

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.348-002.44-085.243:615.356

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 суппозиториях

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ), 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

Цель – изучение влияния витамина D₃ в составе оригинальных ректальных суппозиториях на выраженность острофазового ответа при экспериментальном язвенном колите

Методика. Эксперимент выполнен на 49 половозрелых крысах-самцах Wistar. Язвенный колит (ЯК) моделировали двухэтапным (накожным, а затем ректальным) применением 3% спиртового раствора оксазолон. Оригинальные суппозитории на основе смеси полиэтиленгликолей массой 300 мг, содержащие 1500 МЕ витамина D₃, вводили *per rectum* каждые 12 ч в течение 6 сут. Исследования проводили на 2-е, 4-е и 6-е сут заболевания. Клиническую картину оценивали по адаптированной для крыс шкале Disease activity index (DAI) с учетом массы тела, консистенции и наличия крови в каловых массах. Количество лейкоцитов и нейтрофилов определяли на гематологическом анализаторе и в мазках крови. Функциональную активность нейтрофилов исследовали по поглощению частиц монодисперсного латекса в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте. Концентрацию в сыворотке крови С-реактивного белка (С-РБ), IL-6 и IL-8 определяли с помощью иммуноферментного анализа, экспрессию TNF-α в стенке толстой кишки – иммуногистохимическим методом.

Результаты. При экспериментальном ЯК на 2-е, 4-е и 6-е сут наряду с прогрессирующим повышением DAI зафиксированы изменения показателей острофазового ответа (ОФФ): увеличивается экспрессия в толстой кишке TNF-α с максимальным уровнем на 4-е и 6-е сут, повышается концентрация в сыворотке крови IL-6 с максимальным уровнем на 4-е, IL-8 – на 6-е сут; в сыворотке возрастает концентрация С-РБ максимально на 6-е сут, в крови увеличивается общее количество лейкоцитов, число палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов с максимальным уровнем на 2-е и 4-е сут. Возрастает поглотительная и НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови с максимальными значениями на 4-е и 6-е сут эксперимента. Применение при экспериментальном ЯК ректальных суппозиториях с витамином D₃ приводит на 4-е и 6-е сут наблюдения к снижению DAI, экспрессии TNF-α в толстой кишке и количества нейтрофилов, на 2-е, 4-е и 6-е сут – к уменьшению концентрации IL-6 и С-РБ в сыворотке, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, на 6-е сут – к снижению концентрации IL-8 в сыворотке и общего количества лейкоцитов в крови.

Заключение. Применение при экспериментальном ЯК оригинальных ректальных суппозиториях с витамином D₃ приводит к снижению индекса активности болезни. Выраженность клинических проявлений ослабевает по мере снижения экспрессии в кишке TNF-α, снижения концентрации в сыворотке IL-6, количества в крови лейкоцитов и нейтрофилов, уменьшения НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов.

Ключевые слова: язвенный колит, витамин D₃, ответ острой фазы, IL-8, IL-6, TNF-α, С-реактивный белок

Для цитирования: 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 суппозиториях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 80-88.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.80-88

Для корреспонденции: Осиков Михаил Владимирович, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Участие авторов: Осиков Михаил Владимирович — концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; Бойко Маргарита Сергеевна — набор экспериментального материала, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, написание текста.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Osikov M.V., Boyko M.S., [Simonyan E.V.](#)**Severity of the acute phase response in experimental ulcerative colitis under conditions of the use of vitamin D3 in a novel rectal suppository**

South Ural Medical University,
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

Aim. To study the effect of vitamin D3 in rectal suppositories on severity of the acute phase response (APR) in experimental ulcerative colitis (UC).

Methods. Experiments were performed on 49 mature male Wistar rats. UC was induced by cutaneous followed by rectal applications of a 3% oxazolone alcohol solution. Novel polyethylene glycol suppositories (300 mg) containing 1500 IU of vitamin D3 were injected *per rectum* every 12 hrs for 6 days. Data were collected on days 2, 4, and 6 of UC. The clinical picture was assessed according to the Disease Activity Index (DAI) scale adapted for rats, taking into account body weight, consistency of, and the presence of blood in the feces. The number of blood leukocytes and neutrophils was determined on a hematological analyzer and in blood smears. The functional activity of neutrophils isolated from the blood was evaluated by the absorption of monodisperse latex particles and with the spontaneous and induced NBT test. Serum concentrations of C-reactive protein (CRP), IL-6 and IL-8 were measured by enzyme immunoassay. TNF- α expression in the colon wall was measured by an immunohistochemical method.

Results. The following changes in APR variables along with a progressive increase in DAI were recorded on days 2, 4, and 6. Expression of colon TNF- α increased, with maximal values on days 4 and 6. Serum IL-6 increased and reached a maximal value on day 4; and serum IL-8 increased, with a maximum on day 6. Serum CRP increased, with a maximum on day 6. The total number of blood leukocytes and the number of stab and segmented neutrophils increased, with maximal values on days 2 and 4. The absorption and NBT-reducing ability of blood neutrophils increased, with maximal values on days 4 and 6. The use of rectal suppositories with vitamin D3 in experimental UC resulted in decreases in DAI, colon TNF- α expression, and the number of blood neutrophils on days 4 and 6; decreases in serum concentrations of IL-6 and CRP, and the absorption and NBT-reducing ability of blood neutrophils on days 2, 4, and 6; and decreases in the serum concentration of IL-8 and in the total number of blood leukocytes on day 6. Severity of clinical manifestations was alleviated with decreases in the expression of colon TNF- α , the serum concentration of IL-6, the number of blood leukocytes and neutrophils, and the NBT-reducing ability of neutrophils decreases.

Conclusion. Application of the original rectal suppositories with vitamin D3 every 12 hours in experimental UC leads to a decrease in the disease activity index. The severity of clinical manifestations weakens as TNF- α expression, serum IL-6 concentration, number of leukocytes and neutrophils in blood, and decrease of neutrophil NBT-reducing capacity decrease.

Keywords: ulcerative colitis; vitamin D3; acute phase response; IL-8; IL-6; TNF- α ; C-reactive protein

For citation: Osikov M.V., Boyko M.S., [Simonyan E.V.](#) The severity of the response of the acute phase in experimental ulcerative colitis in conditions of the use of vitamin D3 in the original rectal suppositories. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2021; 65(4): 80-88.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.80-88

For correspondence: **Mikhail V. Osikov**, head. Department of Pathological Physiology, FSBEI HE SUSMU, Ministry of Health of Russia, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Contribution: Osikov M.V. — concept and design of the study, analysis of the data obtained, writing the text, editing the manuscript; Boyko M.S. — a set of experimental material, statistical data processing, analysis of the data obtained, writing a text.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Information about the authors:

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-908>

Boyko M.S., <https://orcid.org/0000-0002-4046-2424>

Received 10.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Введение

Болезнь Крона и язвенный колит (ЯК) характеризуются хроническим воспалением в стенке желудочно-кишечного тракта в результате дисбаланса врожденного и адаптивного иммунного ответа на микробиом кишечника и триггеры окружающей среды в генети-

чески предрасположенном организме [1-4]. Иницирующим этапом патогенеза ЯК является повреждение стенки толстой кишки, которое приводит к активации макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, эндотелиоцитов и др. клеток, повышению синтеза и секреции IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- γ и др. провоспалительных цитокинов, запускающих острофазный ответ (ОФ)

[5, 6]. Ключевыми проявлениями ООФ выступают активация синтеза в печени и увеличение концентрации в крови С-реактивного белка (С-РБ) и др. белков ООФ, стимуляция миелоидного ростка костного мозга с увеличением количества и активности нейтрофилов в крови и др. признаки. Ряд показателей ООФ, в частности уровни С-РБ, IL-6 выступают в качестве диагностических и прогностических маркеров при ЯК [2].

Используемые в настоящее время консервативные терапевтические подходы при ЯК (производные 5-аминосалицилатов, глюкокортикоиды, иммуносупрессоры, биологические методы) вызывают тяжелые побочные эффекты, ограничивающие их применение у трети больных, кроме того они, с учетом пожизненного назначения, весьма затратные, что является предпосылкой для поиска альтернативных, патогенетически обоснованных методов лечения [7]. Витамин D₃ продемонстрировал свои положительные эффекты при таких аутоиммунных заболеваниях как сахарный диабет I типа, ревматоидный артрит, псориаз [8]. Рецептор витамина D₃ (VDR) широко представлен в эпителиоцитах толстой кишки [9]. Содержание витамина D₃ в сыворотке крови, а также экспрессия рецептора витамина D₃ в слизистой толстой кишки у больных ЯК ниже, чем у здоровых, оба показателя отрицательно коррелируют с активностью ЯК [10]. При экспериментальных колитах различной этиологии дефицит витамина D или нокаут гена VDR приводят к тяжелому течению заболевания, а пероральное применение витамина D₃ уменьшает тяжесть заболевания [11]. Концентрация в сыворотке крови при ЯК одного из ключевых маркеров ООФ – С-реактивного белка (С-РБ) имеет обратную корреляционную связь с концентрацией в сыворотке крови витамина D₃ [10]. В РФ отсутствуют лекарственные формы с витамином D₃, локально воздействующие на участок поврежденной толстой кишки при ЯК, что явилось предпосылкой для разработки оригинальных ректальных суппозиториях [12]. Ранее нами продемонстрировано антиоксидантное действие витамина D₃ в составе ректальных суппозиториях при ЯК за счет снижения содержания в стенке толстой кишки продуктов перекисного окисления липидов и продуктов окислительной модификации белков [13, 14]. **Цель работы** – изучить влияние витамина D₃ в составе оригинальных ректальных суппозиториях на выраженность острофазового ответа при экспериментальном ЯК.

Методика

Эксперимент выполнен на 49 крысах-самцах Wistar массой 215-245 г. Работа проводилась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по содержа-

нию, уходу и выводу из эксперимента лабораторных животных [15]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ (протокол №11 от 27.12.2017). Животные случайным образом были разделены на 3 группы: 1-я группа (n=7) – интактный контроль, 2-я (n=21) – животные с ЯК; 3-я (n=21) – животные с ЯК в условиях применения *per rectum* витамина D₃ каждые 12 ч до выведения крыс из эксперимента на 6-е сут. Анестезию проводили путем внутримышечного введения препарата «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид, «Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 20 мг/кг. ЯК моделировали двухэтапным применением 150 мкл 3% спиртового раствора оксазолон («Sigma-aldrich», США): на первом этапе путем нанесения на кожу между лопаток, на втором – введением *per rectum* на глубину 7-8 см [16]. Верификацию ЯК проводили клиническими и морфологическими методами исследования. Суппозитории изготавливали на основе 10% водного раствора витамина D₃ с использованием смеси полиэтиленгликолей различной молекулярной массы, эмульгатора Т-20, кремофора RH-40 и колифора Р 407. Размер и форма суппозитория соответствовали особенностям строения дистального отдела толстой кишки крыс, конечная масса каждого суппозитория составляла 300 мг, содержание витамина D₃ в каждом суппозитории 1500 МЕ [12]. Клинический статус оценивали, используя шкалу активности болезни (Disease activity index, DAI) адаптированную для крыс, показатели включают массу тела, консистенцию стула и наличие крови в каловых массах. Каждый критерий оценивали по шкале от 0 до 4, баллы суммировали, минимальное значение индекса – 0, максимальное – 12 [17]. Оценку в крови общего количества лейкоцитов выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора для ветеринарии «BC-2800Vet» («Mindray», Китай), откалиброванного для крови крыс, лейкоцитарную формулу определяли путем подсчета клеток в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Нейтрофилы выделяли из цельной крови на градиенте плотности стерильных растворов фикола («Pharmacia», Швеция) и верографина («Sofa», Чехия). О функциональной активности нейтрофилов крови судили по поглощению частиц монодисперсного полистирольного латекса с оценкой активности фагоцитоза, фагоцитарного числа, по кислородзависимому метаболизму в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в спонтанном и индуцированном режимах с подсчетом активности и интенсивности НСТ-теста [18]. На автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с использованием специфических тест-систем

для крыс фирмы «Cloud-Clon Corp.» (Китай) в сыворотке крови определяли концентрацию интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-6 (IL-6) и С-РБ, результат выражали в пг/мл. Иммуногистохимически оценивали экспрессию TNF- α в стенке толстой кишки с использованием наборов специфических для крыс антител «Cloud-Clon Corp.» (Китай) и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (Super Frost Plus), результат выражали в ед/мм².

Полученные данные обрабатывали, используя программу «IBM SPSS Statistics v.23» (США). Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q1; Q3)», где Me – медиана, Q1 и Q3 – значения нижнего и верхнего квартиля соответственно. Для оценки значимости различий между двумя группами использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова при условии, что межгрупповые различия значимы по критерию Краскела-Уоллиса. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,01$.

Результаты исследования

При экспериментальном ЯК у животных на 2-е сут наблюдения отмечалось снижение массы тела, увеличение числа дефекаций, консистенция кала становилась жидкой с присутствием крови, определяемой визуально и в бензидиновой пробе. На 4-е и 6-е сут клинические признаки усугублялись, кроме этого, у крыс снижалась двигательная активность, уменьшалось число подходов к пище и воде. Клиническая картина подтверждается статистически значимым увеличением индекса DAI на 2-е, 4-е и 6-е сут. DAI прогрессивно увеличивается от 2-х к 6-м сут наблюдения, значение DAI на 6-е сут статистически значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 2-е сут (табл. 1).

При экспериментальном ЯК на 2-е, 4-е и 6-е сут зафиксировано статистически значимое увеличение экспрессии TNF- α в толстой кишке. В динамике ЯК экспрессия TNF- α на 4-е сут значимо выше, чем на 2-е, а на 6-е не отличается от показателя 4-х сут. Как видно из табл. 2, максимальная экспрессия TNF- α в толстой кишке фиксируется на 4-е и 6-е сут. Исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови выявило статистически значимое увеличение уровня IL-6 и IL-8 на 2-е, 4-е и 6-е сут экспериментального ЯК (табл. 2). Концентрация в сыворотке крови IL-6 на 4-е и 6-е сут значимо выше, чем на 2-е сут наблюдения, концентрация IL-8 остается стабильно высокой на всех сроках наблюдения.

Исследование С-РБ в сыворотке крови выявило статистически значимое его увеличение у крыс 2-й группы на всех сроках наблюдения. Уровень С-РБ прогрессивно возрастает с достижением максимальных значений к 6-м сут эксперимента. В динамике развития ЯК статистически значимо увеличивается общее количество лейкоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов (табл. 3). Количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов постепенно снижается к 6-м сут эксперимента: на 4-е сут существенно не отличается от 2-х сут, на 6-е ниже, чем на 2-е и 4-е сут наблюдения. Исследование поглотительной способности нейтрофилов выявило значимое повышение активности фагоцитоза и фагоцитарного числа на 2-е, 4-е и 6-е сут ЯК. В динамике ЯК активность фагоцитоза на 4-е сут значимо не отличается от 2-х сут, на 6-е сут существенно не отличается от 4-х и 2-х сут, фагоцитарное число на 4-е сут значимо ниже, чем на 2-е сут, на 6 сут не отличается от 2 сут, но несколько выше, чем на 4-е сут. НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов крови в спонтанном режиме увеличивается на 2-е, 4-е и 6-е сут ЯК по показателю активности НСТ-теста, на 4-е

Таблица 1/ Table 1

Влияние витамина D₃ в составе ректальных суппозиториях на индекс активности болезни (DAI, у.е.) при экспериментальном ЯК (Me (Q₁; Q₃))

The effect of vitamin D3 in the composition of rectal suppositories on the disease activity index (DAI, cu) in experimental UC (Me (Q1; Q3))

Группа I Group I	Группа 2/Group II			Группа 3/Group III		
	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day
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) *, **

Примечание. ** – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; ** – с группой 2.

Note. * – statistically significant differences ($p < 0,01$) with group 1; ** - with group 2.

и 6-е сут — по показателю интенсивности НСТ-теста; в индуцированном режиме активность и интенсивность НСТ-теста значимо увеличиваются на 2-, 4- и 6-е сут исследования. В динамике наблюдения активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста на 6-е сут значимо выше чем на 2-е и 4-е сут, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста на 4-е сут значимо выше, чем на 2-е и 6-е сут.

Применение витамина D₃ в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном ЯК приводило к изменению клинической картины у животных. Масса тела не снижалась, каловые массы были более оформленными, кровь в каловых массах определялась только в бензидиновой пробе. Указанные изменения нашли отражение в показателе DAI, который статистически значимо уменьшался на 4-е и 6-е сутки эксперимента, но отличался от значений в группе интактных животных, то есть восстанавливался частично (табл. 1). На фоне локального применения витамина D₃ при ЯК на 4-е и 6-е сут в толстой кишке значимо снижается экспрессия TNF-α (табл. 2). При анализе концентрации цитокинов в сыворотке получены следующие данные: концентрация IL-6 снижается на 2-е, 4-е и 6-е

сут эксперимента, концентрация IL-8 снижается только на 6-е сут (табл. 2). Отметим, что при применении витамина D₃ при ЯК экспрессия TNF-α в толстой кишке, концентрация в сыворотке IL-6 и IL-8 во все сроки наблюдения значимо отличаются от значений в группе интактных животных, то есть восстанавливаются частично.

При экспериментальном ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D₃ концентрация в сыворотке С-РБ снижается на 2-, 4- и 6-е сут наблюдения, но не достигает значений в группе интактных животных во все сроки наблюдения (табл. 2). При исследовании общего количества лейкоцитов в крови выявлено их значимое снижение только на 6-е сут наблюдения без достижения значений интактных животных (табл. 3). Количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов снижается на 4-е и 6-е сут наблюдения. Следует отметить, что количество палочкоядерных нейтрофилов значимо не отличается от значений интактных животных на 6-е сут, сегментоядерных нейтрофилов — на 4-е и 6-е сут эксперимента. Применение витамина D₃ в составе ректальных суппозиториях при ЯК значимо изменяет поглотительную способность нейтрофилов крови: активность фагоци-

Таблица 2/Table 2

Влияние витамина D₃ в составе ректальных суппозиториях на содержание С-РБ в сыворотке, цитокинов в сыворотке и в стенке толстой кишки при экспериментальном ЯК (Ме (Q₁; Q₃))

Influence of vitamin D₃ in the composition of rectal suppositories on the content of CRP in serum, cytokines in serum and in the wall of the colon in experimental UC (Me (Q₁; Q₃))

Показатели Indicator	Группа I Group I	Группа 2/ Group II			Группа 3/ Group III		
		2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day
TNF-α, ед./мм ² толстой кишки TNF-α, units/mm ² of the colon	16,28 (7,66-26,81)	752,87 (703,06; 814,17)*	1302,68 (1264,36; 1321,83)*	1321,83 (919,54; 1475,09)*	766,28 (670,49; 957,85)*	727,96 (727,97; 766,28)*,**	210,72 (172,41; 229,88)*,**
IL-6, пг/мл сыворотки IL-6, pg/ml serum	16,57 (15,65; 18,41)	45,11 (44,18; 46,03)*	51,55 (50,63;52,47)*	52,47 (49,71; 54,31)*	38,66 (37,74; 39,58)*,**	34,98 (30,38; 36,82)*,**	24,85 (23,93; 25,77)*,**
IL-8, пг/мл сыворотки IL-8, pg/ml serum	90,61 (88,51;93,12)	273,47 (222,36;291,08)*	224,91 (217,68;233,41)*	245,74 (225,76; 296,36)*	227,46 (205,35; 243,62)*	214,71 (194,31; 243,19)*	216,41 (184,94; 226,19)*,**
С-РБ, пг/мл сыворотки CRP, pg/ml serum	44,97 (40,76; 47,51)	188,12 (184,68;189,26)*	263,82 (214,51;267,26)*	314,01 (309,71; 446,43)*	133,79 (127,89; 141,66)*,**	123,96 (118,91; 132,67)*,**	106,81 (106,53; 108,51)*,**

Примечание. * – значимые (p < 0,01) различия с группой 1; ** – с группой 2.

Note. * – statistically significant differences (p < 0.01) with group 1; ** – with group 2.

тоза и фагоцитарное число снижаются на 2-, 4- и 6-е сут наблюдения. При этом значений в группе интактных животных достигает только активность фагоцитоза на 6-е сут эксперимента. При исследовании НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови выявлено, что в спонтанном режиме на 2-, 4- и 6-е сут эксперимента значимо снижается активность, а на 6-е сут снижается интенсивность НСТ-теста. В индуцированном режиме на 2-, 4- и 6-е сут эксперимента значимо снижается активность, а на 2-е и 4-е сут – интенсивность НСТ-теста. Отметим, что на 2-е сут эксперимен-

та достигает значений интактных животных активность спонтанного НСТ-теста, а также активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, на 4-е сут – активность спонтанного индуцированного НСТ-теста и интенсивность индуцированного НСТ-теста, на 6-е сут – только интенсивность спонтанного НСТ-теста.

Обсуждение

Выявленные изменения показателей при экспериментальном ЯК обусловлены известными закономерностями формирования ООФ в ответ на первичное по-

Таблица 3/Table 3

Влияние витамина D₃ в составе ректальных суппозиториев на количественный состав лейкоцитов, функциональную активность нейтрофилов крови при экспериментальном ЯК (Ме (Q₁; Q₃))

The effect of vitamin D₃ in the composition of rectal suppositories on the quantitative composition of leukocytes, the functional activity of blood neutrophils in experimental UC (Me (Q₁; Q₃))

Показатели Indicator	Группа 1 Group I	Группа 2/ Group II			Группа 3/ Group III		
		2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day
Лейкоциты, • 10 ⁹ /л WBC, • 10 ⁹ /l	4,40 (4,00;5,40)	10,45 (7,10;12,80)*	6,45 (6,00; 11,40)*	8,95 (6,10;14,20)*	11,05 (6,80;11,70)*	7,40 (5,40;9,30)*	6,73 (5,00; 9,80)*,**
ПЯН, • 10 ⁹ /л PNEU, • 10 ⁹ /l	0,04 (0;0,14)	0,37 (0,21;0,38)*	0,23 (0,15;0,41)*	0,12 (0,07;0,14)*	0,22 (0,13;0,23)*,**	0,17 (0,14;0,27)*,**	0,07 (0;0,19)**
СЯН, • 10 ⁹ /л SNEU, • 10 ⁹ /l	1,36 (1,33;1,56)	5,41 (2,41;6,14)*	2,43 (2,04;4,78)*	2,28 (1,74;3,13)*	5,03 (2,14;5,03)*	1,67 (1,13;2,88)**	1,99 (1,37;5,39)**
Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	36,00 (32,00; 39,00)	78,50 (74,00;79,00)*	61,00 (61,00; 78,00)*	74,00 (69,00;75,00)*	49,00 (39,00;52,00)*,**	46,00 (41,00; 54,00)*,**	42,00 (34,00; 52,00)**
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, in units	1,88 (1,87;2,22)	15,65 (14,78;16,25)*	13,06 (10,28; 13,27)*	16,18 (13,69;19,29)*	11,96 (8,29;12,98)*,**	9,51 (8,17; 10,95)*,**	12,76 (11,01; 13,52)*,**
НСТ-тест спонтан- ный, активность, % NST test is sponta- neous, activity, %	4,00 (4,00;5,00)	10,50 (8,00;15,00)*	14,50 (11,00; 15,00)*	16,50 (14,00;19,00)*	5,00 (3,00;5,00)**	6,50 (4,00;8,00)**	7,00 (5,00; 9,00)*,**
НСТ-тест спонтанный, интенсивность, у. е. NST test is sponta- neous, intensity, in units	0,06 (0,05;0,07)	0,05 (0,05;0,11)	0,13 (0,05; 0,30)*	0,19 (0,11;0,27)*	0,06 (0,06;0,06)	0,08 (0,08;0,18)*	0,07 (0,06; 0,10)**
НСТ-тест индуциро- ванный активность, % NBT test induced activity, %	3,50 (3,00;4,00)	12,50 (10,00;14,00)*	30,00 (22,00; 37,00)*	22,50 (17,00;26,00)*	3,00 (3,00;4,00)**	7,00 (6,00;9,00)*,**	6,00 (4,00; 10,00)*,**
НСТ-тест индуциро- ванный интенсив- ность, у. е. NBT-test induced intensity, in units	0,06 (0,06;0,06)	0,19 (0,19;0,20)*	0,39 (0,34;0,39)*	0,19 (0,12;0,23)*	0,05 (0,03;0,09)**	0,11 (0,06;0,15)**	0,13 (0,10;0,13)*

Примечание. * – значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; ** – с группой 2. ПЯН – палоякоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы. НСТ (спонтанная и индуцированная интенсивность), фагоцитарное число – в условных единицах (у.е.).

Note. * – statistically significant differences ($p < 0.01$) with group 1; ** – with group 2. PNEU – nuclear neutrophils, SNEU – segmented neutrophils. NBT(spontaneous and induced intensity), phagocytic number, — in units.

вреждение стенки толстой кишки спиртовым раствором оксазолон и вторичное повреждение факторами иммунной системы. Полагают, что оксазолон выступает в роли гаптена, инициируя Th2-зависимый иммунный ответ с повышением продукции IL-4, IL-5, IL-13 T- и NK-Т-клетками собственной пластинки и наиболее приближен к клиническим и морфологическим признакам ЯК у людей [4]. Ранее нами продемонстрирована ассоциация клинических признаков и содержания продуктов перекисидации липидов и окислительной модификации белков в стенке толстой кишки при экспериментальном ЯК [19]. В ответ на повреждение толстой кишки активируются нейтрофилы, моноциты/макрофаги, эндотелиоциты и др. клетки, участвующие в синтезе и секреции провоспалительных цитокинов, в частности IL-6, IL-8, TNF-α, что было обнаружено, начиная

со 2-х сут экспериментального ЯК с максимальной выраженностью на 4-е и 6-е сут. Увеличение концентрации С-РБ в сыворотке крови при экспериментальном ЯК связано со стимуляцией синтеза белков ООФ в печени под воздействием IL-6 и других провоспалительных цитокинов. TNF-α, IL-1β усиливают провоспалительные функции нейтрофилов и макрофагов, что сопровождается повышением концентрации IL-8 в крови [2, 4, 6]. IL-8, в свою очередь, являясь мощным хемоаттрактантом, увеличивает в очаге повреждения количество нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и др. клеток. Увеличение в крови количества нейтрофилов, их поглощательной и НСТ-редуцирующей способности реализуется за счет демаргинации в сосудистом русле и выхода зрелых нейтрофилов из костного мозга на 2-е сут, а также активации пролиферации и дифференцировки кле-

Таблица 4/Table 4

Корреляция между индексом активности болезни (DAI, у.е.) и показателями острофазового ответа при ЯК в условиях применения ректальных суппозиторий с витамином D₃

Correlation between the disease activity index (DAI, cu) and indicators of acute phase response in UC under conditions of using rectal suppositories with vitamin D₃

Показатели / Indicator	Группа 1/Group I	Группа 2/Group II	Группа 3/Group III
Лейкоциты, • 10 ⁹ /л WBC, • 10 ⁹ /l	0,94	0,28	0,57
ПЯН, • 10 ⁹ /л PNEU, • 10 ⁹ /l	0,05	0,52	0,71
СЯН, • 10 ⁹ /л SNEU, • 10 ⁹ /l	0,01	0,61	0,14
Активность фагоцитоза, % (Phagocytosis activity, %)	0,35	0,12	0,21
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, u. e.	0,16	0,18	0,41
НСТ-тест спонтанный, активность, % NST test is spontaneous, activity, %	0,77	0,23	0,05
НСТ-тест спонтанный, интенсивность, у. е. NST test is spontaneous, intensity, in units	0,70	0,24	0,05
НСТ-тест индуцированный, активность, % NBT test induced, activity, %	0,41	0,30	0,31
НСТ-тест индуцированный, интенсивность, у. е. NBT-test induced, intensity, in units	0,03	0,33	0,23
IL-8, пг/мл сыворотки (IL-8, pg/ml serum)	0,19	0,18	0,11
IL-6, пг/мл сыворотки (IL-6, pg/ml serum)	0,57	0,31	0,11
С-РБ, пг/мл сыворотки (CRP, pg/ml serum)	0,31	0,28	0,22
TNF-α, ед./мм ² толстой кишки TNF-α, units/mm ² of the colon	0,73	0,29	0,29

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена (R). Полужирным шрифтом выделены статистически значимые (p<0,05) связи. НСТ(спонтанная и индуцированная интенсивность) , фагоцитарное число — в условных единицах (у.е.).

Note. The values of the Spearman correlation coefficient (R). Statistically significant (p < 0.05) connections are highlighted in bold. NBT (spontaneous and induced intensity), phagocytic number, — in units.

ток миелоидного ростка в костном мозге под действием провоспалительных медиаторов, в том числе IL-6 и IL-8, концентрация которых в сыворотке увеличивается.

Выявленное действие витамина D₃ на клинический статус и показатели острофазового ответа могут быть связаны с его способностью восстанавливать целостность эпителиального барьера толстой кишки за счет усиления синтеза винкулина, зонулина, окклюдина и др. белков через взаимодействие со специфическими рецепторами (VDR) и ограничивать очаг повреждения толстой кишки. Восстановление эпителиального барьера толстой кишки приводит к снижению синтеза провоспалительных цитокинов в очаге, что способствует ограничению площади вторичной альтерации и уменьшению выраженности ООФ [11, 20]. Еще один механизм протекторного действия витамина D₃ при ЯК может быть связан с благоприятным влиянием на состав кишечной микрофлоры в условиях дисбиоза при данной патологии [21]. Мишенями кальцитриола выступают активированные Т-клетки, НК-клетки, где через ингибирование активации STAT1 и STAT3 снижается синтез провоспалительных цитокинов [22]. В опухолевых клетках простаты витамин D₃ подавляет провоспалительный сигнальный путь, опосредованный p38 MAPK, и как следствие синтез TNF-α, IL-6. Противовоспалительный эффект витамина D₃ может быть опосредован ингибированием ЦОГ-2, снижением синтеза простагландинов и снижением экспрессии их рецепторов, что было показано при аденокарциноме толстой кишки и опухолях молочной железы [23]. С использованием корреляционного анализа установлены связи между показателем DAI и исследуемыми показателями ООФ в динамике экспериментального ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D₃ (табл. 4). На 2-е сут выявлены прямые сильные связи с общим количеством лейкоцитов в крови, экспрессией в кишке TNF-α, активностью и интенсивностью спонтанного НСТ-теста, прямая средней силы связь – с концентрацией в сыворотке IL-6. На 4-е сут зафиксированы прямые средней силы связи с количеством в крови палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. На 6-е сут выявлена прямая сильная связь с количеством палочкоядерных нейтрофилов.

Заключение

Полученные результаты демонстрируют протекторный эффект оригинальных ректальных суппозиториях, содержащих 1500 МЕ витамина D₃ в отношении клинической активности экспериментального ЯК и выраженности ООФ, что дополняет имеющиеся представления о плейотропных эффектах витамина D₃

в организме и является предпосылкой для проведения дальнейших исследований по уточнению на доклиническом этапе механизма локального действия витамина D₃ в толстой кишке и перспективности его применения в клинической практике.

Литература

(п.п. 1-11; 16; 17; 20-23 см. References)

- Патент РФ № 2019115328, 2019.05.20. Симонян Е.В., Осиков М.В., Бойко М.С., Бакеева А.Е. *Средство с витамином D₃ для лечения язвенного колита в форме ректальных суппозиториях. Патент РФ № 2709209*. 2019. Бюл. №35
- Осиков М.В., Симонян Е.В., Бойко М.С., Огнева О.И., Ильиных М.А., Воргова Л.В. Влияние витамина D₃ в составе оригинальных ректальных суппозиториях на показатели окислительной модификации белков в толстом кишечнике при экспериментальном язвенном колите. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(11): 563–8. Doi:10.47056/0365-9615-2020-170-11-563-568
- Осиков М.В., Симонян Е.А., Бойко М.С. Влияние витамина D₃ в составе ректальных суппозиториях оригинального состава на показатели свободнорадикального окисления в слизистой оболочке толстой кишки в динамике экспериментального язвенного колита. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2020; 17(1): 42–52. Doi:10.22138/2500-0918-2020-17-1-42-52
- 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.
- Фрейдлин И.С. *Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие*. Л., 1986.
- Осиков М.В., Давыдова Е.В., Бойко М.С., Бакеева А.Е., Кайгородцева Н.В., Галеева И.Р. и др. Особенности свободнорадикального окисления в толстом кишечнике при язвенном колите и болезни Крона. *Вестник РГМУ*. 2020; 3: 63–70. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027

References

- Wedlake L., Slack N., Andreyev H.J., Whelan K. Fiber in the treatment and maintenance of inflammatory bowel disease: a systematic review of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 20(3): 576–86. doi: 10.1097/01.MIB.0000437984.92565.31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24445775/>
- Takač B., Mihaljević S., Glavaš-Obrovac L., Kibel A., Suver-Steivić M., Canecki-Varžić S. et al. Interactions among interleukin-6, c-reactive protein and interleukin-6 (-174) g/c polymorphism in the pathogenesis of crohn's disease and ulcerative colitis. *Acta Clin Croat*. 2020; 59(1):67-80. doi: 10.20471/acc.2020.59.01.09. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32724277/>
- Zhao J., Wang Y., Gu Q., Du Z., Chen W. The association between serum vitamin D and inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(18):e15233. doi: 10.1097/MD.00000000000015233. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045762/>
- Iyer S.S., Gensollen T., Gandhi A., Oh S.F., Neves J.F., Collin F., et al. Dietary and Microbial Oxazoles Induce Intestinal Inflammation by Modulating Aryl Hydrocarbon Receptor Responses. *Cell*. 2018; 173(5): 1123–1134.e11. doi:10.1016/j.cell.2018.04.037. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29775592/>

5. Sayar S., Kurbuz K., Kahraman R., Caliskan Z., Atalay R., Ozturk O. et al. A practical marker to determining acute severe ulcerative colitis: CRP/albumin ratio. *North Clin Istanbul*. 2019; 7(1):49-55. doi: 10.14744/nci.2018.78800. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103752/>
6. Kaur A., Goggolidou P. Ulcerative colitis: understanding its cellular pathology could provide insights into novel therapies. *J Inflamm (Lond)*. 2020; 17:15. doi: 10.1186/s12950-020-00246-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336953/>
7. Wang Q., Mi S., Yu Z., Li Q., Lei J. Opening a Window on Attention: Adjuvant Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 2020:7397523. doi:10.1155/2020/7397523. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7441453/>
8. Murdaca G., Tonacci A., Negrini S., Greco M., Borro M., Puppo F. et al. Emerging role of vitamin D in autoimmune diseases: An update on evidence and therapeutic implications. *Autoimmunity Rev*. 2019; 18(9):102350. doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102350. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31323357>.
9. Wang Y., Zhu J., DeLuca H.F. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*. 2012; 523: 123–33. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503810/>
10. Yang F., Sun M., Sun C. et al. Associations of C-reactive Protein with 25-hydroxyvitamin D in 24 Specific Diseases: A Cross-sectional Study from NHANES. *Sci Rep*. 2020; 10(1):5883. doi:10.1038/s41598-020-62754-w. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32246038/>
11. Zhao H., Zhang H., Wu H., Li H., Liu L., Guo J., et al. Protective role of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC gastroenterology*. 2012; 12: 57. doi:10.1186/1471-230X-12-57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464614/>
12. RF patent No. 2019115328, 2019.05.20. Simonyan E.V., Osikov M.V., Boyko M.S., Bakeeva A.E. *Means with vitamin D3 for the treatment of ulcerative colitis in the form of rectal suppositories*. RF Patent No. 2709209.2019. Bul. No. 35 (In Russian)
13. Osikov M.V., Simonyan E.V., Boyko M.S., Ogneva O.I., Il'inyh M.A., Vorgova L.V., Bogomolova A.M. The effect of vitamin D₃ in the composition of original rectal suppositories on the indicators of oxidative modification of proteins in the large intestine in experimental ulcerative colitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 170(11): 563–8. (In Russian). Doi:10.47056/0365-9615-2020-170-11-563-568
14. Osikov M.V., Simonyan E.A., Boyko M.S. The effect of vitamin D₃ in the composition of rectal suppositories of the original composition on the indices of free radical oxidation in the colon mucosa in the dynamics of experimental ulcerative colitis. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2020; 17(1): 42-52. Doi:10.22138/2500-0918-2020-17-1-42-52 (In Russian)
15. Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Saint Petersburg 2012 (In Russian)
16. Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*. 2002; 17(5): 629–38. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00453-3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12433369/>
17. Wang X.W., Yang J.H., Cao Q., Tang J.M. Therapeutic efficacy and mechanism of water-soluble extracts of Banxiaxiexin decoction on BALB/c mice with oxazolone-induced colitis. *Exp. Ther. Med*. 2014; 8(4): 1201–4. doi: 10.3892/etm.2014.1890. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25187824/>
18. Freydlin I.S. *Methods of studying phagocytic cells in assessing the immune status of a person: tutorial*. [Metody izucheniya fagotsitiruyushchikh kletok pri otsenke immunnogo statusa cheloveka: uchebnoe posobie]. Leningrad, 1986. (In Russian)
19. Osikov M.V., Davydova E.V., Boyko M.S., Bakeeva A.E., Kaigorodtseva N.V., Galeeva I.R. and other. Features of free radical oxidation in the large intestine in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Bulletin of the Russian State Medical University*. 2020; 3: 63-70. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027 (In Russian)
20. Wang H.Q., Zhang W.H., Wang Y.Q., Geng X.P., Wang M.W., Fan Y.Y., et al. Colonic vitamin D receptor expression is inversely associated with disease activity and jumonji domain-containing 3 in active ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*. 2020; 26(46): 7352–66. doi:10.3748/wjg.v26.i46.7352. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7739157/>
21. Naderpoor N., Mousa A., Arango L.F.G., Barrett H.L., Dekker N.M., de Courten B. Effect of Vitamin D Supplementation on Faecal Microbiota: A Randomised Clinical Trial. *Nutrients*. 2019; 11(12): 2888. doi:10.3390/nu11122888. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31783602>
22. Olson K.C., Kulling Larkin P.M., Signorelli R., Hamele C.E., Olson T.L., Conaway M.R., et al. Vitamin D pathway activation selectively deactivates signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins and inflammatory cytokine production in natural killer leukemic large granular lymphocytes. *Cytokine*. 2018; 111: 551–62. doi: 10.1016/j.cyto.2018.09.016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6289695/>
23. Jeon S.M., Shin E.A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med*. 2018; 50(4):20. doi:10.1038/s12276-018-0038-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29657326/>

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, e-mail: prof.osikov@yandex.ru ;

Бойко Маргарита Сергеевна, ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, e-mail: ri-tochka9@list.ru

Симонян Елена Владимировна, канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ.