

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.9

Осиков М.В.¹, Симонян Е.В.¹, Бакеева А.Е.¹, Астахова Л.В.²

Морфологические аспекты протекторного действия оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы при экспериментальной болезни Крона

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», Минздрава России,

545092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

²ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины»,

454018, Челябинск, пр. Победы, д. 287

Введение. Востребованным для лечения болезни Крона (БК) является разработка новых, обоснованных с патогенетических позиций и безопасных лекарственных средств преимущественно локального действия эндогенного или растительного происхождения. В этом отношении привлекает внимание экстракт корневищ Куркумы длинной (*Curcuma longa*), содержащий куркуминоидный комплекс, обладающий плейотропными эффектами. Ранее нами показано, что экстракт куркумы в составе суппозиторий при экспериментальной БК обладает иммуномодулирующим и местным антиоксидантным действием, что предполагает влияние экстракта куркумы на морфологию очага повреждения в кишечнике при БК.

Цель работы – изучение влияния экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиторий на динамику морфологических изменений, экспрессию миелопероксидазы (МПО) и TNF-α в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальной БК.

Методика. Эксперимент выполнен на 49 половозрелых крысах-самцах Wistar. БК моделировали введением *per rectum* спиртового раствора тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС). Оригинальные ректальные суппозитории массой 300 мг на основе полиэтиленгликолей различной молекулярной массы, содержащие 0,075 мг куркумина из экстракта корневищ *Curcuma longa L.*, вводили *per rectum* каждые 12 ч в течение 7 сут. Клинический статус оценивали по модифицированной шкале Disease activity index (DAI). Морфометрически в стенке кишечника оценивали размер язвенного дефекта, выраженность клеточной инфильтрации, рассчитывали индекс тканевого повреждения (tissue damage index, TDI), оценивали экспрессию МПО и TNF-α.

Результаты. При экспериментальной БК на 3-и, 5-е и 7-е сут наблюдения в толстом кишечнике обнаруживались язвенные дефекты, выраженный отек тканей, плотная нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация с примесью эозинофилов, плазмочитов, гистиоцитов, фибробластов, наблюдалось формирование грануляционной ткани. Индекс тканевого повреждения возрастал, повышалась экспрессия МПО и TNF-α. Размер язвенных дефектов, выраженность инфильтрации, индекс тканевого повреждения соответствовали клинической картине и индексу DAI. Применение оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы (0,075 мг) приводит к снижению выраженности клинических и морфологических признаков заболевания, максимальный эффект отмечен на 5-е и 7-е сут наблюдения.

Заключение. Установленные протекторные свойства куркумина в составе оригинальных ректальных суппозиторий при БК на доклиническом этапе расширяют современные представления о плейотропных эффектах экстракта куркумы и являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований и внедрения новой лекарственной формы в клиническую практику.

Ключевые слова: болезнь Крона; кишечник; морфология; TNF-α; миелопероксидаза; экстракт куркумы; суппозитории

Для цитирования: Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Астахова Л.В. Морфологические аспекты протекторного действия оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы при экспериментальной болезни Крона. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(2): 67-77.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.02.67-77

Для корреспонденции: Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е.; сбор и обработка материала – Бакеева А.Е., Астахова Л.В.; статистическая обработка – Бакеева А.Е., Астахова Л.В.; написание текста – Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е.; редактирование – Бакеева А.Е., Астахова Л.В.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.04.2020

Принята к печати 25.03.2021

Опубликована 30.06.2021

Osikov M.V.¹, Simonyan E.V.¹, Bakeeva A.E.¹, Astakhova L.V.²**Morphological aspects of the protective effect of newly formulated rectal suppositories with turmeric extract in experimental Crohn's disease**¹South Ural State Medical University,
Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk 545092, Russian Federation;²Multidisciplinary Center of Laser Medicine,
Prospekt Pobedy 287, Chelyabinsk 454018, Russian Federation

The development of safe, new, pathogenetically justified medicines, mainly with local effects and of endogenous or plant origin, is of great interest for treatment of Crohn's disease (CD). In this regard, an extract of rhizomes of *Curcuma longa*, containing a curcuminoid complex with pleiotropic effects, has attracted attention. We showed previously that having turmeric extract in suppositories for treatment of experimental CD would produce immunomodulatory and antioxidant effects. This suggests that turmeric extract affects the morphology of the CD intestinal lesion.

The aim of this work was to study the effect of turmeric extract in the composition of novel rectal suppositories on the morphology and expression of myeloperoxidase (MPO) and TNF- α in colon lesions of experimental CD.

Methods. Experiments were performed on 49 sexually mature male Wistar rats. CD was modeled by administration per rectum of an alcohol solution of trinitrobenzenesulfonic acid. The newly formulated rectal suppositories weighing 300 mg and based on polyethylene glycols of various molecular weights and containing 0.075 mg of curcumin obtained from *Curcuma longa* L. rhizome extract were administered per rectum every 12 hours for 7 days. The clinical status was assessed with the modified disease activity index (DAI) scale. The ulcer defect diameter, cell infiltration, tissue damage index (TDI), MPO expression, and TNF- α expression were evaluated.

Results. In experimental CD on the 3rd, 5th, and 7th days of observation, a morphometric assessment of the lesion in the large intestine revealed the presence of ulcerative defects, edema, thick neutrophilic lymphocytic infiltration with an admixture of eosinophils, plasmocytes, histiocytes, fibroblasts, the formation of granulation tissue, increased TDI, and increased expression of MPO and TNF- α . The size of ulcerative defects, the degree of wall infiltration by neutrophils, lymphocytes, plasmocytes, histiocytes, and fibroblasts were recorded. The TDI, the expression of MPO, and TNF- α were associated with the DAI. The use of the novel rectal suppositories produced a maximal effect on the 5th and 7th days of observation. The severity of clinical and morphological signs of the disease were reduced. These signs included ulcer size, TDI, intestinal wall infiltration with neutrophils, lymphocytes, eosinophils, plasmocytes, histiocytes, and fibroblasts, and expression of MPO and TNF- α .

Conclusion. The results supplement available data on the pathogenesis, the role of the expression of MPO and TNF- α , and the morphology of the lesion in the clinical status in TNBS-induced CD in rats. The demonstrated, protective properties of curcumin in the composition of the novel rectal suppositories at the preclinical stage of CD expand modern understanding of the pleiotropic effects of turmeric extract and are a prerequisite for further research and the introduction of a new dosage form in clinical practice.

Keywords: Crohn's disease; intestines; morphology; TNF- α ; myeloperoxidase; turmeric extract; suppositories

For citation: Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Astakhova L.V. Morphological aspects of the protective effect of newly formulated rectal suppositories with turmeric extract in experimental Crohn's disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(2): 67-77. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.02.67-77

For correspondence: **Mikhail V. Osikov**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head, Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Contribution: study concept and design – Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E.; collection and treatment of materials – Bakeeva A.E., Astakhova L.V.; statistics – Bakeeva A.E., Astakhova L.V.; text writing – Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E.; editing – Bakeeva A.E., Astakhova L.V.

Acknowledgment. The study has no sponsorship.

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

Information about the authors:

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Bakeeva A.E., <https://orcid.org/0000-0002-9264-4852>

Received 30.04.2020

Accepted 25.03.2021

Published 30.06.2021

Введение

Данные по заболеваемости болезнью Крона (БК) в мире варьируют в широких пределах, тем не менее позволяют уверенно говорить о росте. По данным систематических обзоров, в Европе (1930 – 2008 гг.) заболеваемость БК в среднем составляла 12,7 на 100 тыс. человеко-лет, в Северной Америке – 20,2 на 100 тыс. человеко-лет, в РФ распространенность БК составляет 5–20 случаев на 100 тыс. [1]. Особое значение имеет рост заболеваемости БК у молодых трудоспособных граждан в связи с высокой вероятностью развития осложнений. По данным различных исследований не менее 30% пациентов с БК рефрактерны к базисной терапии, у многих возникает широкий спектр побочных явлений, ограничивающих применение препаратов [2]. В связи с этим, востребованной является разработка новых, патогенетически обоснованных, безопасных лекарственных средств локального действия эндогенного или растительного происхождения. В этом отношении привлекает внимание экстракт корневищ Куркумы длинной (*Curcuma longa*), содержащий куркуминоидный комплекс, плейотропные эффекты которого, включая антиоксидантные, цитопротекторные, антиапоптогенные, противовоспалительные, иммуномодулирующие, антимикробные и др., были продемонстрированы в клинических и экспериментальных условиях при хронических воспалительных заболеваниях. Препараты куркуминоидного комплекса показали свою эффективность при заболеваниях аутоиммунной природы, что предполагает возможность его успешного применения при БК [3, 4].

В РФ отсутствуют зарегистрированные лекарственные формы, содержащие куркумин, что существенно ограничивает возможности его изучения и применения в терапии БК. Ранее нами показано, что экстракт куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториев при экспериментальной БК обладает системным иммуномодулирующим, а также антиоксидантным действием в стенке толстого кишечника, уменьшает содержание продуктов перекисидации липидов и окислительной модификации белков [5–7]. Данный факт позволяет предполагать положительное местное действие экстракта куркумы на очаг повреждения в кишечнике при БК. Есть предположение, что экспрессия в стенке толстого кишечника миелопероксидазы (МПО) и TNF- α , участвующих в инициации и поддержании иммунопатологических реакций и воспалительного процесса в толстом кишечнике, являются ключевыми маркерами БК, определяют вероятность и длительность ремиссии, коррелируют с дру-

гими лабораторными показателями (С-реактивный белок, кальпротектин), индексами клинической активности заболевания и могут применяться для оценки эффективности проводимой терапии [8–10]. Цель работы – исследование влияния экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториев на экспрессию МПО и TNF- α и морфологию очага повреждения толстого кишечника при экспериментальной болезни Крона.

Методика

Эксперимент выполнен на 49 крысах-самцах Wistar массой 240–260 г. в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986 г., Страсбург), рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18.06.2007 г., и Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протоколы № 1 от 14.01.2017 г., № 1 от 22.01.2020 г.).

Животные были случайным образом разделены на группы: 1-я группа ($n=7$) – интактный контроль; 2-я ($n=21$) – животные с БК; 3-я ($n=21$) – животные с БК в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы через каждые 12 ч. Животные были лишены корма за 24 ч до начала исследования. Для общей анестезии использовали препарат «Золетил-100» («Zoletil», «Virbac SanteAnimale», Франция) в дозе 20 мг/кг. Для моделирования БК 30 мг тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) («Sigma-aldrich», США) растворяли в 150 мл 50% этанола, затем 0,25 мл полученного раствора вводили *per rectum* с помощью полиуретанового катетера с диаметром 2 мм на глубину 8 см [11]. Доза ТНБС была подобрана таким образом, чтобы смертность животных была минимальной или отсутствовала. В наших экспериментах смертность животных в течение 7 сут моделирования БК отсутствовала. Развитие БК верифицировали по клинической картине и морфологии очага повреждения в толстом кишечнике.

Нами разработан состав и проведен комплекс фармакотехнологических исследований новой лекарственной формы – суппозиториев, содержащих 0,075 мг куркумина, полученного из 10% спиртового (растворитель – спирт этиловый 80%) экстракта корневищ с корнями куркумы длинной (*Curcuma longa L.*, «Diamart», Индия). В качестве вспомогательных веществ, для соответствия фармацевтико-технологическим и био-

фармацевтическим параметрам, использовали полиэтиленгликоли различной молекулярной массы, эмульгатор Т-2, кремофор СО-40 и Kolliphor P188. Выбор оптимальной композиции базировался на исследовании кинетики высвобождения куркумина в тесте «Растворение», динамика высвобождения куркумина из суппозитория носила линейный характер с величиной аппроксимации 0,995. Стандартизацию суппозитория проводили согласно ОФС 1.4.1.0013.15 «Суппозитории». Размеры суппозитория были адаптированы под анатомические особенности лабораторных животных, масса каждого образца исследуемой лекарственной формы составила 300 мг. Исследования проводили на 3-и, 5-е и 7-е сут моделирования БК.

Во всех группах животных ежедневно оценивали потребление корма и воды, а также клинический статус по модифицированной шкале Disease activity index (DAI), адаптированной для оценки БК у крыс и включающей 3 параметра: массу тела, консистенцию стула и наличие крови в кале [12]. Каждый критерий оценивали по 4-х-балльной шкале от 0 до 4, затем баллы суммировали, минимальное значение индекса – 0, максимальное – 12.

Проксимальную часть ободочной кишки фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, серийные гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Подсчитывали под микроскопом («Leica DMRXA», Германия) на 1 мм² количество нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, гистиоцитов, плазматических клеток, фибробластов, измеряли диаметр язвенного дефекта (в мкм) при увеличении 400 и 100 в 10 случайно выбранных полях зрения. Морфометрические исследования проводили с помощью программы «ImageScore M» (Россия). Для интегральной оценки повреждения толстого кишечника использовали индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI), для чего по шкале от 0 до 6 оценивали уровень лейкоцитарной инфильтрации, плотность сосудистого русла, степень утолщения стенки кишечника, сни-

жение числа бокаловидных клеток [13], определяли относительную площадь повреждения.

Иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию МПО и TNF-α в толстом кишечнике с использованием наборов специфических для крыс антител («ElisaKit», Китай) и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (Super Frost Plus), результат выражали в ед./мм². Постановка реакции проводилась в иммуногистостейнере «Bench Mark XT» (Ventana, США) с соблюдением протокола исследования. Для визуализации применяли систему «Ultra VIEW Universal DAB» (Ventana, США) и комплекс вторичных антител и хромогена.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q₂₅ – Q₇₅)», где Me – медиана, Q₂₅, Q₇₅ – 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. Различия считали статистически значимыми при p < 0,01.

Результаты

При экспериментальной БК, начиная с 3-х сут наблюдения, у животных возрастала частота дефекаций, изменялась консистенция кала, отмечалось появление крови в каловых массах, на 5-е и 7-е сут наблюдения к указанным признакам присоединялось снижение массы тела и нарастание тяжести симптоматики, что нашло отражение в статистически значимом увеличении индекса DAI (табл. 1). Потеря массы тела в среднем составила 10%, принято считать, что это обусловлено диареей, системным воспалительным ответом и анорексигенным эффектом некоторых провоспалительных цитокинов, в частности TNF-α [14]. Кроме

Таблица 1

Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях на индекс активности болезни при экспериментальной БК (Me (Q₂₅-Q₇₅))

Группы животных	Группа 1-я (n=7) контроль	Группа 2-я 3-и сут (n=7)	Группа 2-я 5-е сут (n=7)	Группа 2-я 7-е сут (n=7)	Группа 3-я 3-и сут (n=7)	Группа 3-я 5-е сут (n=7)	Группа 3-я 7-е сут (n=7)
DAI, у.е.	0	7,00 (3,00-7,00)*	8,00 (6,00-10,00)*	11,00 (11,00-11,00)*	5,00 (5,00-5,00)*	4,00 (4,00-5,00)* #	4,00 (4,00-4,00)*#

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

этого, отмечалось снижение двигательной активности животных. В динамике БК значение DAI на 7-е сут статистически значимо превышало значения 3-х и 5-х сут ($p < 0,05$). Таким образом, при ТНБС-индуцированном колите у крыс наблюдается клиническая картина, характерная для БК.

На 3-и сут БК при гистологическом исследовании фрагментов толстой кишки определялись язвенные дефекты, дно которых располагалось в слизистой оболочке (рис. 1, а) или в подслизистом слое. Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистый слой разрыхлены, утолщены за счет отека и клеточной инфильтрации, которая состояла преимущественно из лимфоцитов и нейтрофилов с примесью эозинофилов. В подслизистом слое наблюдался отек межучной ткани, венозное и капиллярное полнокровие с картиной эритростаза. На 5-е сут БК определялись язвенные дефекты, выполненные клеточным детритом в виде мелкозернистых бесструктурных масс, их дно располагалось в подслизистом или в мышечном слое. Непрерывность собственной пластинки слизистой оболочки в проекции язвенных дефектов была нарушена, волокна ее разрыхлены, раздвинуты экссудатом, в котором определялись преимущественно лимфоциты и нейтрофилы. В подслизистом слое – отек межучной ткани, выраженное венозное и капиллярное полнокровие с картиной эритро- и лейкостазов, плазматическое пропитывание и фибриноидное набухание сосудистых стенок. В подслизистом слое в стенках язвенных дефектов наблюдались начальные явления фибриллогенеза: участки пролиферации фибробластов на фоне мелкоочаговой лимфогистиоцитарной инфильтрации с при-

месью небольшого количества плазматических клеток и формирование тонких, коротких соединительнотканых волокон (рис. 2, а). На 7-е сут БК определялись язвенные дефекты, в том числе выполненные клеточным детритом в виде базофильных мелкозернистых бесструктурных масс. Дно дефектов располагалось глубоко в подслизистом слое с нарушением непрерывности собственной пластинки слизистой оболочки. В клеточном составе грануляционной ткани на фоне лимфогистиоцитарной инфильтрации были видны поля веретеновидных фибробластов. В перифокальных зонах определялся отек и дистрофические изменения слизистой оболочки, просветы кишечных желез были расширены, крипты укорочены, просветленная цитоплазма клеток эпителия была вакуолизирована, ядра набухшие, гипохромные, прослойки рыхлой соединительной ткани между криптами с выраженной нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 3, а).

Морфометрический анализ позволил установить, что на 3-и и 5-е и 7-е сут экспериментальной БК в очаге повреждения толстого кишечника на единице площади увеличивалось количество лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, плазмочитов, гистиоцитов, фибробластов, определялись язвенные дефекты диаметром в среднем 0,6 мм на 3-и сут, 1 мм – на 5-е сут, 0,5 мм – на 7-е сут (табл. 2). В динамике БК в очаге повреждения количество лимфоцитов на 5-е сут было выше, чем на 3-и сут наблюдения, а на 7-е – выше, чем на 3-и и 5-е сут, количество нейтрофилов на 7-е сут было ниже, чем на 3-и и 5-е сут, количество эозинофилов на 5-е и 7-е сут было меньше, чем на 3-и сут, количество гистиоцитов, плазмочитов и фи-

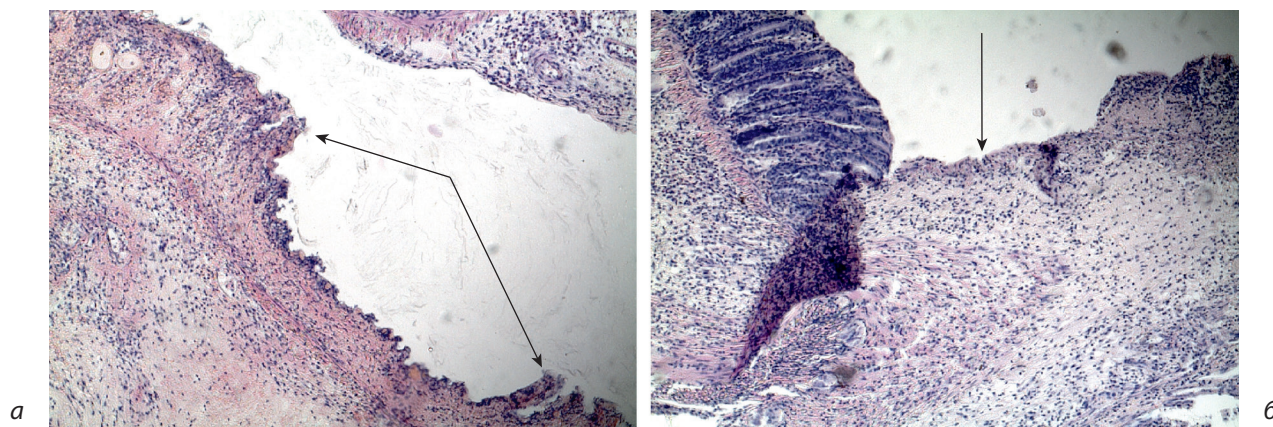


Рис. 1. Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 3-и сут БК: а – без лечения – язвенный дефект (стрелки) в пределах слизистой оболочки толстой кишки (окраска гематоксилин-эозин, ув. 100); б – при применении экстракта куркумы – язвенный дефект (стрелка) с нарушением целостности собственной пластинки, распространяющийся в подслизистый слой (окраска гематоксилин-эозин, ув. 100).

бробластов последовательно увеличивалось с 3-х к 7-м сут. Диаметр язвенного дефекта на 5-е сут был выше, чем на 3-и, а на 7-е сут меньше, чем на 3-и и 5-е сут. Как видно, максимальные изменения морфометрических показателей зафиксированы на 5-е и 7-е сут наблюдения – от 3-х к 7-м сут наблюдения в очаге повреждения прогрессивно увеличивалось количество лимфоцитов, нейтрофилов, гистиоцитов, плазмацитов и фибробластов. Для интегральной оценки микроскопических изменений в очаге повреждения толстого кишечника использовали индекс повреждения тканей (TDI). В динамике экспериментальной БК на 3-и, 5-е и 7-е сут значения TDI колебались у крыс от 3 до 4, без значимых изменений на 5-е сут по сравнению с

3-ми сут и на 7-е сут по сравнению с 3-ми и 5-ми сут наблюдений. На 3-и, 5е и 7-е сут в стенке толстого кишечника значительно повышается экспрессия МПО. В динамике экспериментальной БК экспрессия МПО на 7-е сут значимо ($p < 0,05$) ниже, чем на 3-и и 5-е сут. Наряду с этим, повышается экспрессия TNF- α на 3-и, 5-е и 7-е сутки наблюдения. В динамике экспериментальной БК экспрессия TNF- α была на 7-е сут значимо ($p < 0,05$) ниже, чем на 3-и и 5-е сут. Как видно, максимальная экспрессия МПО и TNF- α в толстом кишечнике при экспериментальной БК фиксируется на 3-и и 5-е сут эксперимента.

В условиях локального применения экстракта куркумы у животных с БК зафиксированы измене-

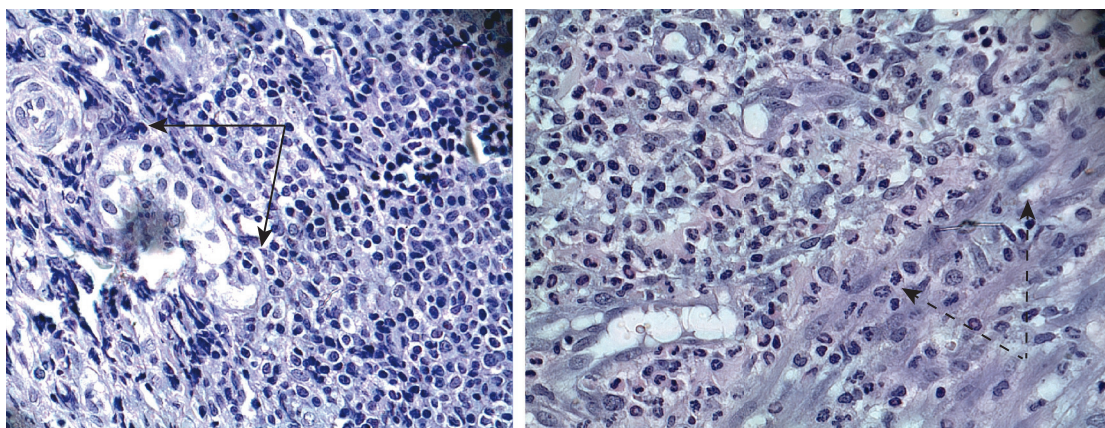


Рис. 2. Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 5-е сут БК: а – без лечения – густая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (стрелки) в подслизистом слое язвенного дефекта (окраска гематоксилин-эозин, ув. 400); б – при применении экстракта куркумы – очаговая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация в подслизистом слое, участки макрофагальной инфильтрации и тяжи пролиферирующих фибробластов (пунктирные стрелки), начальные явления неоваскуляризации (окраска гематоксилин-эозин, ув. 400).

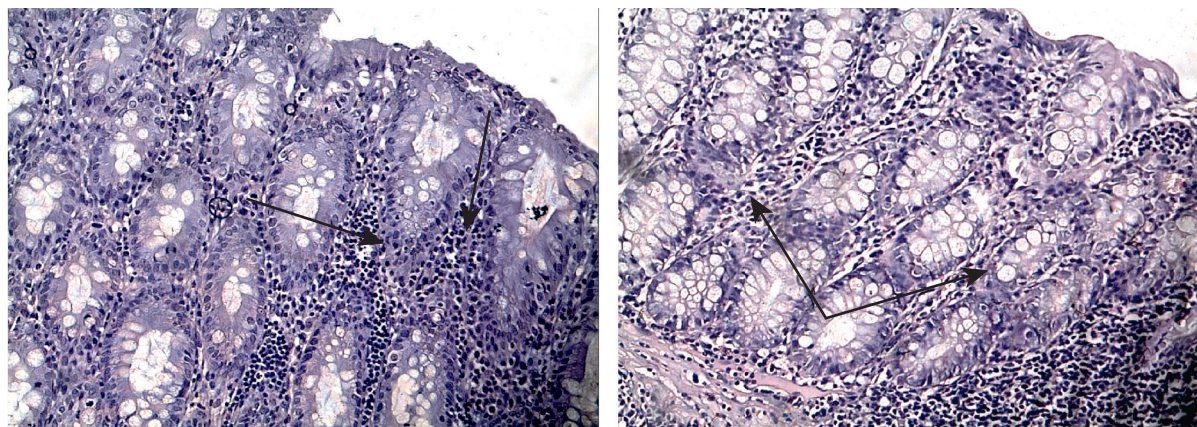


Рис. 3. Морфология очага повреждения на 7-е сут БК: а – без лечения – нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация интерстициальных пространств (стрелки) между укороченными криптами слизистой оболочки рядом с язвенными дефектами (окраска гематоксилин-эозин, ув. 200); б – при применении экстракта куркумы – очаговая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация интерстициальных пространств (стрелки) между криптами (окраска гематоксилин-эозин, ув. 200).

ния клинической картины: увеличилось потребление корма, повысилась двигательная активность крыс в клетках, животные больше времени уделяли грумингу. С 3-х сут наблюдения был отмечен более оформленный стул и отсутствие признаков кишечного кровотечения в виде крови в каловых массах и окрашивания ануса. Указанные симптомы нашли отражение в интегральном показателе оценки клинического статуса DAI: на 3-и сут эксперимента показатель при тенденции к снижению статистически значимо не отличался от значений в контрольной группе, на 5-е и 7-е сут — значимо снижался. Несмотря на снижение значения DAI, на 5-е и 7-е сут эти показатели существенно отличались от значений в группе интактных животных, что позволяет говорить, что на данных сроках наблюдения имеет место частичное восстановление DAI на фоне применения при БК ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы. В динамике экспериментальной БК значения DAI на 5-е сут значимо не отличаются от значений на 3-и сут а на 7-е сут — от значений на 3-и и 5-е сут соответственно ($p > 0,05$).

При оценке морфологических изменений в стенке толстого кишечника при экспериментальной БК на фоне применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы на 3-и сут наблюдения в исследованных фрагментах толстой кишки наблюдались язвенные дефекты, дно которых располагалось в пределах собственной пластинки слизистой оболочки или в подслизистом слое (рис. 1, б), а стенки были представлены отечной слизистой оболочкой. Во всех полях зрения наблюдались явления дисплазии в виде псевдополипов с нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией стромы, покрытых неизменной слизистой оболочкой.

На 5-е сут выявлялось умеренное количество юных веретеновидных фибробластов. Новообразованные сосуды микроциркуляторного русла имели дифференцированные стенки и эндотелиальную выстилку. Новообразованные соединительно-тканые волокна выявлялись в умеренном количестве, были тонкими, извитыми и располагались параллельно поверхности слизистой оболочки. Стенки эрозий представлены слизистой оболочкой обычного гистологического строения, дно эпителизировано за счет пролиферации поверхностного столбчатого эпителия. В перифокальных зонах в подслизистом слое наблюдался умеренный отек межучной ткани и полнокровие сосудов. Стенки язвенных дефектов были представлены дистрофически измененной слизистой оболочкой с укороченными криптами, их просветы расширены, эпителий вакуолизирован, частично слу-

щен в просветы крипт. Непрерывность собственной пластинки слизистой оболочки в проекции язвенных дефектов была местами нарушена, волокна ее разрыхлены, раздвинуты экссудатом, состоящим преимущественно из лимфоцитов и гистиоцитов с примесью умеренного количества нейтрофилов и эозинофилов (рис. 2, б).

На 7-е сут БК наблюдались процессы полной эпителизации дефектов, отмечалось небольшое снижение высоты слизистой оболочки с нарушением рисунка строения: крипты укорочены, просветы их расширены. Отмечалась резкая дисконфлексация крипт за счет густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации интерстициальных пространств, а также сохранение белковой листрофии эпителия крипт с частичной десквамацией клеток в просветы (рис. 3, б).

Результаты морфометрии очага повреждения толстого кишечника при экспериментальной БК на фоне применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы представлены в табл. 2. Инфильтрация очага повреждения толстого кишечника клеточными элементами изменялась неоднозначно в динамике экспериментальной БК. Содержание лимфоцитов значимо уменьшалось на 5-е сут. Количество нейтрофилов было ниже, чем в группе без лечения на всех сроках наблюдения, а количество эозинофилов значимо уменьшалось только на 3-и сут, на 5-е и 7-е сут — только в виде тенденции. Установлено, что содержание гистиоцитов увеличивалось на 3-и сут, уменьшалось — на 7-е сут эксперимента, число плазмочитов — увеличивалось на 3-и сут, уменьшалось — на 5-е и 7-е сут, количество фибробластов — увеличивалось на 3-и сут. На этом фоне размер язвенного дефекта сокращался на 3-и, 5-е и 7-е сут эксперимента. Изменения морфометрических показателей нашли отражение в индексе TDI — он снижался на 5-е и 7-е сут наблюдения. В динамике экспериментальной БК количество нейтрофилов в очаге повреждения на 5-е сут снижалось по сравнению с 3-ми сут, а на 7-е сут — увеличивалось по сравнению с 5-ми сут; размер язвенного дефекта на 7-е сут значимо уменьшался по сравнению с 3-ми сут наблюдения. Отметим, что все исследуемые морфометрические показатели не достигали значений, наблюдаемых в группе интактных животных на всех сроках наблюдения, то есть восстановление было частичным. Особый интерес представляют данные по экспрессии TNF- α и МПО в очаге повреждения толстого кишечника при БК на фоне локального применения экстракта куркумы (табл. 2). На 3-и сут экспрессия TNF- α и МПО значимо не отличается от соответствующих показателей в контрольной группе животных с БК без лечения и сохраняется повышенной

по сравнению с группой интактных животных. На 5-е и 7-е сут наблюдения экспрессия TNF-α и МПО снижается, но сохраняется повышенной по сравнению с группой интактных животных. Полученные данные позволяют говорить о частичном восстановлении экспрессии TNF-α и МПО в очаге повреждения толстого кишечника на 5-е и 7-е сут экспериментальной БК в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы.

Обсуждение

Наблюдаемая нами и другими исследователями клинико-морфологическая картина ТНБС-индуцируемого колита у крыс соответствует изме-

нениям при БК, что позволяет использовать представленную экспериментальную модель для изучения патогенеза и апробации новых терапевтических подходов. Типичная клиническая и морфологическая картина БК наблюдается уже через 48 ч после ректального введения ТНБС. Предполагается, что ТНБС выступает в роли гаптена и индуцирует в стенке толстого кишечника после повторного воздействия Th1-зависимый иммунный ответ против гаптен-модифицированных аутологических белков (или микробных белков кишечной микробиоты). Участие в реакции различных провоспалительных цитокинов и медиаторов приводит к трансмуральной инфильтрации стенки кишки лейкоцитами и развитию воспаления

Таблица 2

Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий на морфометрические показатели в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальной БК [Ме (Q₂₅-Q₇₅)]

Показатели	Группа 1-я (n=7)	Группа 2-я 3-и сут (n=7)	Группа 2-я 5-е сут (n=7)	Группа 2-я 7-е сут (n=7)	Группа 3-я 3-и сут (n=7)	Группа 3-я 5-е сут (n=7)	Группа 3-я 7-е сут (n=7)
ЛЦ, ед./мм ²	350,82 (305,13-368,95)	1485,14 (1295,33-2045,72) *	2138,36 (1312,33-2615,19) *	2961,81 (1867,99-3841,38) *	1652,86 (1562,06-2349,32) *	730,59 (443,34-890,68) * #	2883,89 (1626,01-3423,42) *
НФ, ед./мм ²	196,93 (189,70-214,76)	2888,08 (1608,91-2979,27) *	2736,47 (2111,81-3465,34) *	2584,78 (2366,12-2770,78) *	862,06 (793,65-1210,76) * #	431,56 (246,30-607,28) * #	1273,41 (691,05-1441,44) * #
ЭФ, ед./мм ²	145,63 (120,80-176,15)	1511,33 (1295-1808,78) *	636,13 (373,59-1113,86) *	765,09 (370,82-997,51) *	303,03 (206,89-1345,29) * #	523,08 (98,52--874,70) *	630,63 (565,21--721,64) *
ГЦ, ед./мм ²	13,43 (13,40-13,64)	115,20 (103,47-131,25) *	1048,07 (880,51-1242,23) *	1461,63 (748,13-1867,99) *	1489,36 (1364,93-1565,65) * #	863,39 (689,65-992,90) *	853,65 (790,37-1198,51) * #
ПЦ, ед./мм ²	14,51 (14,35-15,01)	126,90 (123,76-129,53) *	899,32 (524,93-1120,79) *	1007,55 (748,13-1982,65) *	672,64 (557,11-957,44) * #	281,03 (195,12-330,96) * #	412,37 (406,51-450,45) * #
ФБ, ед./мм ²	20,06 (13,55-26,80)	337,37 (258,39-481,34) *	1369,03 (890,58-1706,03) *	1259,44 (991,32-2864,25) *	2730,15 (2172,41-3400,67) * #	977,66 (772,78-1139,68) *	1747,96 (1351,35-1821,31) *
Язвенный дефект, мкм	0	615,00 (288,00-680,50) *	936,00 (815,50--991,50) *	453,00 (349,00--702,50) *	228,50 (172,00--302,00) * #	240,00 (161,00--678,00) * #	244,00 (198,00--364,00) * #
TDI, у.е.	0	3,00 (3,00 – 4,00) *	3,57 (3,00 – 4,00) *	3,42 (3,00 – 4,00) *	3,71 (3,00-4,00) *	2,57 (1,00-3,00) * #	2,42 (1,00-3,00) * #
МПО, ед./мм ²	19,15 (19,00-19,15)	1235,63 (670,49-1590,03) *	1187,73 (814,17-1561,31) *	766,28 (670,49-881,22) *	1070,88 (141,76-1616,85) *	220,31 (134,09-306,51) * #	254,41 (187,35-378,92) * #
TNF-α, ед./мм ²	57,47 (38,31-76,62)	756,71 (632,18-842,91) *	795,19 (593,86-1072,79) *	392,72 (306,51-670,49) *	689,65 (335,24-862,06) *	344,82 (249,04-440,61) * #	244,82 (187,35-355,55) * #

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

[14, 15]. Используемый в качестве растворителя для ТНБС 50% раствор этилового спирта вызывает дополнительное повреждение слизистой оболочки толстого кишечника.

Улучшение клинической картины (снижение выраженности симптомов, уменьшение индекса DAI) при экспериментальной БК в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы соответствует изменениям морфологии в очаге повреждения: уменьшается инфильтрация нейтрофилами с 3-х к 7-м сут, эозинофилами на 3-и сут, лимфоцитами на 5-е сут, гистиоцитами – на 7-е сут, плазмócитами – на 5-е и 7-е сут. С 3-х сут увеличивается представительство плазмócитов, гистиоцитов и фибробластов, планомерно снижается размер язвенного дефекта с 3-х к 7-м сут, индекс TDI уменьшается на 5-е и 7-е сут наблюдения. Можно выделить несколько механизмов протекторного действия экстракта куркумы при БК. Во-первых, локальный антиоксидантный эффект за счет химической структуры (фенольные О-Н и С-Н группы), когда куркумин выступает в роли скавенджера свободных радикалов и антиоксидантного агента, ингибирует активность iNOS, поглощает NO, снижает экспрессию МПО в тканях за счет уменьшения инфильтрации нейтрофилами, угнетения их миграционной способности, дегрануляции [3, 16]. Во-вторых, прямой иммуноотропный эффект куркумина обусловлен регуляцией сигнальных путей: продукции провоспалительных цитокинов, реактантов острой фазы, ЦОГ-2 и др. за счет блокады

MyD88-зависимых механизмов, снижения активности NF- κ B, MAPK, ERK1/2, JNK и p38, а также угнетения созревания дендритных клеток, повышения их толерогенного потенциала, снижения активности Th1, Th17 [4]. Наконец, куркумин обладает антимикробным эффектом, регулирует состав кишечной микрофлоры в целом, увеличивает продукцию бактериями короткоцепочечных жирных кислот, обеспечивая защиту энтероцитов [17, 18]. Сам куркумин подвергается влиянию ферментов бактерий, образуя фармакологически более активные метаболиты [19]. Полагаем, что увеличение количества в очаге повреждения на 3-и сут плазмócитов, гистиоцитов и фибробластов отражает активацию репаративных процессов после первичной и вторичной альтерации стенки кишечника, что может быть обусловлено как меньшей по силе и продолжительности вторичной альтерации в очаге повреждения толстого кишечника с участием ферментов, АФК и азота, цитокинов и др. факторов, так и активацией миграции, пролиферации и дифференцировки клеток рост-стимулирующими сигналами из очага повреждения в стенке кишечника и/или поступающими из кровотока. Нами при БК, а также при БК в условиях применения экстракта куркумы проведен корреляционный анализ между индексом активности болезни (DAI) и морфометрическими показателями—индексом повреждения ткани (TDI), экспрессией TNF- α и МПО в очаге повреждения толстого кишечника. Результаты представлены в табл. 3. Максимальное количество положительных, средней

Таблица 3

Корреляция при БК между индексом активности болезни (DAI, у.е.) и морфометрическими показателями

Показатели	Группа 2-я 3-и сут	Группа 2-я 5-е сут	Группа 2-я 7-е сут	Группа 3-я 3-и сут	Группа 3-я 5-е сут	Группа 3-я 7-е сут
ЛЦ, ед./мм ²	R=0,45	R=0,28	R=0,43	R=0,32	R=0,21	R=0,49
НФ, ед./мм ²	R=0,51	R=0,57	R=0,32	R=0,19	R=0,23	R=0,16
ЭФ, ед./мм ²	R=0,23	R=0,19	R=0,43	R=0,23	R=0,14	R=0,14
ГЦ, ед./мм ²	R=0,47	R=0,57	R=0,51	R= - 0,49	R=0,49	R=0,44
ПЦ, ед./мм ²	R=0,64	R=0,44	R=0,51	R= - 0,44	R=0,51	R=0,76
ФБ, ед./мм ²	R=0,32	R=0,28	R=0,67	R= - 0,32	R=0,21	R=0,55
Язв. дефект, мкм	R=0,63	R=0,71	R=0,63	R=0,51	R=0,68	R=0,68
TDI, у.е.	R=0,74	R=0,71	R=0,68	R=0,78	R=0,71	R=0,71
МПО, ед./мм ²	R=0,47	R=0,54	R=0,49	R=0,60	R=0,68	R=0,54
TNF- α , ед./мм ²	R=0,39	R=0,51	R=0,57	R=0,55	R=0,57	R=0,51

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена ®. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

силы связей выявлено между DAI и TDI, инфильтрацией гистиоцитами, плазмочитами, размером язвенного дефекта и экспрессией TNF- α и МПО в толстом кишечнике.

Выводы:

При экспериментальной ТНБС-индуцированной болезни Крона на 3-и, 5-е и 7-е сут наблюдения в толстом кишечнике размер язвенных дефектов, инфильтрация стенки нейтрофилами, лимфоцитами, плазмочитами, гистиоцитами, фибробластами, индекс повреждения ткани, экспрессия МПО и TNF- α ассоциированы с индексом клинической активности заболевания.

Применение каждые 12ч оригинальных ректальных суппозиториев с 0,075 мг экстракта куркумы при экспериментальной БК приводит с максимальным эффектом на 5-е и 7-е сут наблюдения к снижению выраженности клинических и морфологических признаков заболевания, включая размер язвенного дефекта, индекс повреждения ткани, инфильтрацию стенки кишечника нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами, плазмочитами, гистиоцитами, фибробластами, экспрессию МПО и TNF- α .

Литература

(п.п. 2-4; 8-19 см. References)

1. Ставцев Д.С., Астрелина Т.А., Азова М.М., Лебедева Л.Л., Пухликова Т.В., Чумак А.А. и др. Иммуногенетические маркеры болезни Крона у взрослого населения Московского региона. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2014; 4: 743-9.
2. Weissshof R., El Jurdi K., Zmeter N. Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Advances in therapy*. 2018; 35(11): 1746-62.
3. Boozari, M., Butler A., Sahebkar A. Impact of curcumin on toll-like receptors. *Journal of cellular physiology*. 2019; 234(8): 12471-82.
4. Kakhkhaie, K.R., Mirhosseini A., Aliabadi A., Mousavi M., Haftcheshmeh S.M., Sathyapalan T., et al. Curcumin: a modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system. *Inflammopharmacology*. 2019; 27(5): 885-900.
5. Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Ogneva O.I. The antioxidant effect of turmeric extract in rectal suppositories of the original composition in experimental Crohn's disease. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 169(3). Available at: <http://iramn.ru/journals/bbm/2020/3/4938> (Accessed: 26 April 2020). (in Russian)
6. Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E., Bojko M.S. Comparative analysis of the influence of rectal suppositories with curcumin on the concentration of igg and IgM in blood serum in experimental Crohn's disease. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal*. 2019; 13(3): 1235-8. (in Russian)
7. Osikov M.V., Simonyan E.V., Bakeeva A.E. Immune effects of curcuma longa extractum as a part of rectal suppositories in experimental Crohn's disease. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2019; 5. Available at: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29207> (Accessed: 26.04.2020). (in Russian)
8. Couch, D.G., Maudsley H., Doleman B., Lund J.N. The Use of Cannabinoids in Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Inflammatory bowel diseases*. 2018; 24(4): 680-97.
9. Rodrigues de Carvalho, L., de Brito T.V., Simião da C Júnior J., José Dias Júnior G., de Aguiar Magalhães D., Guimarães Sousa S., et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2018; 102: 278-85.
10. Zhao, M., Zhu W., Gong J., Zuo L., Zhao J., et al. Dietary Fiber Intake is Associated with Increased Colonic Mucosal GPR43+ Polymorphonuclear Infiltration in Active Crohn's Disease. *Nutrients*. 2015; 7(7): 5327-46.
11. Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989; 96: 795-803.
12. Kim J.J., Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *Journal of visualized experiments*. 2012; 60. Available at: <https://www.jove.com/video/3678/investigating-intestinal-inflammation-in-dss-induced-model-of-ibd> (Accessed: 26 April 2020).
13. Yao, J., Lu Y., Zhi M., Hu P., Wu W., Gao X. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR- γ /NFAT. *Molecular medicine reports*. 2017; 16(6): 8315-8322.
14. Antoniou E., Margonis G.A., Angelou A., Pikouli A., Argiri P., Karavokyros I. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Annals of medicine and surgery*. 2016; 11: 9-15.
15. Bramhall M., Flórez-Vargas O., Stevens R., Brass A., Cruickshank S. Quality of methods reporting in animal models of colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2015; 21(6): 1248-59.
16. Desai S.J., Prickril B., Rasooly A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. *Nutrition and cancer*. 2018; 70(3): 350-75.

References

1. Stavtsev D.S., Astrelina T.A., Azova M.M., Lebedeva L.L., Puhlikova T.V., Chumak A.A., et al. Immunogenetic markers of Crohn's disease in adult population of the Moscow region. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2014; 4: 743-9. (in Russian)

17. Burge K., Gunasekaran A., Eckert J., Chaaban H. Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(8). Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/8/1912> (Accessed: 18 April 2020).
18. Peterson C.T., Vaughn A.T., Sharma V., Chopra D., Mills P.J., Peterson S.N., et al. Effects of turmeric and curcumin dietary supplementation on human gut microbiota: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Journal of evidence-based integrative medicine*. 2018; 23: 1-8.
19. Pluta R., Januszewski S., Ułamek-Kozioł M. Mutual Two-Way Interactions of Curcumin and Gut Microbiota. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(3). Available at: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1055> (Accessed: 25 April 2020).

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: prof.osikov@gmail.com;

Симоная Елена Владимировна, канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: elenasimonian@yandex.ru; **Бакеева Алина Евгеньевна**, лаборант каф. химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: a.kurenkova01@yandex.ru;

Астахова Людмила Витальевна, канд. мед. наук, физиотерапевт ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», e-mail: bonikva@mail.ru