоген-ассоциированных молекулярных образов микроорганизмов (ПАМР) мембраносвязанными Toll-like-рецепторами (TLR), цитоплазматическими NOD-like-рецепторами и сенсорами вирусных РНК – RIG-like-рецепторами с последующим разворачиванием реакций иммунного реагирования [1]. Особую роль в поддержании аутовоспалительного компонента играет активация клеточных и гуморальных механизмов иммунного ответа, дисбаланс Th17/Treg [4, 5, 6].

Сложности в дифференциальной диагностике и верификации ВЗК, требующие инвазивных вмешательств и гистологического исследования материала, нередко затрудняют своевременное выявление заболевания.

Спектр терапевтических подходов к лечению данной патологии кишечника невелик и включает применение производных 5-аминосаляциловой кислоты, глюкокортикостероидов, системных иммунодепрессантов, селективных иммунобиологических ингибиторов рецепторов провоспалительных цитокинов, молекул адгезии, стимуляторов роста и дифференцировки иммунных клеток, целью которых является подавление эффекторного действия провоспалительных медиаторов на разных уровнях и этапах воспалительного процесса [2]. Применение последних позволяет значительно увеличить сроки ремиссии, однако эффективность данной терапии снижается спустя 2-3 года применения, а наличие системного иммуносупрессивного эффекта ассоциировано с повышением риска развития оппортунистических инфекций [2].

В связи с этим, поиск новых терапевтических подходов с высоким профилем безопасности, является приоритетным направлением исследований в этой области. На роль неспецифического противовоспалительного лечебного фактора может претендовать системное и локальное применение медицинского озона. Благодаря широкому диапазону биологических эффектов озона, включающих антиоксидантное, иммуномодулирующее, противовоспалительное, трофическое действие, хорошей совместимости с другими видами

терапии применение медицинского озона может занять достойное место в комплексном лечении ВЗК.

Цель работы – изучить влияние внутрибрюшинной и ректальной озонотерапии на иммунные показатели очага повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите в динамике эксперимента.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Постановка эксперимента проводилась в условиях экспериментально-биологической клиники ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Челябинск). Экспериментальное исследование выполнено на 91 половозрелой крысе-самце чистой линии Wistar массой 240 ± 20 г, находящейся в открытой системе при температуре $18-22$ °С, при естественном освещении, в свободном доступе к воде и корму. Животных содержали в открытой системе. Предварительно методом простой рандомизации животные были распределены на 4 группы: 1 ($n = 10$) – интактный контроль, 2 ($n = 27$) – животные с оксазолон-индуцированным язвенным колитом (ОИЯК), 3 ($n = 27$) – животные с ОИЯК в условиях внутрибрюшинного введения озонкислородной смеси (ОКС), 4 ($n = 27$) – животные с ОИЯК в условиях ректального введения ОКС. Разрешение на проведение исследований отражено в протоколе Этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России №4 от 22.05.2019 года.

Экспериментальное моделирование язвенного колита

Моделирование язвенного колита проводилось с помощью оксазолон (4-этоксиметил-2-фенил-2-оксазолин-5-он) (Sigma-Aldrich, США). Первый этап включал проведение накожной сенсибилизации путем локального воздействия 150 мкл 3%-ного спиртового раствора оксазолон на межлопаточную область животного. На втором этапе на 8-е сутки животным ректально вводили 150 мкл 3%-ного спиртового раствора оксазолон (оксазолон в растворе ацетона и оливкового масла в соотношении их 4:1) на глубину 7-8 см [3]. Для анестезии был применен препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид) (VirbacSanteAnimale, Франция) в дозе 20 мг/кг. Документирование наличия язвенного колита осуществляли с помощью морфологического исследования фрагментов тканей очага повреждения.

Проведение озонотерапии

Озонкислородную смесь получали на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона УОТА-60-01 «Медозон» производства ООО «Медозон», Москва. Забор озонкислородной смеси с установленной расчетной концентрацией озона 1,0-1,2 мг/л, соответственно средней массе животных, производился в пластиковый мешок, далее в шприц объемом 10 мл. Курс озонотерапии составил 6 суток.

Внутрибрюшинно ОКС вводили методом прокола передней брюшной стенки ежедневно, 1 раз в сутки, в объеме 10 мл.

Ректально ОКС применялась в виде ежедневных (1 раз в сутки) ректальных инфузий в объеме 10 мл, на глубину 7 см, с помощью центрального венозного катетера диаметром 1,4 мм (ОАО «Синтез», Курган) в предварительно освобожденную от фекальных масс ампулу прямой кишки.

Методы регистрации исходов эксперимента

Выведение животных из эксперимента проводили на 2-е, 4-е и 6-е сутки путем цервикальной дислокации. Для анестезии применяли препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамина гидрохлорид) (Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 20 мг/кг.

Отобранные фрагменты тканей толстого кишечника интактных и животных с ОИЯК помещали в маркированные гистологические кассеты и фиксировали 72 часа в 10% нейтральном формалине, с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Окрашенные срезы использовали для морфологической верификации на микроскопе PrimoStar (CarlZeiss, Германия), с морфометрической установкой Pro150ES (Pixera Corporation, USA). Повреждение тканей толстой кишки оценивали с помощью балльной системы подсчета гистологических изменений, специально разработанных для химически индуцированных ВЗК: 0 баллов – признаки воспаления отсутствуют; 1 – минимальный уровень воспаления с признаками очаговой инфильтрации клетками мононуклеарного ряда (1-2 очага); 2 – умеренно выраженные воспалительные изменения с множественными очагами инфильтрации; 3 – тяжелое воспаление с явлениями патологического ангиогенеза, отеком и утолщением стенок; 4 – максимально выраженные признаки воспалительных изменений с массивной лейкоцитарной инфильтрацией и потерей бокаловидных клеток [15].

Иммуногистохимическая оценка экспрессии CD4 и FoxP3 на лимфоцитах тканей толстого кишечника проводилась с использованием набора

специфических для крыс антител (ElisaKit, КИ-тай) и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (SuperFrostPlus). Постановка иммуногистохимической реакции проводилась в автоматическом иммуногистоштейнере BenchMarkXT (Ventana, США). Для визуализации применяли универсальную систему Ultra VIEW Universal DAB (Ventana, США). Докрашивание препаратов проводили Hematoxylin 2 (Ventana, США) с последующей дегидратацией и помещением под покровное стекло. При увеличении микроскопа $\times 400$ производился подсчет клеток с окрашенными в коричневый цвет ядрами и с более интенсивным окрашиванием ядершек на площади 1 мм^2 ткани толстого кишечника (ед/мм²).

Определение концентрации IL-23 и IL-17 проводили в гомогенатах образцов ткани толстой кишки с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB (Италия) с применением тест-систем для крыс фирмы Bender Medsystems (Австрия). Результаты выражали в пг/г белка. С целью стандартизации показателей расчет концентрации цитокинов проводили на 1 г белка.

Статистический анализ проводился с применением пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Значения показателей представлены в виде Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), где Me – медиана, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – нижний и верхний квартили соответственно. Сравнение групп производили, используя непараметрические критерии Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Значимыми, с учетом поправки Бонферрони, считали различия при $p \leq 0,02$.

Результаты

Повреждение тканей толстого кишечника в динамике оксазолон-индуцированного язвенного колита нарастало от 2-х к 6-м суткам и характеризовалось переходом от низкого уровня воспаления с очаговыми инфильтративными изменениями на 2-е сутки (1,2 (1,1; 1,3) балла) до умеренно выраженных изменений с множественными очагами повреждения слизистой на 4-е сутки (2,2 (2,1; 2,3) балла) и тяжелого воспаления стенки кишки на 6-е сутки (3,2 (3,1; 3,3) балла), с параллельным увеличением размеров язвенных дефектов, что является закономерным следствием оксазолоновой индукции воспалительного процесса в тканях толстого кишечника. Повторное ректальное введение оксазолон вызывает острый воспалительный процесс преимущественно в дистальных отделах толстого

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF FoxP3 IN MUCOSA OF THE LARGE INTESTINE IN EXPERIMENTAL COLITIS, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, ед./мм ² Parameter, item/mm ²	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 2-е сутки Group 2 ULNC 2 nd day (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 4-е сутки Group 2 ULNC 4 th day (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 6-е сутки Group 2 ULNC 6 th day (n = 10)
Лимфоциты Lymphocytes	26,2 (22,2-28,6)	31,4 (28,1-39,3)*	44,3 (38,9-49,3)*	73,9 (68,1-86,3)* # **
CD4 ⁺	12,3 (9,6-13,1)	11,6 (9,4-11,8)	9,8 (7,8-10,2)	8,2 (6,4-9,0)* #
FoxP3	3,5 (3,2-4,3)	3,4 (3,3-4,2)	2,8 (2,2-3,0)* #	2,4 (1,8-2,6)* #

Примечание. * – значимые, согласно критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,02$), различия с группой 1; # – с группой 2 (2-е сутки); ** – с группой 2 (4-е сутки).

Note. *, significant differences according to the Mann–Whitney criterion ($p \leq 0.02$) with group 1; #, with group 2 (2 days); **, with group 2 (4 days). ULNC, large intestine in experimental colitis.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ГОМОГЕНАТЕ ТКАНЕЙ ОЧАГА ПОВРЕЖДЕНИЯ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONCENTRATION OF SOME CYTOKINES IN SERUM IN EXPERIMENTAL COLITIS, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, пг/г белка Parameter, pg/g protein	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ОИЯК 2-е сутки Group 2 ULNC 2 nd day (n = 9)	Группа 2 ОИЯК 4-е сутки Group 2 ULNC 4 th day (n = 9)	Группа 2 ОИЯК 6-е сутки Group 2 ULNC 6 th day (n = 9)
IL-17	6,8 (5,2-7,0)	17,5 (15,8-18,4)*	34,3 (23,8-48,7)* #	56,9 (36,2-64,8)* #
IL-23	42,26 (38,8-49,6)	68,5 (59,4-74,2)*	85,7 (65,7-88,8)* #	98,7 (81,2-112,6)* #

Примечание. * – значимые, согласно критерию Манна–Уитни ($p \leq 0,02$), различия с группой 1; # – с группой 2 (2-е сутки).

Note. *, significant differences according to the Mann–Whitney criterion ($p \leq 0.02$) with group 1; #, with group 2 (2 days). ULNC, large intestine in experimental colitis.

кишечника. Гистопатологические изменения при прогрессировании колита характеризовались отеком подэпителиального пространства, инфильтрацией тканей мононуклеарными клетками, а также нейтрофилами, эозинофилами. Наблюдалось укорочение крипт, уменьшение числа бокаловидных клеток, плотности железистых элементов.

Количество инфильтрирующих слизистую оболочку толстого кишечника лимфоцитов значительно нарастало в динамике ОИЯК от 2-х к 6-м

суткам в сравнении с группой интактных животных (табл. 1). Численность CD4⁺ лимфоцитов и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов, напротив, одновременно значимо снижалась от 2-х к 6-м суткам.

Определение концентрации провоспалительных цитокинов в гомогенате толстого кишечника, играющих важную роль в формировании профиля иммунного ответа при ВЗК, показало значимое увеличение концентрации IL-17 и IL-23 в сравнении с интактными животными и

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ И ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОЧАГЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ОИЯК, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. CONTENT OF INDIVIDUAL SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN THE LESION FOCUS OF THE LARGE INTESTINE IN ULNC, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Parameter	Группа 1 Интактные Group 1 Intact	Группа 2 ОИЯК 2-е сутки Group 2 ULNC 2 nd day	Группа 2 ОИЯК 4-е сутки Group 2 ULNC 4 th day	Группа 2 ОИЯК 6-е сутки Group 2 ULNC 6 th day	Группа 3 ОИЯК внутри- брюшинно 2-е сутки Group 3 ULNC intra- peritoneal ozone 2 nd day	Группа 3 ОИЯК внутри- брюшинно 4-е сутки Group 3 ULNC intra- peritoneal ozone 4 th day	Группа 3 ОИЯК внутри- брюшинно 6-е сутки Group 3 ULNC intra- peritoneal ozone 6 th day	Группа 4 ОИЯК озон ректально 2-е сутки Group 4 ULNC ozone rectally 2 nd day	Группа 4 ОИЯК озон ректально 4-е сутки Group 4 ULNC ozone rectally 4 th day	Группа 4 ОИЯК озон ректально 6-е сутки Group 4 ULNC ozone rectally 6 th day
n	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Лимфоциты, ед./мм ² Lymphocytes, item/mm ²	26,2 (22,2-28,6)	31,4 (28,1-39,3)*	44,3 (38,9-49,3)*	73,9 (68,1-86,3)*	33,5 (29,6-37,8)*	42,3 (37,8-46,2)*	62,5 (54,6-65,2)* #	36,2 (30,1-39,2)*	42,8 (36,4-45,9)*	60,2 (55,6-66,8)* #
CD4 ⁺ , ед./мм ² CD4 ⁺ , item/mm ²	12,3 (9,6-13,1)	11,6 (9,4-11,8)	9,8 (7,8-10,2)	8,2 (6,4-9,0)*	10,9 (9,8-11,9)	9,7 (8,5-10,8)*	9,2 (9,0-11,2)* #	11,3 (9,6-12,0)	9,9 (8,8-11,6)*	9,6 (9,2-11,9)* #
FoxP3, ед./мм ² FoxP3, item/mm ²	3,5 (3,2-4,3)	3,4 (3,3-4,2)	2,8 (2,2-3,0)*	2,4 (1,8-2,6)*	3,3 (3,1-3,9)	3,0 (2,6-3,2)*	2,9 (2,7-3,2)* #	3,2 (3,0-3,8)	3,0 (2,7-3,3)*	3,1 (2,9-3,4)* #
IL-17, пг/г белка IL-17, pg/g protein	6,8 (5,2-7,0)	17,5 (15,8-18,4)*	34,3 (23,8-48,7)*	56,9 (36,2-64,8)*	18,9 (16,8-22,3)*	28,9 (24,3-32,6)*	44,3 (38,6-52,5)*	19,3 (15,0-23,1)*	27,9 (23,3-46,2)*	31,5 (28,9-41,5)* #
IL-23, пг/г белка IL-23, pg/g protein	42,26 (38,8-49,6)	68,5 (59,4-74,2)*	85,7 (65,7-88,8)*	98,7 (81,2-112)*	59,3 (50,1-62,1)*	67,4 (58,6-70,1)*	65,2 (58,6-78,9)* #	60,1 (52,3-69,5)*	68,9 (59,6-76,3)*	66,7 (57,1-79,2)* #

Примечание. * – значимые различия, согласно критерию Манна-Уитни ($p \leq 0,02$), с группой 1; # – с соответствующими сутками группы 2.

Note. * , significant differences according to the Mann-Whitney criterion ($p \leq 0.02$) with group 1; # , with the corresponding days of group 2. ULNC, large intestine in experimental colitis.

по мере нарастания воспалительных изменений в очаге повреждения (табл. 2).

Однократное ежедневное внутрибрюшинное введение ОКС на 2-е и 4-е сутки не привело к значимым изменениям численности лимфоцитов, инфильтрирующих ткани кишки и оставалось высоким в сравнении с интактными животными (табл. 3). На 6-е сутки зафиксировано снижение уровня лимфоцитов в тканях очага поражения в сравнении с аналогичным показателем группы 2, тем не менее оставаясь значимо высоким в сравнении с интактными животными. Количество CD4⁺ и FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов однонаправленно изменялось на фоне внутрибрюшинной озонотерапии и, начиная с 4-х суток наблюдения, значимо снижалось в сравнении с интактными животными, однако на 6-е сутки фиксировались более высокие показатели, чем в группе, не получающей лечения. Концентрация провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-23 значимо нарастала в динамике от 2-х к 6-м суткам, в сравнении с интактными животными, однако уровень IL-23 на 6-е сутки был значимо ниже в сравнении с показателем группы 2.

При ректальном введении ОКС со стороны общей численности лимфоцитов и CD4⁺ клеток зафиксированы аналогичные группе 3 изменения (табл. 3). Количество FoxP3-позитивных клеток значимо снижалось только на 4-е сутки, с нормализацией показателя относительно интактных – к 6-м суткам. Уровни провоспалительных цитокинов IL-17 и IL-23 нарастали от 2-х к 6-м суткам в сравнении с интактными животными, однако на 6-е сутки концентрация обоих цитокинов была значимо ниже, чем в группе 2, что, вероятно, связано с проявлением противовоспалительных свойств у озона.

Обсуждение

Наиболее часто для изучения острых и хронических воспалительных процессов кишечника в экспериментальных условиях находят применение химически индуцированные модели воспаления, сходные по иммунологическим и гистологическим проявлениям с ВЗК человека [1, 3]. Известно, что ректальное введение оксазолон индуцирует воспаление с формированием язвенных дефектов преимущественно в пределах собственной пластинки слизистой оболочки дистальных отделов толстого кишечника. Способность оксазолон связываться с эндогенными протеинами в слизистой оболочке позволяет рассматривать его в качестве гаптена, индуциру-

ющего воспалительный процесс в пределах кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани, преимущественно Th2- и TNK-типа [3].

Доказана связь воспалительных изменений слизистой оболочки толстого кишечника с дисбалансом Т-хелперов 1-го, 2-го и 17-го типов, а также минорной субпопуляции Т-регуляторных лимфоцитов (Treg), основными регуляторами дифференцировки которых являются соответственно транскрипционные факторы T-bet, GATA-3, ROR γ t и FoxP3 [1].

Отмечено, что Th17 при ВЗК способны индуцировать и поддерживать процессы локального воспаления за счет активации и рекрутирования в очаг воспаления нейтрофилов, принимать непосредственное участие в аутоиммунных реакциях [6]. Изучение нами концентрации IL-23 продиктовано его непосредственным участием в регуляции образования, дифференцировки Th0 в Th17, экспрессии IL-17, поскольку все продуцирующие интерлейкин-17 клетки имеют общую зависимость от IL-23 и транскрипционного фактора ROR γ t [5]. В динамике оксазолон-индуцированного повреждения толстого кишечника нами зафиксировано закономерное нарастание концентрации обеих цитокинов в гомогенате тканей, что объясняет непосредственное участие данных цитокинов в генерации и поддержании воспаления в толстом кишечнике. Именно IL-17 усиливает миелопоэз в костном мозге, стимулирует выработку гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (G-CSF), ответственен за рекрутинг нейтрофилов в ткани из кровотока, индукцию синтеза макрофагами хемокинов (IL-8), провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1 β , TNF α , фибробластами кишечника – матриксных металлопротеиназ [11]. В связи с этим IL-23 может выступать в качестве интегративного фактора, объединяющего реакции врожденного и адаптивного компартмента иммунной системы в патогенезе ВЗК. Кроме того, обнаруженные нами изменения цитокинов в гомогенате тканей могут служить предпосылками для формирования аутоиммунного профиля иммунного ответа в стенке толстого кишечника. Неким подтверждением данного предположения является значимое снижение в динамике ОИЯК количества в тканях очага повреждения FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов (Т-регуляторных клеток), что создает определенный фон для разворачивания аутоиммунных событий на фоне аутовоспалительных изменений в стенке толстого кишечника.

У человека ВЗК развиваются на фоне сочетания ряда этиопатогенетических факторов (генетических мутаций генов NOD2/CARD15, аутофагии Atg16l1, рецептора IL-23, дисбиоза, инфекций, стресса, нарушений питания) в совокупности вызывающих дисфункцию кишечного барьера и повышение его проницаемости. Последнее способствует транслокации микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в подслизистый слой, что сопровождается активацией иммунных клеток кишечного-ассоциированной лимфоидной ткани, изменением баланса Th17/Treg и продукцией цитокинов с последующим развитием хронического воспаления с аутоиммунным компонентом. Хронизация воспаления приводит к изменению антигенного репертуара колоноцитов, желез, микробиоты, что также способствует поддержанию и прогрессированию аутовоспалительных реакций. Сигнальная ось IL-33/ST2 (ST2 — растворимый стимулирующий фактор роста 2), ответственная за генерацию воспалительных реакций на измененный антигенный гомеостаз микробиоты, реализуется через экспрессию ST2 провоспалительными Т-клетками кишечника, при этом количество защитных ST2-экспрессирующих Treg, напротив, уменьшается [11, 12]. Дисбиотические изменения численности провоспалительных микроорганизмов могут способствовать активизации Т-клеток (Th17), вызывая у генетически восприимчивых индивидуумов Th17-опосредованный аутоиммунный ответ [11].

Применение внутрибрюшинного и ректального способа введения ОКС в лечении ОИЯК показало в целом положительное действие озона и продуктов озонлиза на динамику изучаемых иммунных показателей, характеризующееся значимым, менее выраженным снижением общего числа лимфоцитов и CD4⁺ клеток на 6-е сутки, более низкими уровнями IL-17 и IL-23 на 6-е сутки на фоне озонотерапии в сравнении с аналогичными показателями группы 2, которым не проводилось лечение. Также показано, что содержание FoxP3-позитивных Т-лимфоцитов на 6-е сутки в группе 4, получающей озон в виде ректальных инсуффляций, достигло значений интактной группы животных. Указанные положительные эффекты озонотерапии могут быть обусловлены мультимодальными свойствами молекулы озона [7, 9, 14]. Опираясь на данные литературы, можно констатировать, что поступление озона в организм приводит сначала к умеренному окислительному стрессу, прежде всего за счет вза-

имодействия с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) и водой, образования АФК, липоперекисей, гидроперекисей, изопростанов, озонидов, 4-гидроксиноненаля и других соединений, с последующей мощной активацией антиоксидантных систем клетки. Вполне вероятно, этим можно объяснить несколько отсроченный (на 6-е сутки) положительный эффект озонотерапии, зависящий от активации транскрипционного редокс-фактора Nrf2 и последующим повышением синтеза и активности ферментов антиоксидантной защиты, в частности глутатионтрансферазы [8]. Иммуномодулирующие и противовоспалительные эффекты озона связаны с блокадой активации NF-κB-зависимых путей [13] и последующим снижением синтеза провоспалительных цитокинов, что нами и было продемонстрировано. Озон способен снижать синтез простагландинов, индуцировать синтез протекторных протеинов семейства белков теплового шока, матриксных металлопротеиназ, чем проявляет свои противовоспалительные свойства [13, 14].

Снижение интенсивности воспалительных реакций привело к восстановлению численности Т-регуляторных клеток, что снижает вероятность возникновения аутоиммунных реакций.

Заключение

Способность оксазолон активировать механизмы врожденного иммунитета реализуется на основе альтеративного повреждения химическим агентом эпителия слизистой оболочки толстой кишки. Ректальное введение оксазолон индуцирует воспаление с формированием язвенных дефектов преимущественно в пределах собственной пластинки слизистой оболочки дистальных отделов толстого кишечника, что делает данную модель максимально приближенной к проявлениям язвенного колита у людей.

Применение озонотерапии при оксазолон-индуцированном язвенном колите обнаруживает противовоспалительное действие озона и его дериватов, обусловленное антиоксидантными и ограничивающими активностью клеток в отношении продукции активных радикалов кислорода свойствами, а также способностью модулировать синтез провоспалительных цитокинов, что приводит к уменьшению интенсивности вторичной альтерации в очаге повреждения толстого кишечника и снижает вероятность развертывания аутоиммунных реакций в стенке кишки, в том числе за счет нормализации количества Т-регуляторных клеток

Список литературы / References

1. Жеребятьев А.С., Камышный А.М. Транскрипционные регуляторы дифференцировки Т-лимфоцитов и паттернраспознающие рецепторы – экспрессия лимфоцитами кишечника при оксазолоновом колите у крыс и после введения ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А-редуктазы и антагониста рецепторов интерлейкина-1 // Иммунология, 2015. Т. 36, № 3. С. 139-144. [Zherebyatiev A.S., Kamyshnyi A.M. Transcriptional regulators of T-lymphocyte differentiation and pattern recognition receptors – expression by intestinal lymphocytes in oxazolone colitis in rats and after administration of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase and an antagonist of interleukin-1 receptors. *Immunologiya = Immunologiya*, 2015, Vol. 36, no. 3, pp. 139-144. (In Russ.)]
2. Лазебник Л.Б., Парфенов А.И., Князев О.В., Конопляников А.Г., Сагынбаева В.Э., Яковлева М.В., Астрелина Т.А., Ручкина И.Н., Щербakov П.Л., Трубицына И.Е., Царегородцева Т.М., Гудкова Р.Б., Рогозина В.А., Чикунова Б.З., Хомерики С.Г., Михайлова З.Ф. Биологическая терапия воспалительных заболеваний кишечника // ЭИКГ, 2011. № 3. С. 42-53. [Lazebnik L.B., Parfenov A.I., Knyazev O.V., Konoplyannikov A.G., Sagynbaeva V.E., Yakovleva M.V., Astrelina T.A., Ruchkina I.N., Shcherbakov P.L., Trubitsyna I.E., Tsaregorodtseva T.M., Gudkova R.B., Rogozina V.A., Chikunova B.Z., Khomeriki S.G., Mikhailova Z.F. Biological therapy of inflammatory intestinal diseases. *EiKG = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2011, no. 3, pp. 42-53. (In Russ.)]
3. Осиков М.В., Симонян Е.В., Листик Е.В., Бакеева А.Е., Бивалькевич В.А. Воспалительные заболевания кишечника: выбор оптимальной экспериментальной модели // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26524>. [Osikov M.V., Simonyan E.V., Listik E.V., Bakeeva A.E., Bivalkevich V.A. Inflammatory bowel diseases: the choice of the optimal experimental model. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 3. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26524>. (In Russ.)]
4. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии // Альманах клинической медицины, 2018. Т. 46, № 5. С. 396-425. [Sitkin S.I., Vakhitov T.Ya., Demyanova E.V. Microbiome, colon dysbiosis and inflammatory bowel disease: when function is more important than taxonomy. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2018, Vol. 46, no. 5, pp. 396-425. (In Russ.)]
5. Ткачев А.В., Мкртчян Л.С., Беловолова Р.А., Девликамова Т.А. Диагностическая значимость иммунологических маркеров при различных формах язвенного колита // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2019. Т. 14, № 2. С. 334-338. [Tkachev A.V., Mkrtychyan L.S., Belovolova R.A., Devlikamova T.A. Diagnostic value of immunological markers in various forms of ulcerative colitis. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of North Caucasus*, 2019, Vol. 14, no. 2, pp. 334-338. (In Russ.)]
6. Третьякова Ю.И. Особенности иммуновоспалительного синдрома у пациентов с язвенным колитом в зависимости от тяжести атаки заболевания // Пермский медицинский журнал, 2018. Т. 35, № 4. С. 39-45. [Tretyakova Yu.I. Features of the immune-inflammatory syndrome in patients with ulcerative colitis, depending on the severity of the disease attack. *Permskiy meditsinskiy zhurnal = Perm Medical Journal*, 2018, Vol. 35, no. 4, pp. 39-45. (In Russ.)]
7. Bai Z., Li X., Liu Y., Deng J., Wang Ch., Li Y., Qi X. Successful treatment of acute-on-chronic liver failure and hemolytic anemia with hepato-protective drugs in combination with intravenous ozone without steroids: A case report. *Intractable Rare Dis. Res.*, 2018, Vol. 7, no. 3, pp. 204-208.
8. Bocci V., Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front. Chem.*, 2015, Vol. 3, 4. doi: 10.3389/fchem.2015.00004.
9. Clavo B.N., Santana-Rodríguez P., Llontop P., Gutiérrez D., Suárez G., López L., Rovira G., Martínez-Sánchez G., González E., Jorge I.J., Perera C., Blanco J., Rodríguez-Esparragón F. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: is further research warranted? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2018, Vol. 2018, 7931849. doi: 10.1155/2018/7931849.

10. Kim Y.M., Pae H.O., Park J.E., Lee Y.C., Woo J.M., Kim N.-H., Choi Y.K., Lee B.-S., Kim S.R., Chung H.-T. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*, 2011, Vol. 14, no. 1, pp. 137-167.
11. Lamas B., Richard M.L., Leducq V., Pham H.P., Michel M.L., Da Costa G., Bridonneau C., Jegou S., Hoffmann T.W., Natividad J.M., Brot L., Taleb S., Couturier-Maillard A., Nion-Larmurier I., Merabtene F., Seksik P., Bourrier A., Cosnes J., Ryffel B., Beaugerie L., Launay J.M., Langella P., Xavier R.J., Sokol H. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 6, pp. 598-605.
12. Lee Y.K., Mazmanian S.K. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, 2010, Vol. 330, no. 6012, pp. 1768-7173.
13. Manoto S.L., Maera M.J., Motaung S.K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 4, pp. 672-679.
14. Orakdogan M., Uslu S., Emon S.T., Somay H., Meric Z.C., Hakan T. The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery. *Turk. Neurosurg.*, 2016, Vol. 26, no. 6, pp. 860-865.
15. Wirtz S., Neufert C., Weigmann B., Neurath M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.*, 2007, Vol. 2, no. 3, pp. 541-600.

Авторы:

Давыдова Е.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Кайгородцева Н.В. — ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Kaigorodtseva N.V., Assistant Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 05.01.2022
Отправлена на доработку 13.02.2022
Принята к печати 22.02.2022

Received 05.01.2022
Revision received 13.02.2022
Accepted 22.02.2022