

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

УДК 616.092.9

На правах рукописи

Бакеева Алина Евгеньевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ЭКСТРАКТОМ
КУРКУМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Осиков Михаил Владимирович
доктор медицинских наук,
профессор

Симонян Елена Владимировна
кандидат фармацевтических
наук, доцент

Екатеринбург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 - СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТЕРАПИИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	14
1.1 - Общая характеристика воспалительных заболеваний кишечника (эпидемиология, патоморфология, этиология).....	14
1.2 - Роль оксидативного стресса при воспалительных заболеваниях кишечника.....	21
1.3 - Иммунологические аспекты патогенеза воспалительных заболеваний кишечника.....	24
1.4 - Перспективные терапевтические подходы при воспалительных заболеваниях кишечника.....	28
1.5 - Куркума длинная как потенциальный источник для создания новых лекарственных форм с мультитропным действием.....	32
ГЛАВА 2 - МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 - Материалы исследования	37
2.2 - Методы исследования.....	39
2.2.1 - Клинические методы исследования.....	39
2.2.2 - Гематологические и иммунологические методы исследования.....	40
2.2.3 - Биохимические методы исследования.....	44
2.2.4 - Морфологические и иммуногистохимические методы исследования.....	47
2.2.5 - Фармацевтические методы исследования.....	49
2.2.6 - Методы статистической обработки результатов.....	56
ГЛАВА 3 - ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ГОМЕОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ	58
3.1 - Клинико-морфологическая верификация экспериментального колита.....	58

3.2 - Изменения параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите.....	68
3.3 - Изменения параметров адаптивного иммунитета при экспериментальном колите.....	77
3.4 - Изменения параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите.....	81
3.5 - Экспериментальное обоснование состава и стандартизация ректальных суппозиторий, содержащих спиртовой экстракт корневищ куркумы длинной.....	87

ГЛАВА 4 - ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ГОМЕОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ЭКСТРАКТОМ КУРКУМЫ.....

4.1 - Клинико-морфологическая характеристика экспериментального колита в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы.....	104
4.2 - Изменения параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы.....	114
4.3 - Изменения параметров адаптивного иммунитета в крови при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы.....	121
4.4 - Изменения параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы.....	126

ГЛАВА 5 - СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ЭКСТРАКТОМ КУРКУМЫ И РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С 5-АМИНОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА ПАРАМЕТРЫ ГОМЕОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ.....

5.1 - Клинико-морфологическая характеристика экспериментального колита в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой.....	136
5.2 - Изменения параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой.....	149
5.3 - Изменения параметров адаптивного иммунитета в крови при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой.....	156
5.4 - Изменения параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой.....	161
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	173
ВЫВОДЫ.....	191
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	193
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	193
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	196

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработки. В мире и в России показатели заболеваемости воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) варьируют в широких пределах, но позволяют уверенно говорить о росте. По данным систематических обзоров, в Европе (1930–2008 гг.) заболеваемость болезнью Крона (БК) в среднем составляла 12,7 на 100 000 человеко-лет, в Северной Америке - 20,2 на 100 000 человеко-лет, в РФ распространенность БК составляет 5-20 случаев на 100 тыс. [15, 38, 210]. Заболеваемость язвенными колитом (ЯК) варьирует от 27 до 117 на 100 тыс. населения в различных странах мира. В Европе, по данным когортных исследований, заболеваемость ЯК возросла с 6,0 на 100 тыс. человеко-лет в 1962 г. до 9,8 на 100 тыс. человеко-лет в 2010 г. [87], по другим данным - до 24,3 на 100 тыс. человеко-лет, а распространенность составляет до 1% населения [244, 298]. Наиболее высокая частота встречаемости ВЗК отмечается в экономически развитых странах, особенно в Великобритании, Израиле, Австралии и РФ; низкая - в странах Азии и Южной Америки. Особое значение имеет увеличение заболеваемости ВЗК у молодых трудоспособных граждан, а также высокая вероятность развития осложнений при ВЗК [158].

Патогенез ВЗК до конца не изучен. Ключевым фактором выступает иммунный ответ в генетически восприимчивом организме на антигены кишечной микрофлоры и измененной слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) с поляризацией в сторону Th1- и Th17- зависимых реакций при развитии БК, Th2-зависимых реакций при развитии язвенного колита (ЯК) [189, 301], дефицитом Treg, активацией моноцитов/макрофагов, нейтрофилов и др. клеток. Медиаторами повреждения стенки кишечника выступают ферменты, активные формы кислорода (АФК) в условиях дисбаланса системы прооксиданты-антиокислительная защита, про- и противовоспалительные цитокины, хемокины, факторы роста в условиях цитокинового дисбаланса, иммуноглобулины, реактанты острой фазы и др. [163, 183, 214, 261, 288]. Комплексная оценка изменений гомеостаза при экспериментальном колите, включая клинические

признаки, исследование факторов врожденного и адаптивного иммунитета в крови, морфологии и редокс-статуса очага повреждения позволит дополнить имеющиеся представления о механизме развития воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), обозначить ведущие звенья патогенеза в качестве цели патогенетической терапии, диагностических и прогностических маркеров.

Не менее 30% пациентов с ВЗК рефрактерны к базисной терапии, у многих возникает широкий спектр побочных явлений, ограничивающих ее применение [120, 305]. В связи с этим, альтернативные терапевтические стратегии при ВЗК являются объектом внимания многих исследовательских групп, могут включать применение пребиотиков, мезенхимальных стволовых клеток, толерогенных цитокинов и клеток, ингибиторов адгезивных молекул, новых антицитокиновых препаратов, антиоксидантов и др. [128, 214, 305]. Востребованным является разработка новых, обоснованных с патогенетических позиций и безопасных лекарственных средств преимущественно локального действия с активными веществами эндогенного или растительного происхождения [105]. В экспериментальных и клинических условиях продемонстрирована эффективность применения при ВЗК таких растительных средств как босвеллия серрата, алоэ вера, андрографис метельчатый, вяз жёлтый и мн. др., что во многом обусловлено наличием в их составе полифенолов и флавоноидов [162, 179]. В этом отношении привлекает внимание экстракт корневищ Куркумы длинной (*Curcuma longa*), содержащий куркуминоидный комплекс, плеiotропные эффекты которого, включая антиоксидантные, цитопротекторные, антиапоптогенные, противовоспалительные, иммуномодулирующие, антимикробные и др., были продемонстрированы в клинических и экспериментальных условиях при хронических воспалительных заболеваниях, что предполагает его эффективность при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) [80, 138, 157]. В РФ отсутствуют зарегистрированные лекарственные формы, содержащие куркумин, за исключением биологически активных добавок, что существенно ограничивает его изучение и возможности для применения при ВЗК.

Цель исследования. С патогенетических позиций обосновать эффективность применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы оригинального состава при экспериментальном колите.

Задачи исследования:

1. При экспериментальном колите исследовать количественный состав лейкоцитов и субпопуляций лимфоцитов, функциональную активность нейтрофилов в крови, концентрацию в сыворотке IL-23, IgM, IgG, содержание миелопероксидазы, TNF- α и параметры свободнорадикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника.
2. Выявить характер связи между клиническими, морфологическими признаками, иммунологическими параметрами и параметрами свободнорадикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите.
3. При экспериментальном колите исследовать влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на клинические, морфологические, иммунологические параметры, параметры свободнорадикального окисления в крови и в тканях очага повреждения толстого кишечника.
4. Провести сравнительный анализ влияния экстракта куркумы и 5-аминосалициловой кислоты в составе ректальных суппозиториев на клинические, морфологические, иммунологические параметры, параметры свободнорадикального окисления в крови и в тканях очага повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите.

Научная новизна исследования. При экспериментальном колите проведен комплексный анализ изменений клинических параметров, параметров врожденного и адаптивного иммунитета, морфологии и свободнорадикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника. Продемонстрировано, что клинические и морфологические признаки заболевания ассоциированы с увеличением в крови количества CD3⁺, CD45RA⁺ лимфоцитов, моноцитов,

нейтрофилов, повышением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, увеличением концентрации IL-23, IgM, IgG, повышением в очаге повреждения кишечника содержания TNF- α и миелопероксидазы, накоплением первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов преимущественно в изопропанольной фазе липидного экстракта и преимущественно вторичных продуктов окислительной модификации белков основного характера.

Впервые предложен состав, разработана технология и методы стандартизации ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длиной на гидрофильной основе, содержащей преимущественно полиэтиленгликоли с различной молекулярной массой. На данный состав получен патент (патент на изобретение № 2743427). Отмечено, что применение при экспериментальном колите ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы уменьшает выраженность клинических признаков заболевания, что сопоставимо с эффектом базисного средства 5-аминосалициловой кислоты в составе ректальных суппозиториях и более выражено ограничивает деструктивные явления и активирует репарацию в очаге повреждения толстого кишечника, включая размер язвенного дефекта, инфильтрацию нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами, плазмоцитами, гистиоцитами, фибробластами.

Установлено, что механизм протекторного действия экстракта куркумы при экспериментальном колите связан с уменьшением содержания в очаге повреждения толстого кишечника продуктов перекисного окисления липидов и продуктов окислительной модификации белков, частичным восстановлением резервно-адаптационного потенциала, снижением в крови количества нейтрофилов и CD3⁺ лимфоцитов, увеличением количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижением концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке и содержания TNF- α , миелопероксидазы в очаге повреждения толстого кишечника. Сравнительный анализ эффектов при экспериментальном колите экстракта куркумы и 5-аминосалициловой кислоты в

составе ректальных суппозиториев выявил их сопоставимость в отношении параметров адаптивного иммунитета в крови, свободнорадикального окисления и содержания миелопероксидазы и TNF- α в очаге повреждения, меньшую выраженность эффектов экстракта куркумы в отношении параметров врожденного иммунитета в крови и большую выраженность по ограничению деструктивных явлений и активации репарации в очаге повреждения толстого кишечника.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе проведенного исследования в экспериментальных условиях получены новые фундаментальные знания о закономерностях изменений иммунологических параметров в крови, редокс-статуса и морфологии очага повреждения при экспериментальном колите, что расширяет современное представление о механизме развития воспалительных заболеваний кишечника. Показано, что клинические и морфологические признаки заболевания при экспериментальном колите связаны, в том числе, с параметрами врожденного и адаптивного иммунитета в крови, свободнорадикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника. Полученные результаты комплексной оценки изменений гомеостаза при экспериментальном колите могут быть использованы для обоснования разработки новых терапевтических подходов и диагностических маркеров.

Разработан состав и с патогенетических позиций обосновано применение при экспериментальном колите нового лекарственного средства экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев, которое позволяет снизить выраженность клинических признаков сопоставимо с эффектом ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой и значимо ограничить деструктивные явления и активировать репарацию в очаге повреждения. Показано, что механизм протекторного действия экстракта куркумы реализуется за счет локального антиоксидантного эффекта в очаге повреждения, коррекции врожденного и адаптивного иммунитета. Представленные в работе экспериментальные результаты являются предпосылкой для проведения

дальнейших исследований по эффективности применения экстракта куркумы при экспериментальном колите с последующим внедрением нового лекарственного препарата в клиническую практику.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы была спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. Организация исследования одобрена этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от 14.01.2017, протокол № 1 от 22.01.2020).

Экспериментальные исследования выполнены на 210 крысах линии Wistar массой 240 ± 20 г в экспериментально-биологической клинике (виварий) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Эксперимент проводился при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года, Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Методы исследования включали: экспериментальное моделирование, оценку клинических симптомов по индексу активности болезни (disease activity index, DAI), гематологические, биохимические, иммунологические, иммуноферментного анализа и иммуногистохимические с использованием специфических тест-систем для крыс, морфологические, фармацевтические, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Клинические симптомы и морфологические признаки экспериментального колита взаимосвязаны с параметрами врожденного и адаптивного иммунитета, параметрами свободнорадикального окисления в крови и в тканях очага повреждения толстого кишечника.
2. Применение при экспериментальном колите ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы оригинального состава снижает выраженность клинических признаков, ограничивает деструктивные явления и активизирует репаративные процессы в очаге повреждения, что сопоставимо с эффектом ректальных суппозиториях с 5-аминосалициловой кислотой.
3. Протекторное действие ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы при экспериментальном колите включает эффекты, ограничивающие перекисное окисление липидов, окислительную модификацию белков, локализованных в тканях очага повреждения, полное или частичное восстановление иммунологических параметров в крови.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдении экспериментального фрагмента работы, полноте и широте литературно-библиографической справки, использовании современных методов статистической обработки материалов исследования с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 19.

Основные положения диссертации представлены на IX международной (XVI итоговой) научно-практической конференции молодых учёных ЮУГМУ (Челябинск, 2018); XXV всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2019); VIII научно-практической конференции «Клеточные технологии – практическому здравоохранению» (Екатеринбург, 2019); XXVI всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2020).

Личный вклад автора в проведенное исследование. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, формулировка рабочей гипотезы, постановка целей и задач, разработка дизайна исследования проводилось совместно с научными руководителями. Выбор и обоснование методов и экспериментальной модели, набор, анализ и интерпретация экспериментального материала, поиск, анализ и обобщение данных отечественной и зарубежной научной литературы, статистическая обработка данных, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях, написание и оформление рукописи выполнены лично автором. Биохимические, иммунологические, морфологические, иммуногистохимические и фармацевтические исследования выполнены автором лично и при участии сотрудников кафедры Патологической физиологии, кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета, научных сотрудников НИИ Иммунологии, Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России и ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры Патологической физиологии, кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, научную работу научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области, на данный состав получен патент (патент на изобретение № 2743427).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.03

– патологическая физиология, а именно пунктам 2, 6, 8, 9, 10 области исследования, указанной в паспорте данной специальности.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 12 работ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 8 из которых - по специальности патологическая физиология (из них 4 – на электронном ресурсе), в том числе 6 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (Web of Science, Scopus), 4 – в материалах конференций, в том числе – 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 238 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей материалы и методы исследования, изложения результатов собственного исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Библиографический указатель включает 42 отечественных и 274 зарубежных источника литературы. Работа содержит 51 таблицу и 40 рисунков.

ГЛАВА 1 - СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ТЕРАПИИ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 - Общая характеристика воспалительных заболеваний кишечника (эпидемиология, патоморфология, этиология)

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) представляют собой группу патологий, к числу которых относятся болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК). Язвенный колит (ЯК) является хронической рецидивирующей патологией желудочно-кишечного тракта неясной этиологии с развитием язвенно-некротических изменений, преимущественно в дистальных отделах толстой кишки и развитием местных системных осложнений, а также внекишечных проявлений [16, 38, 40]. Впервые ЯК был описан в 1859 г S. Wilks, в 1875 г приведена его морфологическая характеристика [40].

Первый пик заболеваемости ЯК отмечался между 20 и 40 годами жизни с преобладанием патологии у мужчин, второй отмечен в возрасте 55 лет. Особую настороженность вызывает увеличение частоты ЯК в педиатрической практике [115]. Частота встречаемости ЯК одинакова у мужчин и женщин с небольшим превосходством числа случаев у мужчин [184]. Согласно данным российской ассоциации колопроктологов и ассоциации гастроэнтерологов по диагностике и лечению ЯК, распространенность ЯК составляет от 21 до 268 случаев на 100 тысяч. Отмечается, что данный показатель возрос примерно в 6 раз за последние 40 лет [20].

В подавляющем большинстве случаев основное поражение, вызванное ЯК, распространено в области толстой кишки [20], что отличает его от БК, поражающей преимущественно илеоцекальный отдел. Маркерами ЯК являются множественные эрозии, язвы, гиперемии слизистой оболочки толстого кишечника с последующим вовлечением прямой кишки [20], что существенно отличает

патологию от БК, характеризующейся фокальным воспалением и наличием гранулем, состоящих из эпителиальных клеток и клеток иммунной системы вокруг очага некроза, ближе к центру располагаются клетки Лангханса, окруженные фиброзным ободком и поясом из лимфоцитов и плазмоцитов [2]. Распространение хронического воспалительного процесса, характерного для ЯК чаще всего ограничивается слизистой оболочкой и носит диффузный характер, в то время как при БК воспалительный процесс распространяется на всю толщу стенки кишечника с формированием трансмурального воспаления [11, 35].

К ведущим группам этиологических факторов как ЯК, так и БК относят генетические, экологические, микробные, иммунные (рисунок 1). Таким образом, ВЗК можно рассматривать как гетерогенное полиэтиологичное заболевание, возникающее в условиях взаимодействия генетических факторов и факторов окружающей среды [71, 95, 171, 279].

Наследственные особенности ВЗК изучены не полностью, у 16% пациентов присутствуют кровные родственники, страдающие ВЗК, а риск возникновения возрастает примерно в 8 раз при наличии родственников с ВЗК [197, 310]. К числу генов, ассоциированных с ВЗК относят NOD2 – активатор NF-κB, индуктор аутофагии дендритных клеток и незавершенного фагоцитоза, снижения иммунного ответа на пептидогликаны клеточной стенки микробов [109, 182, 190]. Имеют значение гены аутофагии IRGM и ATG16L1, гены рецептора IL23R, рецепторной тирозин фосфатазы P, TLR-4 и др., всего около 30 уникальных локусов [98, 191]. С помощью картографии хромосомы 16 на ее длинном плече в локусе IBD1 удалось идентифицировать ген, ответственный за предрасположенность к ВЗК, участвующий в регуляции иммунного ответа, макрофагального апоптоза и проницаемости кишечного барьера по отношению к бактериальным липополисахаридам [11]. Среди моногенных дефектов следует упомянуть дефекты генов IL-10 и его рецепторов - IL10RA, IL10RB [270].



Рисунок 1 - Группы этиологических факторов при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) (Loddo I. et al., 2015) [197].

Большое значение придают эпигенетическим изменениям хроматина и его организации в ядре как механизмам, через которые экологические, микробные, иммунные факторы могут влиять на вероятность возникновения, патогенез и прогрессирование воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Эпигенетические изменения включают ацетилирование и деацетилирование, метилирование и деметилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование, дезаминирование и др. изменения гистонов и нуклеотидов [255]. Через эпигенетические механизмы поддерживается гомеостаз кишечного эпителия (пролиферация, дифференцировка, секреция), пролиферация и дифференцировка иммунокомпетентных клеток в составе мукозального иммунитета, модулируется иммунный ответ против потенциальных патогенов,

экспрессия различных генов у больных с ВЗК [195, 244].

Деметилирование гистона JMJD3 имеет значение в регуляции дифференцировки и экспрессии генов в Т-лимфоцитах и возникновении ВЗК в эксперименте [196]. При ВЗК показана роль эпигенетических изменений генов TGF- β , IL-6, IL-21 и IL-23, продукты которых участвуют в дифференцировке субпопуляций Т-лимфоцитов - Th17 и Treg [192]. Интересно, что снижение ацетилирования гистонов гена IL-10 при ВЗК приводит к уменьшению синтеза этого цитокина в стенке кишечника и, как следствие, избыточному воспалению [57]. Показательно, что ряд экспериментальных терапевтических агентов при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) оказывают свое действие через эпигеномные механизмы [50].

В возникновении ВЗК большую роль отводят микроРНК, участвующей в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета за счет изменения активности генов на эпигеномном уровне, включая NOD-подобные рецепторы, TLR, антигены Th17 [310]. Продемонстрирована роль микроРНК-155 у больных с ВЗК за счет регуляции активности В-клеток, снижение продукции IL-10 и увеличение синтеза TNF- α [145, 227, 313]. Активно изучается роль длинных некодирующих РНК в возникновении ВЗК через регуляцию экспрессии генов, локализации и стабильности белков, ремоделирование хроматина; показана роль длинных некодирующих РНК при ВЗК в регуляции функции Treg, активности NF- κ B-зависимых путей и др. [135].

Одна из концепций возникновения ВЗК посвящена дисрегуляции иммунного ответа на микрофлору кишечника. Это связано с реализацией наследственных дефектов, изменяющих активность локального иммунитета на нормальную микрофлору, баланс в составе микрофлоры, который вызывает патологический иммунный ответ на обычные микроорганизмы кишечника, что было подтверждено при моделировании ВЗК [117, 278]. Косвенно о роли измененной кишечной микробиоты в развитии ВЗК, и в частности ЯК свидетельствует повышенный титр антител против микроорганизмов кишечной микробиоты в сыворотке [209]. Наконец, экспериментальное моделирование ВЗК

на животных требует наличия микробиома в кишечнике [117]. Специфические изменения кишечной микробиоты у больных с ЯК включает преобладание в толстом кишечнике представителей *H. pylori*, *Salmonella*, *Campylobacter*, при БК - *E.coli* и др. *Enterobacteriaceae*, снижение количества *Firmicutes*, бифидо-, лактобактерий, *Ruminococcus gnavus* и др. изменения [65, 82, 137, 230, 301].

Ряд исследователей отводят ключевую роль в этиологии БК *Mycobacterium avium*, подвид *paratuberculosis*, другие – не разделяют этого мнения [219]. У больных с БК в микробиоме кишечника зафиксировано значительное снижение представительства микроорганизмов, продуцирующих бутират и увеличение микробов с муцин деградирующим потенциалом, однако вопрос о первичности данных изменений остается открытым [281]. Отмечают потенциальную вовлеченность вируса Эпштейна-Барра в этиологию и развитие ЯК [82]. Важное значение в этиологии ВЗК придают взаимодействию грибковых сообществ кишечника с иммунокомпетентными клетками через рецептор Dectin-1 [152]. *Clostridium difficile* рассматривается как фактор риска возникновения ВЗК после использования антибиотиков [82].

Накоплено много гипотез о роли экологических факторов в возникновении ВЗК, которые рассматриваются как промежуточное звено дисрегуляции иммунного ответа на микрофлору кишечника в условиях наследственной предрасположенности и как модифицируемые факторы риска ВЗК [184, 185]. Курение табака ассоциируется с высоким риском ВЗК в связи с негативными эффектами компонентов табачного дыма: активации апоптоза эпителиоцитов кишечника, повышением проницаемости кишечной стенки, снижением пролиферации Т-лимфоцитов, активации макрофагов кишечной стенки [141]. Оксид углерода (II) табачного дыма активирует факторы врожденного иммунитета в стнке кишечника и участвует в патогенезе ВЗК [207]. Компоненты сигаретного дыма инициируют и поддерживают окислительный стресс в кишечнике, повышают активность iNOS, изменяют состав кишечной микрофлоры [233]. Отказ от курения при БК, но не ЯК рассматривается как одна из терапевтических стратегий [293].

Диета – один из триггерных факторов возникновения воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) за счет влияния компонентов пищи и режима питания на проницаемости кишечной стенки, экспрессию микробных антигенов кишечной флоры, воздействие на факторы локального иммунитета [167, 257]. Неблагоприятными являются высокий уровень потребления насыщенных жиров и рафинированных углеводов в составе газированных напитков, кондитерских изделий [153, 201]. Потребление рыбы отрицательно коррелирует с признаками БК и рекомендуется к употреблению больными [201]. Проведены исследования и показана связь ожирения, продукции адипокинов и возникновения ВЗК [176]. Использование подходов нутригенетики и нутригеномики позволит разрабатывать индивидуальные терапевтические подходы при ВЗК [161]. Особое значение придается влиянию диеты на состав кишечной микрофлоры, в том числе, наличие в пище углеводов, способных метаболизироваться в короткоцепочечные жирные кислоты (бутират, пропионат), необходимые для поддержания баланса кишечной микробиоты, нормальной проницаемости кишечника, pH кишечника [258].

Результаты эпидемиологических исследований показали более низкий риск возникновения ВЗК при высоком потреблении овощей и фруктов, водорослей, грибов, что обусловлено эффектом содержащейся в них клетчатки [146]. Данный эффект не сохранялся в отношении клетчатки, содержащейся в крупах зерновых культур и отрубях [47]. Полифенолы в составе пищевых продуктов (виноград, ягоды, арахис, куркума, зеленый чай и др.) за счет антиоксидантного эффекта, противовоспалительного, иммуномодулирующего, антиапоптогенного, пребиотического действия показали свою эффективность при ВЗК [138, 160]. Такие диетические добавки как верблюжье молоко, оливковое масло, пищевые компоненты, богатые витаминами А, С, Е, микроэлементами Se, Cu, Zn, рассматриваются как факторы, препятствующие возникновению, приводящие к индукции и пролонгации ремиссии при ВЗК за счет антиоксидантного и иммуномодулирующего действия [61, 64, 66, 232].

Результаты многих исследований демонстрируют роль витамина D в инициации и патогенезе ВЗК [265, 306]. Так, пониженная концентрации в сыворотке 25(OH)D на 1 нг/мл увеличивает показатели смертности при ЯК и увеличивает продолжительность терапии, а применение УФ-излучения благоприятно влияет на течение ЯК, снижает риск осложнений [188]. Кроме того, низкий уровень витамина D в плазме коррелирует с необходимостью хирургического лечения и госпитализации при БК [46]. Применение витамина D при экспериментальной БК оказывает положительный эффект, в том числе, за счет снижения активности гена TNF- α [316].

Потребление алкоголя за счет активации процессов свободно-радикального окисления неблагоприятно сказывается на состоянии слизистой ЖКТ, вызывает ее прямое и опосредованное повреждение и связано с патогенезом ВЗК. Спорным является вопрос о влиянии на возникновение ВЗК потребления красного вина за счет содержащихся в нем полифенольных соединений [76].

Многие исследователи полагают, что частое применение нестероидных противовоспалительных препаратов, особенно в большой дозе и длительно, в несколько раз увеличивает риск возникновения ВЗК, что наиболее характерно для женщин и детей и связано со снижением синтеза и протективной роли простагландинов в составе слизи кишечника [236]. Эпидемиологические исследования с 1980-х гг. свидетельствуют о роли противозачаточных лекарственных средств в этиологии ВЗК [108].

Загрязнение окружающего воздуха оксидом азота (IV) дозо-зависимо ассоциировано с риском возникновения ВЗК, связь зависит от возраста и усиливается при проживании в городских районах, опосредовано изменением состава кишечной микробиоты [251]. В качестве фактора риска ВЗК рассматривается загрязнение окружающей среды или контакт в бытовых, производственных условиях с соединениями ртути [247]. Продемонстрирована связь между возникновением ВЗК и такими факторами как стресс, тревога, депрессия, психологическая коморбидность, низкая физическая активность,

нарушение режима и качества сна и др. факторами [47, 48, 61]. Сведения об ассоциации ВЗК с аппендэктомией противоречивы [49].

Представленные в обзоре группы этиологических факторов: генетические, экологические, микробные, приводят к изменению кишечного барьера: повышению проницаемости кишечного эпителия, снижению синтеза антимикробных пептидов (альфа- и бета-дефенсины, LL-37, SLPI, элафин и др.) клетками Панета, нарушению аутофагии, что рассматривается Vannaga A.S. et al., Park H.J. et al. как ключевое событие для возникновения воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), в том числе за счет проникновения кишечной микрофлоры в стенку кишечника и взаимодействия с факторами иммунобиологического надзора. Тем не менее, истинные причины развития рассматриваемой патологии остаются дискуссионными, данные о клинической картине, тяжести, особенностях течения заболеваний носят разрозненный характер. В норме локальная иммунная система кишечника регулируется нормальной микрофлорой, находящейся на поверхности слизистой оболочки и в просвете кишечника; нарушение состава микрофлоры способствует. Хотя ВЗК представляется следствием патологического иммунного ответа измененной слизистой оболочки на неизвестный антиген в генетически восприимчивом организме, отсутствует единое мнение о патогенезе данной группы заболеваний, несмотря на многолетнюю историю изучения проблемы.

1.2 - Роль оксидативного стресса в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника

Накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных о роли оксидативного стресса в патогенезе ВЗК: повреждении стенки кишечника, вмешательстве в процессы внутриклеточной регуляции иммунокомпетентных факторов и др. в условиях избыточной генерации свободных радикалов, активных форм кислорода и азота и/или недостаточной активности компонентов антиоксидантной защиты [45, 288]. Эндогенными источниками оксидантов

являются реакции в ЭПС, митохондриях, пероксисомах и ядре клеток при участии НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, липоксигеназы, миелопероксидазы (МПО), синтазы оксида азота (NOS), циклооксигеназы (ЦОГ) и др. в клетках слизистой оболочки кишечника, нейтрофилах, моноцитах/макрофагах, эндотелиоцитах [212, 223]. В патогенезе ВЗК имеет значение наличие дефекта гена NOX-2, а также др. генов, в том числе во взаимодействии, участвующих в воспалении и окислительном повреждении стенки кишечника - ATG16L1, IRGM1, NOD2/CARD15, IRGM1, SMURF1 и ATG16L2 [294]. Экзогенными факторами инициации и поддержания оксидативного стресса при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) выступают воздействие ионизирующей радиации (в том числе, применение диагностических процедур), химиотерапевтические средства, курение, алкоголь, наркотические средства, ксенобиотики, нутритивные факторы, включая избыток металлов переменной валентности (Fe, Cu), алкоголь [75, 142]. Факторами антиоксидантной защиты в ЖКТ выступают: 1) внутриклеточные ферменты (супероксиддисмутаза 1, 2, 3, каталаза, глутатионпероксидаза, особенно изоформа 2, глутатионредуктаза); 2) внутриклеточные неэнзимные антиоксиданты (глутатион, мелатонин); 3) внеклеточные антиоксиданты (витамины А, С, Е, микроэлементы Zn, Cu, Mn, входящие в состав ферментов антиоксидантной защиты, флавоноиды и полифенолы) [287].

У больных с БК показан дисбаланс в системе активности СОД, в частности, повышение активности при обострении как один из протективных факторов от окислительного стресса и снижение в фазу ремиссии, поэтому активность СОД в крови рассматривается как биомаркер окислительного стресса при ВЗК [70]. Зафиксировано увеличение активности глутатионпероксидазы 2 в слизистой ЖКТ и в крови при ВЗК, что имеет значение в активации факторов транскрипции STAT. Сообщается о снижении активности каталазы, содержания глутатиона и мелатонина при ВЗК [272].

Эскалация оксидативного стресса при ВЗК сопряжена с активацией перекисного окисления липидов, окислительной модификацией белковых

молекул клеток стенки кишечника, нарушением их функции, в том числе, защитной в связи с продукцией слизи, повреждению межклеточных контактов, проницаемости кишечной стенки, а также аутофагией, гибелью энтероцитов, расширением зоны вторичной альтерации, формированием очагов хронического воспаления [288]. Повреждение эндотелиоцитов сосудов кишечника в условиях оксидативного стресса приводит к экспрессии на их поверхности адгезивных молекул, активации иммунных клеток и замыканию одного из порочных кругов в патогенезе ВЗК [263, 301]. Полагают, что инициированное таким образом воспаление поддерживается затем и факторами адаптивного иммунитета [67].

Большое значение в прогрессировании ВЗК придается активным формам азота, генерируемым активированными макрофагами и нейтрофилами под влиянием измененной микробиоты, некоторые микроорганизмы могут сами генерировать NO [169].

АФК участвуют в активации NF- κ B – зависимой внутриклеточной сигнализации, в связи с чем при ВЗК увеличивается синтез провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, IL-16 и TNF- α , модулируется активность гена p53 и инициируется апоптоз энтероцитов, повышается проницаемость кишечной стенки за счет деградации миозина, активации ММП, увеличения активности ЦОГ-2 и индуцибельной синтазы оксида азота [258]. Оксидативный стресс вызывает повреждение ДНК и способствует развитию колоректального рака [223].

Таким образом, оксидативный стресс при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) приводит к изменению состава кишечной микробиоты, условно-патогенная флора усугубляет повреждение энтероцитов, блокирует репаративные процессы. Тем не менее, влияние активных форм кислорода и азота на кишечную микрофлору до конца неясно, хотя известно об их участии в активации синтеза провоспалительных цитокинов.

1.3 - Иммунологические аспекты патогенеза воспалительных заболеваний кишечника

В патогенезе ВЗК первостепенное значение имеют клетки кишечного эпителия, лимфоидные клетки врожденного иммунитета, нейтрофилы, моноциты/макрофаги, дендритные клетки, В-, Т- лимфоциты. Как было отмечено выше, обнаружены генетические дефекты дисрегуляции врожденного и адаптивного иммунитета, выявленные при комплексном изучении генома у больных с ВЗК [301]. ЯК рассматривают как хроническое иммуновоспалительное заболевание с преобладанием Th2-иммунного ответа с избыточной продукцией IL-1, TNF- α , а также аккумуляцией иммунокомпетентных клеток в слизистой оболочке [183]. Парадигма о преимущественно Th1-иммунном ответе при БК и преимущественно Th2-иммунном ответе при ЯК теряет свое значение, а Th2-зависимые реакции имеют значение и при БК [301]. В частности, у больных с БК в сыворотке повышается концентрация IgA и IgG, а уровни IgA и IgG в кале положительно коррелируют с концентрацией в плазме С-РБ, СОЭ, эндоскопическими и клиническими индексами активности болезни [189].

Среди клеток врожденного иммунитета ведущее значение в патогенезе ВЗК придается макрофагам, количество которых в слизистой кишечника увеличивается при обострении заболевания, дендритным клеткам и нейтрофилам, в том числе CD177⁺ нейтрофилам, которые имеют принципиальное значение в активации Т-клеток [261, 314]. Показано в патогенезе ВЗК нарушение ответа нейтрофилов на ГМ-КСФ в виде активации ГМ-КСФ-STAT5-зависимой внутриклеточной сигнализации [297]. Одна из гипотез формирования гранулем при БК – это нарушение иммунного ответа макрофагов кишечника на E.coli [84].

В качестве еще одной причины дисфункции иммунного ответа при ВЗК выступает изменение TLR и активации TLR-зависимых сигнальных путей с участием MyD88, NF- κ B и митоген-активируемой киназы как центрального звена иммунного ответа на кишечную микрофлору [199]. Понимание дисфункции TLR-зависимых путей при ВЗК позволит разрабатывать новые терапевтические

подходы [269]. При ВЗК установлена роль NLRP3-инфламмосомного комплекса в секреции IL-1 β и IL-18 эпителиоцитами и иммунокомпетентными клетками в слизистой [312].

В патогенезе ВЗК привлекают внимание лимфоидные клетки врожденного иммунитета (ILC) [187]. Субпопуляции ILC-1, ILC-2 и ILC-3 экспрессируют транскрипционные факторы T-bet, GATA-3 и ROR γ t соответственно [168]. Прежде всего, имеют значение ILC-3, секретирующие IL-22, IL-17, а также IFN- γ -продуцирующие ILC-1 [127, 129]. ILC-2 могут иметь значение в патогенезе кишечного фиброза при БК через повышение секреции ИЛ-13 [73]. ILC-3 участвуют в активации Treg за счет секреции TGF- β [213]. Показано регуляторное взаимодействие ILC с Т- и В-лимфоцитами [203]. При ВЗК TNF- α повышает секрецию IL-17 в ILC-3, а IL-12 и IL-23 активируют дифференцировку ILC-1 и ILC-3 [119]. Полагают, что моноциты/макрофаги активируют ILC за счет секретируемых IL-23, IL-1 β , IL-6, TNF- α и др. факторов [198].

Взаимодействие в Пейеровых бляшках и лимфоидной ткани кишечника АПК с микробными антигенами кишечной микробиоты приводит к дифференциации Th0 при участии IL-12 в Th1 субпопуляцию, при участии IL-4 в Th2 субпопуляцию, а при участии IL-23, IL-1 β , IL-6, IL-21, TGF- β – в Th17 [124]. Показано влияние кишечной микрофлоры на образование Th17, оно значительно уменьшается в стерильном кишечнике и после применения антибиотиков, а кишечная микробиота рассматривается как один из факторов регуляции баланса Th17/Treg [226]. Установлена роль Th17-зависимого иммунного ответа в патогенезе ВЗК, опосредованная эффектами цитокинов семейства IL-17 (IL-17A, IL-17B, IL - 17C, IL-17D, IL-17E (IL-25), IL-17F), IL-21, IL-22 с последующей активацией NF- κ B, митоген-активируемой киназы и STAT3-зависимых путей в эпителиоцитах кишечника, эндотелиоцитах, моноцитах/макрофагах, фибробластах, нейтрофилах, секрецией TNF- α , IL-1 β , хемокинов, металлопротеиназ; имеют значение пути, ассоциированные с Th9, Th22 и Treg [90, 143, 304]. Неоспорима роль Treg в патогенезе ВЗК за счет участия в иммунном гомеостазе в условиях воспалительного процесса в стенке ЖКТ, их дисфункция

сопряжена с активацией воспаления [78, 97, 141]. Нарушение пролиферации и дифференцировки Treg при ВЗК связывают с изменением сложных взаимодействий Т-клеток с микробиомом кишечника [181].

При ВЗК в сыворотке и стенке ЖКТ разворачивается цитокиновый дисбаланс, инициирующий и поддерживающий хроническое воспаление в стенке ЖКТ, а сами цитокины являются одной из ключевых целей патогенетической терапии. Th1 лимфоциты секретируют провоспалительные цитокины – TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17, IL-23, Th2 – IL-5, IL-10, IL-13, наряду с этим, увеличивается концентрация IFN- γ , IL-7, хемокинов и иммуносупрессорных цитокинов – TGF- β 1 и IL-10 [92, 163, 175, 214, 271]. В частности, провоспалительные цитокины через активацию NF- κ B повышают экспрессию iNOS в моноцитах/макрофагах, синтез NO и пероксинитрита, участвующих в повреждении энтероцитов, а положительный эффект анти-TNF- α терапии, в том числе обусловлен снижением продукции NO [101, 174]. Активность iNOS и содержание NO в сыворотке, кале и моче при ВЗК коррелирует с тяжестью состояния [55]. IL-23 при БК отводят ключевую роль в активации Th17, ILC-3, гранулоцитов, NK-клеток [221].

Стриктуры при БК связаны с избыточными эффектами на миофибробласты и фибробласты TGF- β 1, а также, в меньшей степени IL-13, тромбоцитарного фактора роста, фактора роста фибробластов, инсулиноподобного фактора роста и др. [254, 277]. Фиброз-стимулирующие пострецепторные эффекты TGF- β 1 опосредованы внутриклеточными путями, включая SMAD2 и SMAD3 [206]. В фиброгенезе при БК продемонстрирована роль АФК, особенно из-за избыточной активации НАДФН-оксидазы-4 (NOX-4); с НАДФН-оксидазы-4 связывают дифференцировку и секреторную активность миофибробластов, опосредованную TGF- β 1, а затем SMAD2 и Akt [145]. Избыточная продукция NOX-4-зависимых прооксидантов вызывает митохондриальную дисфункцию и увеличение образования АФК, а TGF- β 1 подавляет эффекты антиоксидантов на клетку, замыкая таким образом порочный круг фиброза при БК [196, 248]. Перспективными терапевтическими агентами могут оказаться антиоксиданты – ингибиторы NOX, а также специфические ингибиторы TGF- β 1 [139, 245].

Взаимодействия между иммунной системой и компонентами вегетативной нервной системы в кишечнике, центральной нервной системы имеют значение для понимания психологических нарушений, диссомнии у больных с ВЗК, формирования порочных кругов в патогенезе и необходимости оказания психологической поддержки наряду с методами фармакокоррекции [55, 73, 91, 172, 275, 279, 289].

К числу значимых биомаркеров ВЗК относят протеины биологических жидкостей - platelet factor-4, myeloid-related protein-8, фибриноген, Annexin A6, циклофилин А, S100A9, церулоплазмин и др.; протеины тканей кишечника – индоламин-2,3-диоксигеназа, L-лактатдегидрогеназа, НАДФН, PGE₂, кератин 19 и др. [55]. При использовании методов липидомики выявлены значимые и коррелируемые со степенью воспаления изменения содержания в слизистой кишечника при ВЗК эйкозаноидов PGE₂, PGD₂, тромбоксана B₂, 5-НЕТЕ, 11-НЕТЕ, 12-НЕТЕ и 15-НЕТЕ [289].

Полагают, что только интегративный (multi-omic) подход, включающий оценку генома, эпигенома, транскриптома, метаболома, в т.ч. протеома, липидома, секретома, а также микробиома кишечника – «interactome» подход – позволит всесторонне и эффективно понять этиологию, патогенез, разрабатывать методы ранней и точной диагностики, персонафицированного лечения и профилактики ВЗК [53, 54, 105, 289].

Таким образом, востребованным с клинических и фундаментальных позиций является поиск новых неинвазивных биомаркеров ВЗК на основе изучения геномики, транскриптомики, протеомики, липидомики и секретомики («мульти-омикс анализ») в биологических жидкостях (плазма, слюна, моча, фекалии), тканях и слизи кишечника, клеточных линиях, субклеточных фракциях, которые позволят существенно модифицировать диагностические, терапевтические и прогностические подходы, что коррелирует с данными исследователей.

1.4 - Перспективные терапевтические подходы при воспалительных заболеваниях кишечника

Используемые в настоящее время методы лечения направлены на индукцию и поддержание ремиссии и включают производные 5-АСК, кортикостероиды, иммуносупрессанты и биологическую терапию, в частности, применение моноклональных антител против TNF- α , а также хирургические подходы [111, 120]. Однако примерно треть пациентов не чувствительны к традиционной терапии, у многих в ходе лечения развиваются непереносимость и побочные эффекты, а выбор стратегии лечения является сложной задачей, ни один из используемых терапевтических подходов не обеспечивает однозначного положительного эффекта, предотвращения рецидивов и осложнений, длительной ремиссии и отсутствие побочных эффектов [305].

Терапевтические воздействия на состав кишечной микробиоты у больных с ВЗК включают применение антимикробных средств, вакцин с инактивированными *E. coli*, пребиотиков [89]. Проходят клинические испытания методы лечения с использованием мезенхимальных стволовых клеток, пересадки костного мозга [155]. Они показали эффективность в индукции ремиссии при БК [170]. Могут представлять интерес внутривенное введение клеток с иммуносупрессивным эффектом из плаценты, внутрибрюшинное введение аутологичных толерогенных дендритных клеток [154].

Один из наиболее интересных и неоднозначных терапевтических подходов при ВЗК – применение гельминтной инвазии для переключения Th1-зависимого аутоиммунного ответа с повреждением стенки кишечника на Th2-зависимый, направленный на паразитов в его просвете, что было успешно продемонстрировано в условиях *in vitro* и *in vivo*, но требует дополнительных исследований [284]. Еще одно направление – трансплантация фекальной микробиоты от здоровых индивидуумов, результаты когортных исследований показали ее безопасность и эффективность у 61% испытуемых, однако

применение метода вызывает много вопросов, в частности, по выбору донора, стандартизации обработки и доставки каловых масс [102, 231].

Преимущества применения иммуноглобулинов при рефрактерных формах ВЗК включают высокую безопасность, возможность внутривенного и подкожного применения и эффективность при тяжелых формах с экстраинтестинальными проявлениями [264]. Широкое применение у больных ВЗК могут найти модуляторы функции лейкоцитов. Разработаны блокаторы адгезивных молекул T-лимфоцитов, препятствующие активации и эмиграции клеток, гуманизированные моноклональные антитела IgG4 против интегрина $\alpha 4\beta 1$, блокирующие взаимодействие с VCAM-1 [252]. Препарат Vedolizumab ингибирует взаимодействие интегрина $\alpha 4\beta 7$ на лимфоцитах с контррецептором сосудистого эндотелия (MAdCAM-1) [302]. Известны другие ингибиторы адгезивных молекул, применение которых обосновано при рефрактерности к традиционной терапии и высокой выраженности воспалительного процесса: MAdCAM-1, ICAM-1 [131].

Основными недостатками антицитокиновой терапии при ВЗК (антирецептор TNF- α и TNF- α -ингибирующие молекулы – растворимые рецепторы TNF- α , а также Талидомид, снижающий секрецию TNF- α и стимулирующий синтез Th2-зависимых цитокинов) являются высокая вероятность развития аллергических реакций, инфекционные осложнения, рефрактерность к терапии примерно у трети пациентов, высокая стоимость [95, 113, 286]. Системный анализ 24 статей по лечению БК показал экономическую неэффективность применения биологической терапии [69, 237]. Перспективными являются препараты, блокирующие IL-12 и IL-23, особенно у больных с БК, рефрактерных к анти-TNF- α терапии [122, 214, 221]. Подход с использованием секретирующих IL-10 *Lactococcus lactis*, показал эффективность у 50% мышей с ВЗК [276]. Разработаны и изучается эффективность применения моноклональных антител против IFN- γ , IL-17A [147]. Продемонстрирована эффективность средств, блокирующих IL-17A и IL-17F [141]. Потенциальными фармакотерапевтическими целями могут выступать рецепторы и факторы внутриклеточной сигнализации (NF- κ B и STAT3) IL-17-зависимых путей [165].

На этапе клинических испытаний находится препарат, блокирующий белок SMAD7, избирательно связывающийся с рецепторами TGF- β 1 и ограничивающий его иммуносупрессивные эффекты, что увеличивает эффекты TGF- β 1 и приводит к клинической ремиссии у больных с БК [112]. Ингибитор JAK1/JAK3, снижает синтез IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 [229]. Перспективная мишень в терапии ВЗК – TLR, применение их агонистов и антагонистов, в том числе моноклональные антитела против TLR-2, антагонисты TLR-4, агонистов TLR-9 и др. [123]. Привлекают внимание исследователей и получены положительные результаты применения ингибиторов Janus-киназы, анти SMAD7, лигандов пероксисомного пролиферацию активирующего рецептора- γ и др. [295].

Перспективное направление в терапии ВЗК - восстановление/активация противовоспалительных сигналов, использование толерогенного потенциала цитокинов (IL-10, TGF- β , GM-CSF), иммунокомпетентных (Treg, толерогенные ДК) или мезенхимных стволовых клеток [128]. Фармакологические индукторы гемоксигеназы-1) продемонстрировали положительный эффект при экспериментальной ВЗК в виде ограничения иммунного воспаления в стенке кишечника, возможно, за счет индукции синтеза IL-10 [260].

Получены положительные результаты применения антиоксидантов при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК). Интерес представляют ингибиторы циклооксигеназы-2, ангиотензина II (через снижение активности циклооксигеназы-2 и индуцибельной синтазы оксида азота, эффект, ограничивающий перекисное окисление липидов, повышение активности ферментов антиоксидантной защиты), ГМГ-КоА-редуктазы (через снижение активности МПО, повышения активности СОД, эффект, ограничивающий перекисное окисление липидов) [204]. Перспективным антиоксидантом при ВЗК может оказаться мелатонин [215]. N-ацетилцистеин при ВЗК увеличивает количество восстановленного глутатиона, активность каталазы [159].

Поиск новых лекарственных средств с повышенной эффективностью и минимальным количеством побочных эффектов заставляет обратить внимание на растительные средства и биологически активных веществ эндогенного

происхождения [125]. Известно успешное применение эритропоэтина в качестве иммуномодулятора при почечной недостаточности, термической травме, у недоношенных новорожденных [31, 32]. Средства растительного происхождения с разнообразным терапевтическим действием менее токсичны, легче переносятся и более доступны для больных [149].

Выявлены несколько ключевых механизмов действия средств растительного происхождения при ВЗК. Терапевтические эффекты лекарственных растений при ВЗК во многом обусловлены наличием в их составе полифенолов и флавоноидов [162]. Так, противовоспалительное действие может быть связано с ограничением синтеза лейкотриена LTB₄ под влиянием никотина [94]. Улучшение состава микрофлоры кишечника лежит в основе действия экстракта из *Allium sativum* [300]. Показано в условиях *ex vivo* при БК ингибирующее влияние антоцианов и флавоноидов из томатов на секрецию IL-6, TNF- α , хемокинов, хемотаксис и активацию ДК и др. лейкоцитов, активность провоспалительных сигнальных путей в колоноцитах [290]. Противовоспалительный эффект экстрактов из *Commiphora*, *Camellia sinensis*, *Boswellia spp.* реализуется за счет блокады NF- κ B-зависимых путей и снижения синтеза IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 [63]. Гликопротеины и др. производные из *Polygonum multiflorum*, *Gardenia jasminoides*, *Clonorchis sinensis* снижают активность iNOS, ЦОГ-2 [303]. Экстракты кардамона и полыни вызывают ремиссию у 65% больных с ВЗК по сравнению с плацебо за счет комплексной блокады NF- κ B-пути, iNOS и ЦОГ [44]. Получены данные о противовоспалительной активности при ВЗК производных каннабиса [217].

Входящие в состав смолы *Boswellia serrata* кислоты относятся к классу пентациклических тритерпенов с противовоспалительными, антисептическими, антиоксидантными, обезболивающими и седативными свойствами. При экспериментальном колите экстракт босвеллии снижает содержание продуктов ПОЛ, активность NOS [121]. *Andrographis paniculata* – лекарственное растение с противовоспалительными, противовирусными, антиоксидантными и др. свойствами, эффективность его применения при ВЗК подтверждена в плацебо-

контролируемых исследованиях [186, 208, 255]. В составе присутствуют дитерпены, лактоны, флавоноиды с противовоспалительными свойствами за счет ингибирования NF-κB-пути, уменьшении продукции АФК. *Aloe vera L.* – растение с противовоспалительным, иммуностимулирующим, антисептическим, антиоксидантным действием, сок алоэ блокирует синтез провоспалительных цитокинов, активность ЦОГ, МПО и используется при лечении ВЗК [179].

1.5 - Куркума длинная как потенциальный источник для создания новых лекарственных форм с мультитропным действием

Куркума длинная (*Curcuma longa*) – растение, первое упоминание о терапевтических свойствах которого датируется 1748 г., затем в статье А. Оппенгеймера в 1937 г. [133]. Основным действующим фактором является куркуминоидный комплекс, включающий куркумин, дезметоксикуркумин, бимдезметоксикуркумин и др. [36]. Наиболее выраженными противовоспалительными, антиоксидантными, цитопротекторными, антиапоптогенными, противоопухолевыми и др. свойствами обладает куркумин [7]. Продемонстрированы особенности фармакокинетики куркумина, его эффективность и безопасность при ревматоидном артрите, увеите, панкреатите, сахарном диабете, метаболическом синдроме, атеросклерозе, болезни Альцгеймера, злокачественных опухолях и др. заболеваниях, всего около 100 клинических испытаний, из них завершены более 30 [118, 138]. За последние 20 лет в Pubmed представлено около 10000 статей по обсуждению механизма действия и эффективности применения куркумина при патологии [138, 218].

Результаты единичных клинических и экспериментальных исследований продемонстрировали эффект куркумина при ВЗК при отсутствии серьезных побочных эффектов [60]. В частности, при экспериментальном ЯК: при различных вариантах введения (перорально или системно), при использовании в качестве моно- или дополнительной терапии повышалась выживаемость животных, уменьшались клинические и морфологические проявления [193, 253].

Применение куркумина в дозе 1,0 г после завтрака и после ужина на фоне терапии препаратами 5-АСК в течение полугода у 45 пациентов с ЯК показало его положительное влияние на клинико-морфологическую картину заболевания по сравнению с применением только 5-АСК [133]. Применение куркумина у пяти больных с БК показало снижение индекса активности, выраженности симптомов, СОЭ и концентрации СРБ в сыворотке. Применение куркумина при БК у детей значительно улучшает параметр индекса активности при хорошей переносимости [283]. Представленные данные являются предпосылкой для изучения эффектов куркумина при ВЗК. Сведения о механизме протекторного действия куркумина при ВЗК в доступной литературе малочисленны, необходимо проведение дальнейших исследований по его расшифровке, сопоставлению клинической картины, морфологии очага повреждения, иммунного и редокс-статуса как на системном уровне, так и локально в ЖКТ.

В настоящее время около 100 зарубежных компаний выпускают различные куркумин-содержащие продукты: напитки, таблетки, капсулы, кремы, гели, назальные спреи, экстракты и др. [173]. В РФ отсутствуют зарегистрированные лекарственные формы, содержащие куркумин, за исключением биологически активных добавок, что существенно ограничивает его изучение и возможности для применения при ВЗК. Мало сведений и противоречив их характер по биодоступности куркумина в составе используемых лекарственных средств, фармакокинетике после локального или системного применения [176, 266, 282]. Предпринимались попытки использования адъювантов куркумина для повышения биодоступности, применения полимерных мицелл, наночастиц, полимерных имплантатов и др. форм [62, 209, 262, 273]. В последнее время многие исследования направлены на создание лекарственных форм, содержащих экстракт куркумы длинной, новых фитопрепаратов на их основе, обладающих антиоксидантным и антибактериальным действием [25].

Проведенные экспериментально–теоретические исследования подтверждают целесообразность использования сырья куркумы длинной для создания лекарственных форм [3, 6, 25]. Нормативная документация и

литературные источники рекомендуют использовать следующие методы для идентификации и количественной оценки куркуминоидов: хроматографии в тонком слое сорбента, идентификация куркумы по реакции с борной кислотой, спектрофотометрическое определение оптической плотности раствора по реакции с борно-щавелевым реактивом, ВЭЖХ. Проведение качественного анализа куркуминоидов описано с помощью хроматографии в тонком слое сорбента с использованием растворителей хлороформ – спирт этиловый (19:1, 9:1, 4:1), хлороформ – спирт метиловый – вода (26:14:3) с последующим высушиванием и проявлением в УФ-свете при 254 и 365 нм [6, 19]. Для идентификации куркумина проводят реакцию с борной кислотой [23]. Содержание куркумина в экстрактах определяется УФ- спектрофотометрией при длине волны 545 нм по реакции с борно – щавелевым реактивом, что коррелирует с данными в проекте ФС «Куркумы длинной корневища» [3, 6]. Некоторые авторы предлагают использование метода ВЭЖХ, отмечая недостаточную объективность идентификации сырья только по УФ-спектру, поскольку схожий характер спектра присущ извлечениям из сырья других видов куркумы [6, 19].

Патентный анализ выявил в РФ некоторые лекарственные формы, содержащие куркуму. В частности, средство для профилактики и лечения заболеваний органов малого таза и заболеваний прямой кишки с сухим экстрактом корневищ куркумы длинной в сочетании с анестетиком [27]. Описан способ получения и применения средства растительного происхождения с гепатопротекторным, желчегонным и спазмолитическим действием, содержащее комплекс экстрактов, в том числе корней куркумы [29]. Создано средство для терапии при нарушении обмена веществ, гиперхолестеринемии в форме таблеток, содержащих куркуму длинную и еще 12 растительных и животных компонентов [28]. БАД «Куркумин – Эвалар» представляет капсулы для «здоровья печени, суставов, повышения иммунитета», ее существенным недостатком является отсутствие клинических исследований эффективности [30]. Куркума длинная входит в состав комплексного средства растительного происхождения для «профилактики старения организма» [26].

Таким образом, на современном этапе развития медицины медико-социальная значимость ВЗК обусловлена повсеместным ростом заболеваемости, тяжестью осложнений и проблемами терапии. В их основе – хронический воспалительный процесс с различным по глубине и локализации поражением ЖКТ. На роль ведущих этиологических факторов претендуют наследственная предрасположенность, в том числе эпигеномные изменения с участием микроРНК, длинных некодирующих РНК и дефекты конкретных генов – участников иммунного ответа: NOD2, IRGM и др., а также качественные и количественные изменения кишечной микробиоты, экологические факторы, инициирующие повреждение кишечной стенки, – уровень и условия жизни, стресс, загрязнение окружающей среды, курение, употребление алкоголя, режим питания и характер пищи, применение лекарственных средств. Ключевое событие патогенеза – иммунный ответ в генетически восприимчивом организме на антигены кишечной микрофлоры, аутоантигены измененной слизистой оболочки ЖКТ. Для БК характерна поляризация иммунного ответа в сторону Th1- и Th17-зависимых реакций, дефицитом Treg, в то время как для ЯК – в сторону Th2-зависимых реакций, избыточная активация моноцитов/макрофагов, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, нейтрофилов. Медиаторами повреждения стенки кишечника выступают ферменты, АФК и азота в условиях дисбаланса системы прооксиданты-антиокислительная защита, продукты каскада арахидоновой кислоты, провоспалительные цитокины и хемокины. Базисная терапия при ВЗК направлена на иммунные факторы патогенеза, прежде всего, блокаду синтеза медиаторов повреждения, связана с возникновением побочных эффектов, ограничивающих ее применение, рефрактерностью к проводимой терапии, что требует разработки новых терапевтических стратегий в условиях применения мульти-омикс факторного анализа. Привлекают внимание применение стволовых клеток, толерогенных дендритных клеток, гельминтной инвазии, трансплантации фекальной микробиоты, модуляторов адгезии лейкоцитов, новых антицитокиновых препаратов, блокаторов про- и активаторов противовоспалительных внутриклеточных сигнальных путей, антиоксидантов, а

также лекарственных растительных средств. Среди последних особый интерес вызывает куркума длинная, терапевтический эффект которой обусловлен противовоспалительными, антиоксидантными, цитопротекторными, антиапоптогенными, и др. свойствами куркумина при хронических воспалительных заболеваниях, что является предпосылкой для изучения ее эффектов в составе оригинальных ректальных суппозиториев при ВЗК.

Список статей, опубликованных по материалам 1 главы

1. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, М.С. Бойко, В.А. Бивалькевич // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 1-2. – С. 153 – 160.

ГЛАВА 2 - МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 - Материалы исследования

Для изучения иммунологических параметров, морфологии очага повреждения, свободно-радикального окисления в очаге повреждения при экспериментальном колите, а также эффектов локального применения ректальных суппозиторий, содержащих экстракт корневищ куркумы длиной (патент на изобретение № 2743427) при экспериментальном колите были проведены экспериментальные исследования в условиях *in vivo* на 210 белых половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 240 ± 20 г. Животные содержались в экспериментально-биологической клинике (виварий) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Эксперимент проводился при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург) [17], Рекомендациями Европейской комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года по содержанию и уходу за животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях, а также - Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях [14], заключением этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол №1 от 14.01.2017, протокол №1 от 22.01.2020).

Животные были случайным образом разделены на 4 группы:

Группа 1 (n=21) – интактный контроль.

Группа 2 (n=63) – животные с индуцированной патологией.

Группа 3 (n=63) – животные с индуцированной патологией в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы.

Группа 4 (n=63) – животные с индуцированной патологией в условиях применения ректальных суппозиториев с 5-АСК.

Моделирование экспериментального колита осуществляли с помощью ректального введения тринитробензолсульфоновой (ТНБС) кислоты («Sigma-Aldrich», USA) в соответствии с алгоритмом, описанным Morris G.P. et al. [52, 212, 272]. Животные были лишены корма за 24 часа до индукции экспериментального колита, их взвешивали, для общей анестезии внутримышечно вводили препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид, «Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 20 мг/кг. Для получения раствора ТНБС 30 мг сухого вещества ТНБС растворяли в 150 мл 50% этанола, затем каждому животному ректально вводили от 0,2 до 0,3 мл полученного раствора в зависимости от массы животных. Раствор вводили с помощью медицинского полиуретанового катетера (ОАО «Синтез», Россия) с внешним диаметром, равным 2 мм, на глубину 8 см.

В группе 3 каждые 12 ч в течение 7 суток применяли ректальные суппозитории массой 0,3 г и содержанием куркумина 0,000075 г, в группе 4 применяли ректальные суппозитории массой 0,3 г, содержащие 50 мг 5-АСК, которые готовили на основе суппозиториев ректальных «Салофальк» (МНН: Месалазин, «Doctor Falk Pharma GmbH», Германия). Технология изготовления суппозиториев описана ниже в разделе 2.2.5.

На 3, 5 и 7 сутки от момента индукции экспериментального колита в опытных группах 2, 3 и 4 осуществлялся забор крови под наркозом после вскрытия грудной клетки пункцией сердца в области левого желудочка в вакуумные пробирки «Vacurette» («Greiner Bio-One», Австрия) с антикоагулянтом (КЗ ЭДТА или гепарин) для иммунологических исследований, осуществлялось выделение толстого кишечника для проведения морфологических и биохимических исследований.

2.2 - Методы исследования

2.2.1 - Клинические методы исследования

Индекс активности болезни (disease activity index, DAI) оценивали в соответствии со шкалой, разработанной Best W. et al. [74], адаптированной для оценки исследуемой патологии у крыс [98, 164]. Каждый параметр (потеря веса, консистенция стула и ректальное кровотечение) оценивали для каждой крысы по 4-х бальной шкале от 0 до 4, баллы для каждого параметра суммировали, минимальное значение индекса равно нулю, максимальное значение индекса равно 12. Описание параметров приведены в таблице 1. Под параметром «жидкий стул» понимали несформированные каловые массы с консистенцией пасты или жидкие. Под термином «диарея» понимали отсутствие оформленного стула с частотой дефекаций более 3-х раз в сутки. Ректальное кровотечение определяли как присутствие свежей крови на шерсти вокруг ануса и в каловых массах.

Таблица 1 – Параметры для определения индекса активности болезни

Параметр	Балл	Описание
Потеря массы тела	0	Нет потери массы тела
	1	1-5%
	2	6-10%
	3	11-20%
	4	Более 20%
Консистенция стула	0	Нормальный стул
	2	Жидкий стул
	4	Диарея
Ректальное кровотечение	0	Нет крови в фекалиях
	1	Позитивная бензидиновая проба в фекалиях
	2	Позитивная бензидиновая проба в фекалиях и визуальное определение крови в фекалиях
	4	Ректальное кровотечение, кровь вокруг ануса

Наличие скрытой крови в каловых массах определяли с помощью бензидиновой реакции согласно описанию Hughes A. et al. [148]; принцип метода основан на пероксидазной активности гемоглобина и окислению хромогена (бензидина) для получения синего или зеленого окрашивания. Для проведения теста готовили 5% раствор основного бензидина в ледяной уксусной кислоте, который хранили при температуре +4°C не более 1 недели. 0,5% раствор бензидина в дистиллированной воде изготавливали перед началом каждого опыта. Забор каловых масс производили ежедневно от каждой крысы индивидуально, отсаживая в переноску с постеленной чистой белой бумагой не более чем на 2 часа. Каловые массы переносили в лунку 96 луночного планшета с 50 мкл дистиллированной воды, размешивали каловые массы до однородной консистенции, добавляли 50 мкл раствора бензидина, перемешивали с использованием встряхивателя медицинского вибрационного типа «Vortex ELMI-V3» («Elmi», Латвия) и медленно вливали 150 мкл 3% перекиси водорода. Реакцию оценивали визуально по присутствию синего окрашивания немедленно. Окраску, появляющуюся после 5 минут после начала реакции, считали недостоверной. Для определения чувствительности метода в образцы фекалий здоровых крыс было добавлено от 5 до $3,2 \cdot 10^{-4}$ мкл крови в титровке с шагом 5. Чувствительность теста соответствует 0,04 мкл крови в образце каловых масс.

2.2.2 - Гематологические и иммунологические методы исследования

Определение общего анализа крови и лейкоцитарной формулы. Общее количество лейкоцитов определяли на автоматическом гематологическом анализаторе для ветеринарии, откалиброванном для крыс, «BC-2800Vet» («Mindray», Китай). Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, фиксированных метиловым спиртом и окрашенных азур II-эозином («Гемстандарт-Р», Россия) по Романовскому-Гимзе. Подсчитывали 200 лейкоцитов с дифференциацией эозинофилов, палочкоядерных и

сегментоядерных нейтрофилов, базофилов, лимфоцитов, моноцитов. Их количество выражали в абсолютных ($\cdot 10^9/\text{л}$) величинах.

Для выделения чистой фракции нейтрофилов и лимфоцитов 2 мл крови смешивали с 3 мл стерильного физиологического раствора (0,9 % раствор натрия хлористого), смесь наслаивали на градиент плотности стерильных растворов фикола («Pharmacia», Швеция) и верографина («Srofa», Чехия), плотность верхнего слоя 1,075-1,077 г/см³, нижнего – 1,093-1,095 г/см³ и центрифугировали 40 мин при 1500 оборотах в минуту. После центрифугирования аккуратно снимали верхний слой плазмы, забирали слой лимфоцитов, лимфоциты трехкратно отмывали в среде 199 центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Кольцо нейтрофилов собирали, переносили в стерильные центрифужные пробирки, отмывали стерильным раствором Хенкса путём центрифугирования при 1500 оборотах в минуту дважды по 7 минут.

Для определения жизнеспособности нейтрофилов, выделенных из крови к 0,2 мл нейтрофилов добавляли 0,02 мл 1% раствора трипанового синего и ресуспензировали. Материал помещали в камеру Горяева и исследовали в световом микроскопе. Живые клетки оставались прозрачными (трипанонегативные клетки), мертвыми считались клетки, окрашенные в фиолетовый цвет (трипанопозитивные клетки). Подсчет производили на 100 клеток, результат выражали в процентах и абсолютных значениях. Жизнеспособность нейтрофилов, рассчитанная в тесте с 1% раствором трипанового синего, составила 98%.

Исследование поглотительной способности нейтрофилов крови проводили на модели поглощения частиц латекса. Для оценки фагоцитоза 200 мкл нейтрофилов смешивали с 20 мкл взвеси частиц монодисперсного (диаметр 1,7 мкм) полистирольного латекса. После 60 минут инкубации при температуре 37⁰С из суспензии готовили препараты, которые высушивали, фиксировали метанолом и окрашивали азур II – эозином по Романовскому-Гимзе. С помощью иммерсионной микроскопии учитывали активность фагоцитоза – % клеток, захвативших хотя бы одну частицу латекса, интенсивность фагоцитоза – число

поглощенных микросфер латекса (у.е.) в 100 подсчитанных клетках и фагоцитарное число – число поглощенных микросфер латекса (у.е.) на один фагоцит.

Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте, учитывая интенсивность восстановления нейтрофилами нитросинего тетразолия (НСТ) в его нерастворимую форму - диформаза по методу А.Н. Маянского и М.Е. Виксмана [37]. Проводили спонтанный и индуцированный НСТ-тест.

В пробирки с 0,2 мл взвеси нейтрофилов добавляли 0,1 мл 0,2% раствора стандартно разведенного нитросинего тетразолия в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4). Для оценки индуцированного НСТ-теста в каждую лунку добавляли 20 мкл суспензии частиц монодисперсного (диаметр 1,7 мкм) полистирольного латекса (индуцированная серия) или 20 мкл 0,9% натрия хлорида (спонтанная серия). После 30-минутной инкубации при температуре 37⁰С к реакционной смеси добавляли 3 мл 0,1 % соляной кислоты для остановки реакции. Пробирки центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость сливали, из осадка готовили мазки. После сушки препараты фиксировали метанолом и 5 минут окрашивали 0,1% водным раствором сафранина. С помощью микроскопии при увеличении 90x10x1,5 определяли активность НСТ-теста – % клеток и интенсивность НСТ-теста (у.е.) для чего НСТ-позитивные клетки делили на 3 группы: 1 – клетки с гранулами диформаза в цитоплазме общей площадью менее 1/3 площади ядра; 2 – клетки с гранулами диформаза в цитоплазме более 1/3 площади ядра; 3 – клетки с гранулами диформаза, превышающими размеры ядра. Для получения коэффициента интенсивности реакции количество клеток первой группы, выраженное в процентах, умножали на 1, второй группы – на 2, третьей – на 3, результаты суммировали и делили на 100. Результат выражали в у.е.

Определение субпопуляционного спектра лимфоцитов крови проводили с помощью проточного цитофлуориметра «Navios» («BeckmanCoulter», США) с использованием специфичных для крыс

моноклональных антител производителя («eBioscience», США) с фенотипом CD3⁺ и CD45RA⁺ [249], которые являются маркерами преимущественно Т- и В-лимфоцитов соответственно. Их количество выражали в абсолютных ($\cdot 10^9/\text{л}$) величинах.

Параметры гибели лимфоцитов оценивали при окрашивании клеток конъюгированным с флюорохромом аннексином V (Annexin-5-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) из набора «Annexin 5 - FITC/7-AAD kit» («BeckmanCoulter», США) на проточном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США). Лимфоциты из крови выделяли, как указано выше. Перед окрашиванием клетки ресуспензировали в 1 мл охлажденном на льду фосфатно-солевом буфере, затем центрифугировали в течение 7 мин при 1500 об/мин, после чего сливали надосадочную жидкость. К суспензии клеток добавляли охлажденный на льду 1% раствор фиксирующего буфера (1X Binding Buffer) из расчета $5 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ клеток/мкл. Затем к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл Annexin V-FITC и 5 мкл ДНК – тропного красителя 7-AAD, клетки вортиксовали и инкубировали в темноте в течение 15 мин при 4°C. После инкубации к клеткам добавляли 400 мкл 1% фиксирующего буфера (1X Binding Buffer), после 30 мин инкубации в термостате при 37°C проводили анализ клеток на проточном цитофлуориметре. Дифференцировали интактные клетки (Annexin-5-FITC-/7-AAD-), клетки с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD-), клетки с поздними признаками апоптоза и частично некротические клетки (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). Результат выражали в %.

Концентрацию IgM, IgG в сыворотке определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с применением специфических тест-систем для крыс фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай). Результат выражали в нг/мл.

Определение концентрации IL-23 в сыворотке определяли с помощью автоматического иммуноферментного анализатора «Personal LAB» (Италия) с применением специфической тест-системы для крыс фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай). Результаты выражали в пг/мл.

2.2.3 - Биохимические методы исследования

Для приготовления 10% гомогената слизистой оболочки толстого кишечника проксимальную часть ободочной кишки извлекали из брюшной полости, помещали в охлажденный 0,1 М раствор фосфатного буфера (рН 7,4), после чего около 100 мг ткани гомогенизировали в стеклянном механическом гомогенизаторе в соотношении 1:10 в течение 3 минут при температуре не выше 4°C с последующим получением 1 мл гомогената.

Для определения содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника использовали экстрационно-спектрофотометрический метод определения продуктов ПОЛ по методике Волчегорского И.А. и соавторов [5, 22, 42]: к 0,5 мл гомогената добавляли 5 мл смеси гептан – изопропанол (1:1), встряхивали в закрытых пробирках 15 минут и производили экстракцию в течении 20 минут, затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин, липидные экстракты сливали и разбавляли 5 мл смеси гептан – изопропанол (3:7 по объему). Последнюю процедуру выполняли с целью достижения оптимальных значений оптической плотности в обеих фазах экстракта. К разбавленным липидным экстрактам добавляли водный раствор соляной кислоты (рН 2,0) в объеме 2 мл для разделения фаз и отмывки от нелипидных примесей. После разделения смеси на фазы гептановую фазу отбирали в отдельную сухую пробирку, а к водно-спиртовой фазе добавляли 1 г сухого NaCl для обезвоживания изопропанольного экстракта. После отделения водной фазы изопропанол переносили в отдельную пробирку. Оптические контроли готовили путем экстракции по аналогичной схеме, заменив исследуемый образец эквивалентным количеством 0,1% раствора ЭДТА на 0,9% NaCl. Измеряли оптическую плотность каждой фазы против соответствующего контроля при 220 нм (поглощение монохроматического света экстрактом в диапазоне 186 – 225 нм отражает содержание изолированных двойных связей), 232 нм (поглощение в диапазоне 225 – 230 отражает содержание диеновых конъюгатов), 278 нм (поглощение напрямую зависит от содержания

кетодиенов и сопряженных триенов). Конечные продукты ПОЛ (основания Шиффа) определяли путем дополнительного замера оптической плотности экстракта при 400 нм. Расчет содержания продуктов ПОЛ проводили, соотнося величины соответствующих оптических плотностей к величине оптической плотности, характеризующей изолированные двойные связи. Все измерения производились с использованием спектрофотометра «СФ-56» («ЛОМО – Спектр», Санкт – Петербург, Россия). Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E_{232}/E_{220} (относительное содержание диеновых конъюгатов – ДК), E_{278}/E_{220} (уровень кетодиенов и сопряженных триенов – КД и СТ) и E_{400}/E_{220} (уровень оснований Шиффа – ШО).

Определение содержания продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника включает оценку содержания карбонильных продуктов окислительной модификации белков в ткани кишки по их реакции с 2,4 – динитрофенилгидразином с последующей спектрофотометрической регистрацией продуктов взаимодействия – динитрофенилгидразонов (ДНФГ) [39]. Для определения использовали 0,1 мл 10% гомогената исследуемой ткани. После обработки 20% трихлоруксусной кислотой в первую порцию (опыт) добавляли 0,1 мл 0,1 М раствора 2,4-ДНФГ, а во вторую порцию (контроль) – 0,1 мл 2 М раствора HCl. Далее пробы инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре и для получения белкового осадка центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Осадок промывали 2 раза в 5 мл смеси этанол-этилацетат для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами модифицированных белков. Полученный очищенный осадок высушивали для удаления растворителей и растворяли в 2,5 мл 8 М раствора мочевины. Для лучшего растворения белкового осадка в каждую пробу добавляли 15 мкл 2 М раствора HCl.

Параллельно по аналогичной схеме производилась оценка металл-зависимой окислительной модификации белков. С этой целью в изучаемых образцах перед этапом осаждения белка трихлоруксусной кислотой

предварительно производили *in vitro*-индукцию окисления белков компонентами реакционной смеси, содержащей приготовленные *ex tempore* растворы FeSO_4 (10 мМ), перекиси водорода (0,3 мМ) и ЭДТА (10 мМ). При этом взаимодействие двухвалентного железа с перекисью водорода способствует последующему образованию радикала $\text{OH}\cdot$ по реакции Фентона: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$. Производили анализ площади под кривой спектра поглощения ДНФГ – дериватов карбонильных производных белков. Карбонильные производные окисленных белков регистрировали на спектрофотометре в ультрафиолетовой части спектра на длинах волн 230 нм, 254 нм, 270 нм, 280 нм, 356 нм (альдегиддинитрофенилгидразоны, АДНФГ), 363 нм и 370 нм (кетондинитрофенилгидразоны, КДНФГ), а в области видимого света - 428 и 430 нм (АДНФГ) и 434 нм, 524 нм, 530 нм, 535 нм (КДНФГ). Перечисленные длины волн были выбраны в соответствии с диапазонами, в которых регистрируются динитрофенилгидразоны. Использованный методический подход позволил не только оценить общее значение ОМБ, определить количество АДНФГ и КДНФГ основного и нейтрального характера, но и сопоставить первичные и вторичные маркеры ОМБ, и в результате этого выявить путь нарушения нативной конформации белков. Все измерения производились с использованием спектрофотометра «СФ-56» («ЛОМО – Спектр», Санкт – Петербург).

Оценка уровня ОМБ осуществлялась путем подсчета площади под кривой спектра поглощения ДНФГ – дериватов карбонильных производных белков. Полученное значение выражали в единицах оптической плотности на мг белка (у.е./мг). Производили подсчет отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному по реакции Фентона, принимая результаты измерения индуцированного за 100%, получая таким образом значение резервно-адаптационного потенциала изучаемой ткани, интегрально характеризующего активность антиоксидантных систем изучаемой ткани.

2.2.4 - Морфологические и иммуногистохимические методы исследования

Для макроскопической оценки состояния очага повреждения в толстом кишечнике при экспериментальном колите исследовали внешний вид кишечника, длину поражения в мм, наличие язв и их глубин, наличие грануляционной ткани.

Для морфометрических исследований материал забирали в соответствующие сроки исследования, маркировали и фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, обезвоживали, обезжировали и заливали в парафин. С парафиновых блоков готовились гистологические срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопические исследования проводили на микроскопе «DMRXA» фирмы «Leika» (Германия). Исследования выполняли с помощью компьютерной программы анализа изображений «ДиаМорф Cito-W» (Москва, Россия), совмещённой с микроскопом, при увеличении микроскопа $\times 100$ и $\times 400$, в 10-ти случайно отобранных полях зрения в пересчете на 1 мм^2 . Оценивали глубину повреждения кишечника, реакцию сосудистого русла, наличие и состав клеточного инфильтрата, сроки появления в ране грануляционной ткани.

Кроме описательных использовали следующие морфометрические признаки: количество эозинофилов на мм^2 ; количество нейтрофилов на мм^2 ; количество гистиоцитов на мм^2 ; количество лимфоцитов на мм^2 ; количество плазматических клеток на мм^2 ; количество фибробластов на мм^2 ; диаметр язвенного дефекта, мкм.

Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной программы анализа изображений «ImageScore M» (Россия). Для интегральной оценки повреждения толстого кишечника крыс использовали **индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI)** [308, 309]. TDI определяли для каждой крысы по шкале от 0 до 6 в соответствии с критериями: 0 - отсутствие признаков воспаления; 1 - низкий уровень лейкоцитарной фильтрации; 2 - средний уровень лейкоцитарной фильтрации; 3 - высокий уровень лейкоцитарной фильтрации, увеличенная плотность сосудов и утолщение стенки кишечника; 4 -

высокий уровень лейкоцитарной фильтрации, увеличенная плотность сосудов и утолщение стенки кишечника, повреждения превышают 50% от всей площади образца; 5 - трансмуральная инфильтрация, потеря бокаловидных клеток, увеличенная плотность сосудов и утолщение стенки кишечника; 6 - трансмуральная инфильтрация, потеря бокаловидных клеток, увеличенная плотность сосудов и утолщение стенки кишечника, повреждения превышают 50% от всей площади образца.

Таким образом, минимальное значение TDI было равно 0, а максимальное – 6.

Иммуногистохимическим методом проводилась оценка содержания МПО и TNF- α в клеточных популяциях ткани толстого кишечника. Для этого использовались наборы специфических первичных антител – кроличьи антитела к МПО крысы (host – rabbit, каталожный номер PAA601Ra01 «Cloud-Clone Corp.», Китай) и мышинные антитела к TNF- α крысы (host – mouse, каталожный номер MAA133Ra21 «Cloud-Clone Corp.», Китай); использовалась полимерная система детекции «Ultra VIEW Universal DAB» (Ventana, USA) для обнаружения в срезах тканей, связанных с антигеном иммуноглобулинов кролика и мыши. Специфичное первичное антитело локализовано универсальной полимерной системой вторичного антитела. Полимер конъюгирован с пероксидазой хрена и фрагментами козьего антикролячьего и антимышиного антитела. В качестве субстрата/хромогена для визуализации полимерного комплекса использовался диаминобензидин.

Для проведения испытаний полученные срезы депарафинировали, доводили до дистиллированной воды, демаскировали в цитратном буфере 0.01 М рН 6.0 на водяной бане при слабом кипении 93°C в течение 30 минут. После чего проводили промывку в дистилляте в течение 5 минут. С обратной стороны маркировали по площади срезов цветным перманентным маркером. Маркировка срезов с лицевой стороны проводилась парафиновым маркером с площадью, достаточной для растекания сыворотки. После чего проводили обработку ингибитором эндогенной пероксидазы: наливали на срезы рабочий раствор

ингибитора, а затем инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. После чего осуществляли промывку трис-буфером 3 раза по 3 минуты. Затем вносили ProteinBlock для блокировки неспецифических сайтов связывания с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 20 минут. После чего осуществляли промывку трис-буфером 3 раза по 3 минуты. Затем осуществляли нанесение антиполивалентных антител, связанных непосредственно с пероксидазой по мультимерной технологии.

Постановка иммуногистохимической реакции проводилась в автоматическом иммуногистостейнере «Bench Mark XT» (Ventana, USA) с соблюдением протокола исследования. Для визуализации применяли универсальную систему «Ultra VIEW Universal DAB» (Ventana, USA) – комплекс вторичных антител и хромогена. Докрашивание препаратов проводили Nematoxylin 2 (Ventana, USA). После проведения реакции срезы подвергали дегидратации и помещали под покровное стекло. При увеличении микроскопа $\times 400$ производился подсчет клеток, окрашенных в интенсивно коричневый цвет, на площади 1 мм^2 ткани толстого кишечника (ед./мм²). Исследование проводилось в 10 случайно отобранных полях зрения.

2.2.5 - Фармацевтические методы исследования

В качестве объекта исследования была выбрана разработанная лекарственная форма в виде ректальных суппозиториев с экстрактом корневищ куркумы длинной, приготовленного методом дробной мацерации, с использованием спирта этилового 80%. В работе использовали реактивы и вспомогательные вещества, соответствующие требованиям нормативной документации (НД) и представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Используемые в работе вспомогательные вещества и реактивы

Наименование	Нормативная документация
Реактивы	
Кислота борная	ФС.2.2.002.15
Кислота щавелевая	ГОСТ 22180-76
Спирт этиловый 95%	ФС.2.1.0036.15
Вспомогательные вещества	
Полиэтиленгликоль 1500	ФС 42-1885-96
Полиэтиленгликоль 2000	ТУ 2483-008-71150986-2006
Полиэтиленгликоль 400	ФС 42-1242-96
Полиэтиленгликоль 4000	ФС 42-3337-96
Полиэтиленгликоль 6000	ТУ 2483-166-05757587-2000
Колифор Р 188	Koliphor Р 188 BASF, полоксамер 188, плуроник 188
Кремофор RH– 40	BASF (Германия) П № 013635/01-2002; Cremophor® RH-40
Эмульгатор Т-2	ФС 42-2689-96
Масло какао	ОФС.1.5.2.0002.15
Твердый жир типа А	ФС 42-3466-97
Вода очищенная	ФС.2.2.0020.18
Твин - 80	ФС 42-2540-88

В работе использовали весы лабораторные электронные (серия АF) со специальным классом точности по МОЗМ № 76 и ГОСТ 24104 – 2001. Взвешивание компонентов основы, реактивов осуществляли с помощью весов лабораторных ВМ 153 М (ООО «ОКБ Веста»). Для термостатирования образцов использовали термостат ТС-16 с точностью $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Температуру измеряли лабораторным термометром с ценой деления $0,1^{\circ}\text{C}$. Перемешивание осуществляли на лабораторном шейкере S – 3.02 L с орбитальным вращением и скоростью вращения 4 – 500 об/мин. Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре СФ – 56 в кюветах из кварцевого стекла с толщиной рабочего слоя 1 см. ТСХ проводили на пластинках «Sorbfil» 10 x 10 см

(Россия), марка – ПТСХ-АФ-А, аналитические (ТУ 26-11-17-89). Подложка – алюминиевая фольга. Сорбент – силикагель СТХ-1А, зернение 5-17 мкм, толщина слоя 90-120 мкм, связующее – силиказол. Детектирование пластин в УФ – свете проводили с использованием облучателя хроматографического УФС – 254/365 нм.

Получение экстракта корневищ куркумы длинной проводилось методом дробной мацерации. Для этого около 30,0 г сухих измельченных куркумы длинной корневищ (*Curcuma longa* L., «Diamart», Индия) загружали в равном количестве в три перколятора. Свежий экстрагент в виде 80% этилового спирта подавали только в первый перколятор в три приема: 1. Заливали сырье 80% этиловым спиртом в объеме 100 мл и настаивали в течение 2 часов, после чего вытяжку из первого перколятора подавали во второй перколятор; 2. В первый экстрактор заливали свежий экстрагент в виде 80% этилового спирта в объеме 100 мл, и сырье уже в двух экстракторах выдерживали 2 часа, после чего вытяжку из второго перколятора переносили в третий, а из первого перколятора – во второй; 3. Заливали в первый перколятор свежий экстрагент в виде 80% этилового спирта в объеме 100 мл и настаивали сырьё во всех трёх перколяторах в течение 24 часов.

Для равномерной загрузки каждого перколятора общий объём необходимого экстрагента V делили на три части, при этом $V = V_1 + V_2 + V_3$. Первую порцию свежего экстрагента рассчитывали из соотношения:

$$V_1 = P * K + \frac{(V - P * K)}{3}, \quad (1)$$

где P – общее количество растительного сырья, кг; K – коэффициент поглощения экстрагента сырьем.

Вторая и третья порции свежего экстрагента брались в равных количествах и могли быть рассчитаны из остаточного количества растворителя.

Процесс дробной мацерации методом противотока завершали также в три приема: 1. Из третьего перколятора сливали всю вытяжку, являющуюся готовым продуктом. Вытяжку из второго перколятора сливали и направляли в третий

перколятор. Вытяжку из первого перколятора сливали, сырье отжимали, и всю полученную вытяжку направляли во второй перколятор. Оба перколятора оставляли для настаивания еще на 2 часа; 2. Из третьего перколятора сливали вторую партию готового продукта. Из второго перколятора также сливали вытяжку, сырье выгружали и отжимали. Всю полученную вытяжку отправляли в третий перколятор и настаивали сырье в течение 2 часов; 3. После окончания времени настаивания сырья сливали третью порцию готового продукта, к которому присоединяли отжим. Полученное извлечение отстаивали не менее 2 суток при температуре не выше 10⁰ С до получения прозрачной жидкости и фильтруют.

Стандартизация экстракта корневищ куркумы длинной спиртового проводилась в соответствии с показателями, приведенными в ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» [13]: описание, спирт этиловый в соответствии с ОФС.1.2.1.0016.15, тяжелые металлы в соответствии с ОФС.1.2.2.2.0012.1, сухой остаток в соответствии с ОФС.1.4.2.0021.1, микробиологическая чистота в соответствии с ОФС.1.4.2.0002.18, категорией 4Б: общее количество аэробных микроорганизмов – не более 10⁵ КОЕ в 1 г; общее количество дрожжевых и плесневых грибов – не более 10⁴ КОЕ в 1 г; энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10³ КОЕ в 1 г; отсутствие *Escherichia coli* в 1 г; отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г.

Методика идентификации экстракта корневищ куркумы длинной спиртового методом тонкойслойной хроматографии (ТСХ). Исследование проводили с помощью восходящей тонкослойной хроматографии (ОФС 1.2.1.2.0003.15) с использованием хроматографических пластинок марки “Sorbfil” (сорбент; силикагель СТХ-1А, зернение 5-17 мкм, толщина 90-120 мкм, размер 10x10 см). На линию старта хроматографической пластины наносили по 0,1 мкл спиртового экстракта корневищ куркумы длинной. Пластину помещали в камеру, предварительно насыщенную системой растворителей: хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1). После того, как фронт растворителей достигал линии финиша, пластину вынимали, высушивали и просматривали в УФ свете при длине волны 254 и 356 нм, а затем помещали в йодную камеру, предварительно насыщенную не менее 24 часов. Результат просматривали при дневном свете.

Оценку антиоксидантной активности in vitro куркумина в спиртовом экстракте корневищ куркумы длинной проводили по реакции с молибдатом аммония. В мерные колбы вместимостью 25 мл помещали 1, 2, 3, 4, 5 мл 0,02 М свежеприготовленного раствора молибдата аммония, 1 мл 3% раствора перекиси водорода и 0,1 грамм эквивалент кислоты серной, прибавляли от 0,1 до 1,0 мл полученного экстракта. Выдерживали в течение 20 минут при температуре 25⁰С. Измеряли оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре СФ-56 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм при длине волны 410 нм. В качестве раствора сравнения использовали смесь без добавления пероксида водорода. Величину антиоксидантной активности рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%, \quad (2)$$

где A_1 – оптическая плотность раствора без добавления исследуемого вещества; A_2 – оптическая плотность раствора с добавлением исследуемого вещества.

Идентификацию и количественную оценку содержания куркуминоидов в экстракте корневищ куркумы длинной спиртовом проводили спектрофотометрически на основе методики, предложенной в проекте ФС, по реакции с борно – щавелевым реактивом (способ расчета по удельному показателю поглощения) [3]. 2,0 мл полученного экстракта помещали в выпарительную чашку из ПВХ, добавляли 1 мл реактива. Смесь выпаривали на водяной бане при температуре 50 – 60 °С досуха. Сухой остаток количественно переносили спиртом этиловым 95 % в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем полученного раствора доводили тем же спиртом до метки и перемешивали (раствор А). 2,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и перемешивали. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 545 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы куркуминоидов в пересчете на куркумин в спиртовом экстракте в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_x * 25 * 25}{A_{1cm}^{1\%} * a * V_a} \quad , \quad (3)$$

где A_x – оптическая плотность экстракта корневищ куркумы длинной спиртового; $A_{1cm}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения окрашенного комплекса куркумина при длине волны 545 нм, равный 2050; a – навеска экстракта, г; V_a – объём аликвоты, мл.

Изготовление ректальных суппозиторий с экстрактом корневищ куркумы длинной (в пересчете на 10 доз) осуществляли путем расплавления в химическом стакане полиэтиленгликоля 1500 массой 3,0 г, ПЭГ 6000 массой 7,0 г, эмульгатора Т-2 массой 1,0 г, лутрола F-127 массой 7,5 г и кремофора RH-40 массой 12,5 г на водяной бане при постоянном перемешивании и температуре не более 70°C. Для удаления воздуха смесь без перемешивания выдерживали 30 минут при температуре 45°C. Затем в основу вводили при перемешивании 3 мл экстракта куркумы длинной спиртового. Полученную массу выливают в подготовленные (предварительно охлажденные и смазанные мыльным спиртом) суппозиторные формы, охлаждают в холодильнике при температуре 3-5°C в течение 20 минут, после чего качество суппозиторий оценивают по внешнему виду. Суппозитории для проведения доклинических исследований в условиях моделирования патологии готовили массой 0,3 г. Для этого охлажденную суппозиторную массу с помощью скребка перемещали на парафинированную капсулу, формируя из нее шар, взвешивали и отмечали полученную массу. Из сформированного шара на матовой поверхности стекла пилульной машинки при помощи дощечки формировали параллелепипед (брусок), который при помощи ножа пилульной машинки и дощечки делили на 10 равных частей, для того чтобы масса 1 ректального суппозитория составила 0,3 г [72]. В дальнейшем, для изготовления ректальных суппозиторий из шариков формировали конусы, наклоняя при этом дощечку под углом 45°. Готовые суппозитории помещали в холодильник на 7-10 минут, после чего застывшие суппозитории вынимали.

Фармацевтико - технологические исследования суппозиториев проводили в соответствии с показателями, представленными в ОФС.1.4.1.0013.15 «Суппозитории» [13]: описание, однородность дозирования – в соответствии с ОФС.1.4.2.0008.15, растворение – в соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15, распадаемость – в соответствии с ОФС.1.4.2.0012.15, определение микробиологической чистоты – в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18, категорией 3: общее количество аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г; общее количество дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г.

Методика идентификации экстракта корневищ куркумы длинной спиртового в составе ректальных суппозиториев методом ТСХ. Исследование проводили с помощью восходящей тонкослойной хроматографии (ОФС.1.2.1.2.0003.15) с использованием хроматографических пластинок марки “Sorbfil” (сорбент; силикагель СТХ-1А, зернение 5-17 мкм, толщина 90-120 мкм, размер 10x10 см). На линию старта хроматографической пластины наносили 2 мкл раствора, полученного растворением с последующим фильтрованием 3 г измельченной суппозиторной массы, содержащей экстракт корневищ куркумы длинной спиртовой, в 5 мл спирта этилового 95% и далее поступали, как указано выше (п. Методика идентификации куркумы длинной корневищ экстракта спиртового методом тонкойслойной хроматографии (ТСХ)).

Биофармацевтические испытания. Определение высвобождения куркумина из ректальных суппозиториев, содержащих куркумы длинной корневищ экстракт спиртовой, оценивали в тесте «Растворение» согласно ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» с последующим спектрофотометрическим определением содержания куркуминоидов.

Спектрофотометрическое определение ректальных суппозиториев, содержащих экстракт корневищ куркумы длинной спиртовой, проводили на основе методики, предложенной в проекте ФС, по реакции с борно – щавелевым реактивом (способ расчета по удельному показателю поглощения) [3]. Около 1 г измельченной суппозиторной массы помещали в мерную колбу вместимостью 25

мл, прибавляли 15 мл спирта этилового, взбалтывали в течение 10 минут, доводили до метки этим же растворителем, перемешивали и фильтровали, отбрасывая первые порции фильтрата. 10 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и далее поступали как указано выше (п. Идентификация и количественная оценка содержания куркуминоидов). В результате содержание куркумина в одном ректальном суппозитории составляло 0,000075 г.

Для приготовления ректальных суппозиториях, содержащих 5-АСК 50 мг, в химическом стакане растворяли 1 ректальную суппозиторию с 500 мг 5-АСК с торговым наименованием «Салофальк» (МНН: Месалазин, «Doctor Falk Pharma GmbH», Германия), а затем поступали как указано выше (п. Изготовление ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной). Таким образом, были созданы ректальные суппозитории массой 0,3 г и содержанием 5-АСК равного 50 мг.

2.2.6 - Методы статистической обработки результатов

Полученные результаты обрабатывали на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ 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 (U – Манна-Уитни, WW – Вальда-Вольфовитца, K – Краскела-Уоллиса). С целью выявления корреляционных взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

Список статей, опубликованных по материалам 2 главы

1. Бойко М.С., Бакеева А.Е., Голощапова Ж.А. Экспериментальное моделирование язвенного колита и болезни Крона // XVI итоговая научно-

практическая конференция молодых ученых и специалистов (Челябинск, 26 апреля 2018). Челябинск, 2018. – С. 71.

2. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, М.С. Бойко, В.А. Бивалькевич // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 1-2. – С. 153 – 160.

3. Воспалительные заболевания кишечника: выбор оптимальной экспериментальной модели / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, Е.В. Листик, А.Е. Бакеева, В.А. Бивалькевич // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26524> (дата обращения: 21.06.2019).

ГЛАВА 3 - ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ГОМЕОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ

3.1 - Клинико-морфологическая верификация экспериментального колита

Для верификации используемой нами экспериментальной модели колита, индуцированного тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС), применяли методы оценки выраженности клинических симптомов и морфологической картины в очаге повреждения стенки толстого кишечника. Клинические параметры оценивали по модифицированной шкале Disease activity index (DAI), адаптированной для ВЗК у крыс, наиболее часто используемой в экспериментальных исследованиях и включающей 3 параметра: масса тела, консистенция стула и наличие крови в кале [107, 308, 309]. Каждый критерий оценивали по 4-х бальной шкале от 0 до 4, затем баллы суммировали, минимальное значение индекса – 0, максимальное – 12. Результаты представлены в таблице 3.

При экспериментальном колите, начиная с 3 суток наблюдения, у животных фиксировались увеличение частоты дефекаций, изменение консистенции кала, появление крови в каловых массах, на 5 и 7 сутки наблюдения к указанным признакам добавилось снижение массы тела и увеличение выраженности симптомов, что нашло отражение в статистически значимом увеличении индекса DAI на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Потеря веса в среднем составила 10%, принято считать, что она обусловлена как диареей, так и системным воспалительным ответом, в частности анорексигенным эффектом некоторых провоспалительных цитокинов [52]. Кроме этого, отмечалось снижение двигательной активности животных. Перед началом эксперимента были отработаны летальные дозы ТНБС. В наших экспериментах смертность животных в течение 7 суток экспериментального колита отсутствовала. В эксперименте значение DAI на 7 сутки достоверно превышало значения на 3 и 5 сутки ($p < 0,05$).

Таким образом, при ТНБС-индуцированном колите у крыс наблюдается клиническая картина, характерная для ВЗК.

Таблица 3 – Индекс активности болезни при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Группы животных	Группа 2 экспериментальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 7 сутки (n=7)
Индекс активности болезни (DAI, у.е.)	7,00 (3,00; 7,00) *	8,00 (6,00; 10,00) *	11,00 (11,00; 11,00) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1.

При оценке морфологии очага повреждения в толстом кишечнике обнаружены следующие изменения. На 3 сутки экспериментального колита при гистологическом исследовании фрагментов толстой кишки определялись язвенные дефекты, дно которых располагается в слизистой оболочке, в подслизистом или мышечном слое (рисунки 2а, 2б). Собственная пластинка слизистой оболочки и подслизистый слой разрыхлены, утолщены за счет клеточной инфильтрации, которая состояла преимущественно из лимфоцитов и нейтрофилов с примесью эозинофилов. В подслизистом слое наблюдался отек межучной ткани, выраженное венозное и капиллярное полнокровие с картиной эритростазов и сладжирования эритроцитов. Стенки сосудов мелкого калибра гомогенизированы, утолщены за счет плазматического пропитывания, набухшие эндотелиоциты выступают в просветы сосудов (рисунок 3а).

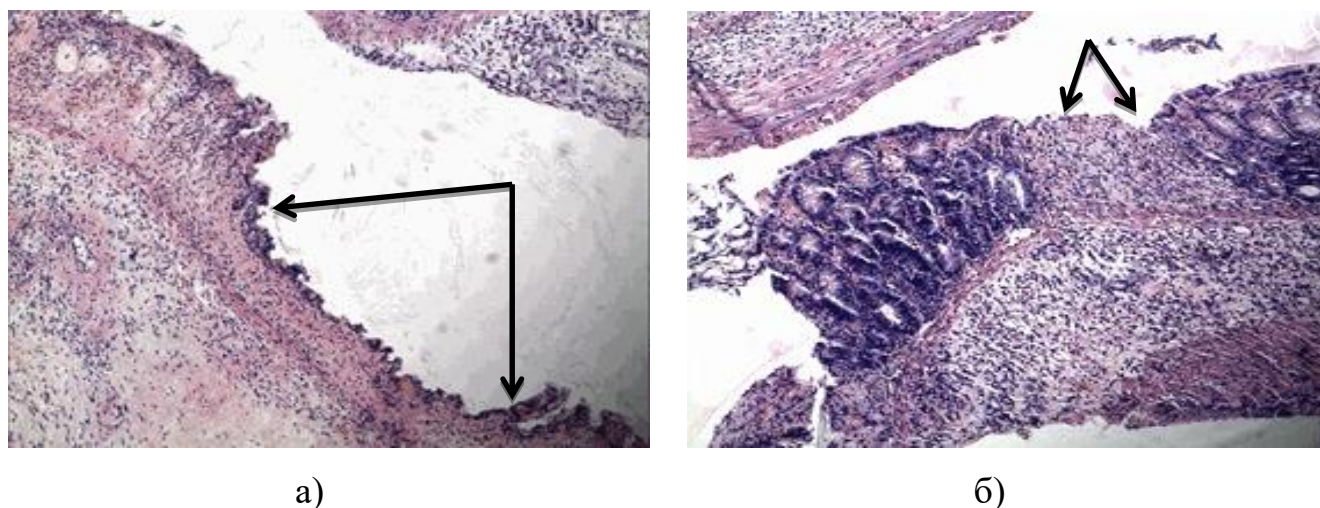


Рисунок 2 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) язвенный дефект (стрелки) слизистой оболочки толстого кишечника (окраска гематоксилин эозином, ув. x100); б) язвенный дефект (стрелки) подслизистой оболочки толстого кишечника (окраска гематоксилин эозином, ув. x100)

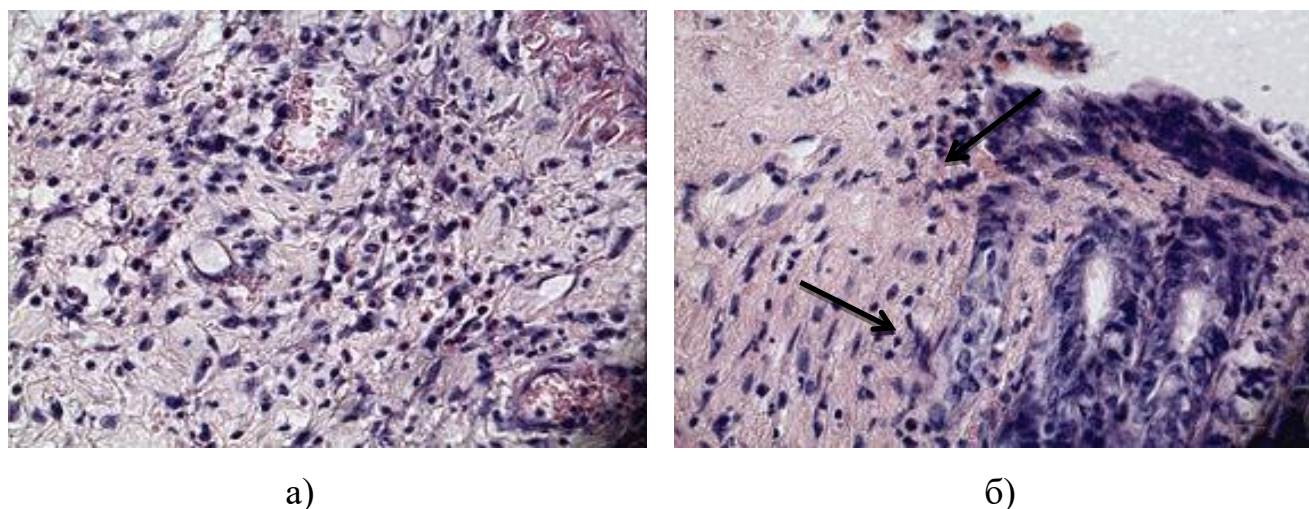
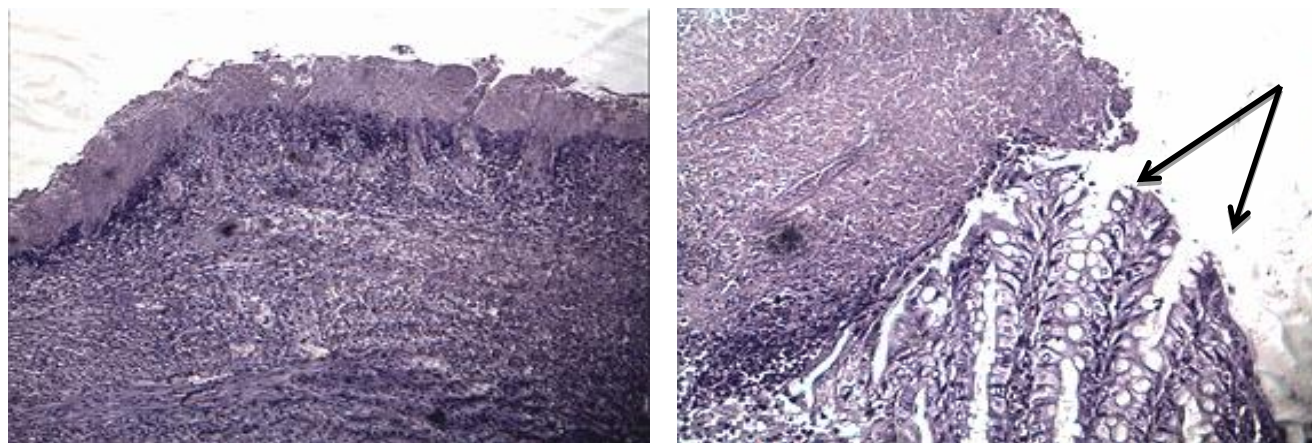


Рисунок 3 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) венозное и капиллярное полнокровие подслизистого слоя, нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация с примесью эозинофилов (окраска гематоксилин эозином, ув. x400); б) начальные процессы пролиферации столбчатого каемчатого эпителия (стрелки) в стенке язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. x100)

Стенки язвенных дефектов представлены отечной слизистой оболочкой. Просветы кишечных желез расширены, эпителий в состоянии тяжелой белковой дистрофии: цитоплазма клеток вакуолизирована, ядра просветленные, набухшие, с измененной полярностью, располагаются зачастую ближе к просвету железы (рисунок 3б). В этой области заметны начальные признаки репарации: столбчатый каемчатый эпителий на поверхности сохранившейся слизистой оболочки и в глубине крипт становится многорядным и «наползает» на язвенный дефект (рисунок 3б).

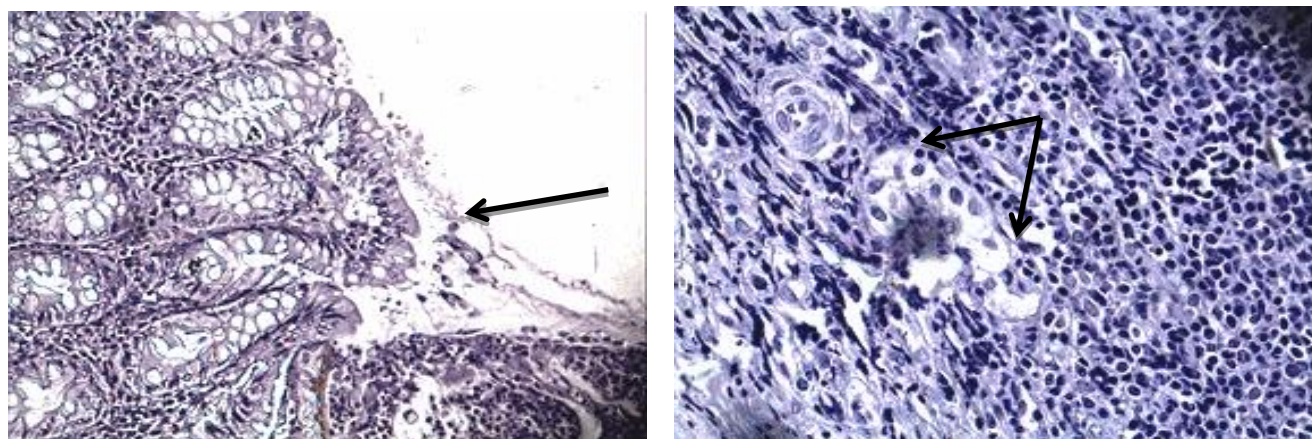
На 5 сутки экспериментального колита определялись язвенные дефекты, выполненные клеточным детритом в виде мелкозернистых бесструктурных масс с выраженным базофильным оттенком. Дно дефектов располагалось в подслизистом или в мышечном слое. Непрерывность собственной пластинки слизистой оболочки в проекции язвенных дефектов нарушена, волокна ее разрыхлены, раздвинуты экссудатом, состоящим преимущественно из лимфоцитов и нейтрофилов. В подслизистом слое – отек межучной ткани, выраженное венозное и капиллярное полнокровие с картиной эритро- и лейкостазов, плазматическое пропитывание и фибриноидное набухание сосудистых стенок. Стенки язвенных дефектов представлены отечной слизистой оболочкой, просветы кишечных желез расширены, эпителий в состоянии тяжелой белковой дистрофии: цитоплазма клеток с крупными вакуолями, ядра их просветлены, крипты укорочены (рисунок 4б). Прослойки рыхлой соединительной ткани, лежащие между криптами, разрыхлены, с густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 4а). В глубине стенок язвенных дефектов видна пролиферация сохранившихся камбиальных клеток кишечных желез и крипт (рисунок 5б), а на поверхности – пролиферация однорядного столбчатого эпителия (рисунок 5а).



а)

б)

Рисунок 4 – Морфология очага повреждения на 5 сутки экспериментального колита: а) язвенный дефект с нарушениями целостности собственной пластинки слизистой; густая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация некротизированного участка слизистой и подслизистого слоя (окр. гематоксилин эозином, ув. x100); б) тяжелая белковая дистрофия эпителия крипт (стрелки) в стенке язвенного дефекта (окр. гематоксилин эозином, ув. x200).



а)

б)

Рисунок 5 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 5 сутки: а) начальные явления пролиферации однорядного эпителия (стрелка) поверхности слизистой оболочки рядом с язвенным дефектом (окраска гематоксилин эозином, ув. x200); б) пролиферация сохранившегося камбиального эпителия в глубине язвенного дефекта, здесь же – область пролиферации веретеновидных фибробластов (окраска гематоксилин эозином, ув. x400)

В подслизистом слое в проекции стенок язвенных дефектов отмечены начальные явления фибриллогенеза: участки пролиферации фибробластов на фоне мелкоочаговой лимфогистиоцитарной инфильтрации с примесью небольшого количества плазматических клеток и формирование тонких, коротких соединительно-тканых волокон (рисунок 5б).

На 7 сутки экспериментального колита определяются язвенные дефекты, в том числе выполненные клеточным детритом в виде мелкозернистых бесструктурных масс с выраженным базофильным оттенком. Отмечалось расположение дна дефектов глубоко в подслизистом слое, нарушение непрерывности собственной пластинки слизистой оболочки (рисунок 6а). В подслизистом слое - отек межучной ткани, выраженное венозное и капиллярное полнокровие, плазматическое пропитывание и фибриноидное набухание сосудов, густая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация с примесью плазмоцитов, гистиоцитов, эозинофилов. В других случаях язвенные дефекты занимают менее одного поля зрения, свободны от некротических масс, здесь преобладают репаративно-склеротические признаки (рисунок 6б, 7а): в подслизистом слое пролиферация грануляционной ткани, богатой клетками, сосудами и соединительно-ткаными волокнами. В клеточном составе грануляционной ткани на фоне лимфогистиоцитарной инфильтрации видны поля пролиферации веретеновидных фибробластов (рисунок 7б). Просветы новообразованных сосудов мелкого калибра заполнены кровью, новообразованные соединительно-тканые волокна тонкие, короткие, малоизвитые, располагаются параллельно стенкам язвенных дефектов (рисунок 8а, 8б). Выражены явления пролиферации эпителия на поверхности язвенных дефектов и в глубине их стенок (рисунки 8а, 8б). В перифокальных зонах - отек и дистрофические изменения слизистой оболочки, просветы кишечных желез расширены, крипты укорочены, цитоплазма клеток эпителия просветлена, вакуолизирована, ядра набухшие, гипохромные, прослойки рыхлой соединительной ткани между криптами разрыхлены, с густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 7б).

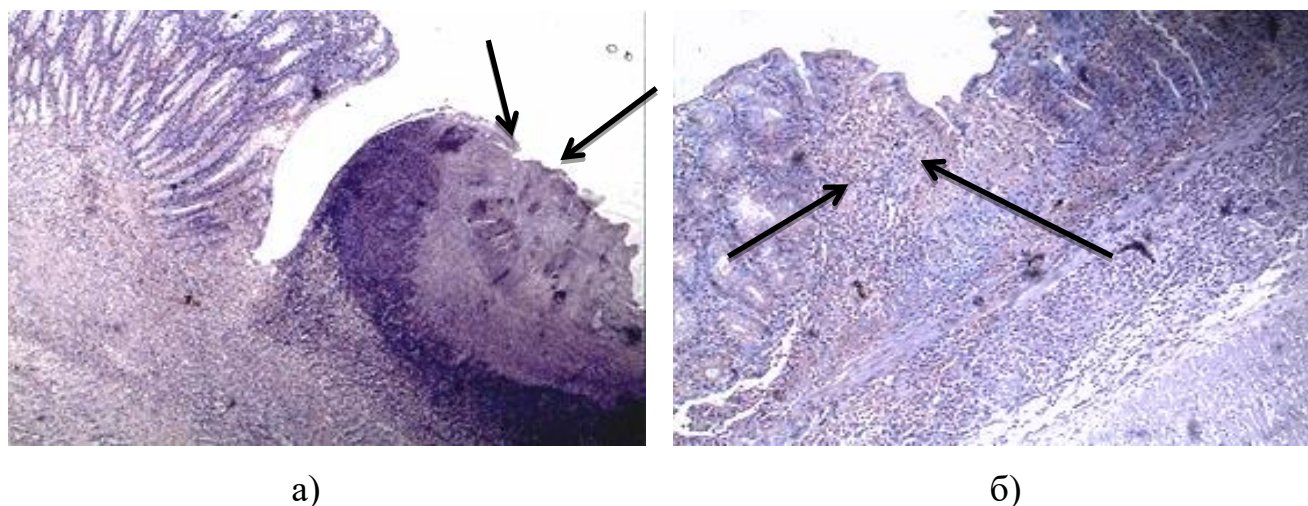


Рисунок 6 – Морфология очага повреждения на 7 сутки экспериментального колита: а) язвенный дефект, заполненный некротизированным детритом (окр. гематоксилин эозином, ув. x50); б) репаративно-склеротические изменения в язвенном дефекте: пролиферация грануляционной ткани с формированием соединительно-тканной стромы (окр. гематоксилин эозином, ув. x100).

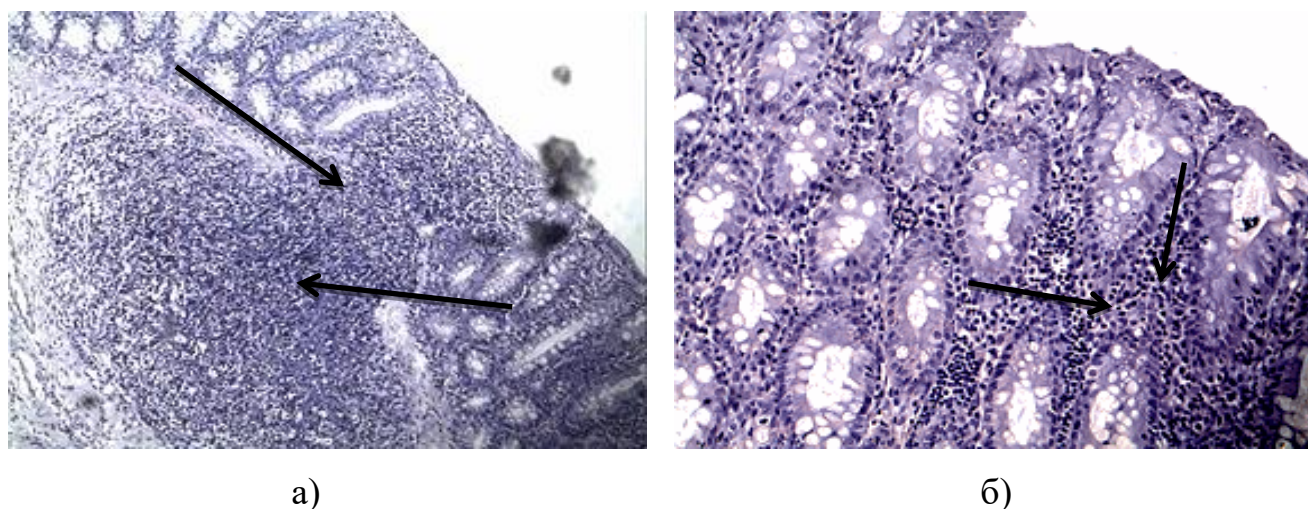


Рисунок 7 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 7 сутки экспериментального колита: а) язвенный дефект глубоко в подслизистом слое (пунктирные стрелки) с обширными участками нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации (окраска гематоксилин эозином, ув. x100); б) нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация соединительно-тканых прослоек (стрелки) между укороченными криптами слизистой оболочки рядом с язвенными дефектами (окраска гематоксилин эозином, ув. x200)

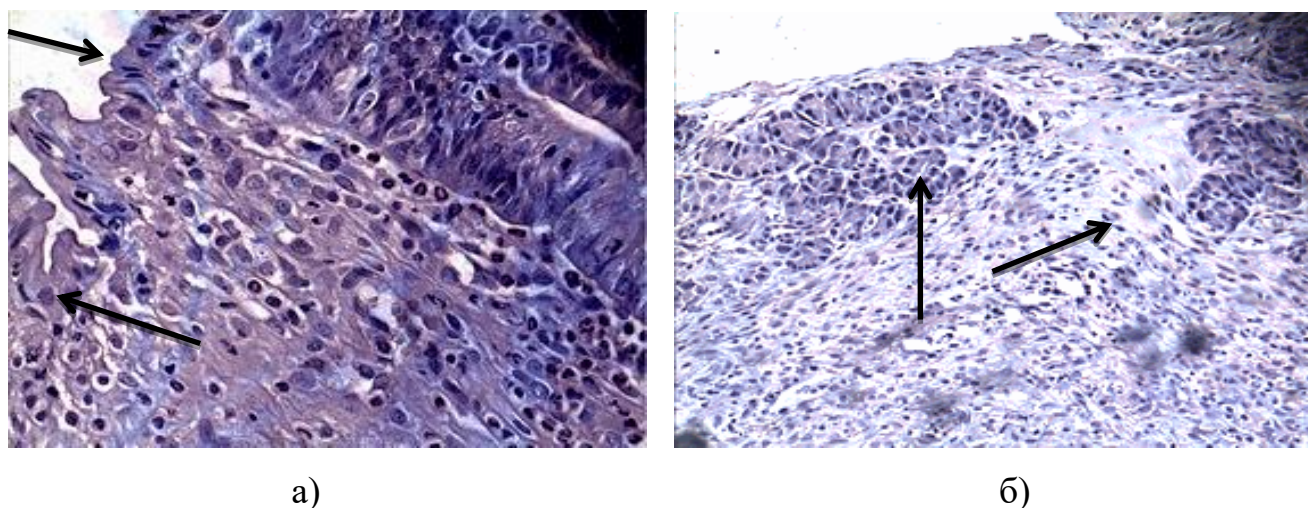


Рисунок 8 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 7 сутки экспериментального колита: а) эпителизация (стрелки) поверхности язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. x400); б) пролиферация эпителиоцитов (стрелки) глубоко в стенках язвенных дефектов (окраска гематоксилин эозином, ув. x200)

Морфометрический анализ позволил установить, что на 3 сутки экспериментального колита в очаге на единице площади увеличивается содержание лимфоцитов (примерно в 4 раза по медиане по сравнению с группой интактных животных), нейтрофилов (примерно в 15 раз), эозинофилов (примерно в 10 раз), плазмоцитов (примерно в 9,4 раза), гистиоцитов (примерно в 9,4 раза), фибробластов (примерно в 17 раз), определяются язвенные дефекты диаметром в среднем 0,6 мм (таблица 4). На 5 сутки экспериментального колита в очаге повреждения увеличивается на единице площади содержание лимфоцитов (примерно в 6 раз по медиане по сравнению с группой интактных животных), нейтрофилов (примерно в 14 раз), эозинофилов (примерно в 4 раза), плазмоцитов (примерно в 70 раз), гистиоцитов (примерно в 78 раз), фибробластов (примерно в 68 раз), а также определяются язвенные дефекты диаметром в среднем 1 мм.

Таблица 4 – Морфометрические параметры в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 7 сутки (n=7)
Лимфоциты, 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) *
Нейтрофилы, ед./мм ²	196,93 (189,70; 214,76)	2888,087 (1608,91; 2979,27) *	2736,47 (2111,81; 3465,34) *	2584,78 (2366,12; 2770,78) *
Эозинофилы, 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) *
Гистиоциты, 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) *
Плазмоциты, 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) *
Фибробласты, 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) *
Диаметр язвенного дефекта, мкм	0	615,00 (288,00; 680,50) *	936,00 (815,50; 991,50) *	453,00 (349,00; 702,50) *
Индекс повреждения тканей (TDI, у.е)	0	3,00 (3,00; 4,00) *	3,57 (3,00; 4,00) *	3,42 (3,00; 4,00) *

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1.

Морфометрия очага повреждения на 7 сутки выявила увеличение на единице площади содержания лимфоцитов (примерно в 8 раз по медиане по сравнению с группой интактных животных), нейтрофилов (примерно в 13 раз), эозинофилов (примерно в 5 раз), плазмоцитов (примерно в 75 раз), гистиоцитов

(примерно в 109 раз), фибробластов (примерно в 63 раза), а также язвенные дефекты размером около 0,5 мм.

При экспериментальном колите в очаге повреждения количество лимфоцитов на 5 сутки выше, чем на 3 сутки наблюдения, а на 7 сутки – выше, чем на 3 и 5 сутки, количество нейтрофилов на 7 сутки ниже, чем на 3 и 5 сутки, количество эозинофилов на 5 и 7 сутки было меньше, чем на 3 сутки, количество гистиоцитов и плазмоцитов на 5 сутки выше, чем на 3 сутки, на 7 сутки больше, чем на 3 и 5 сутки, количество фибробластов на 5 и 7 сутки больше, чем на 3 сутки, диаметр язвенного дефекта на 5 сутки выше, чем на 3 сутки, а на 7 сутки меньше, чем на 3 и 5 сутки. Как видно, максимальная выраженность морфометрических параметров зафиксирована на 5 и 7 сутки наблюдения, с прогрессивным увеличением от 3 к 7 суткам наблюдения количества лимфоцитов, нейтрофилов, гистиоцитов и плазмоцитов, фибробластов.

Для интегральной оценки микроскопических изменений в очаге повреждения толстого кишечника использовали индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI). При экспериментальном колите на 3, 5 и 7 сутки значения TDI колебались у крыс от 3 до 4, без значимых изменений на 5 сутки по сравнению с 3 сутками и на 7 сутки по сравнению с 3 и 5 сутками наблюдений.

Таким образом, клинико-морфологическая картина ТНБС-индуцируемого колита у крыс соответствует модели воспаления толстой кишки по своим характеристикам ближе к БК, чем к ЯК, что коррелирует с данными других исследователей [83, 93, 151, 189, 243, 276, 278, 301] и позволяет применять представленную экспериментальную модель для изучения патогенеза и апробации эффективности применения новых терапевтических подходов. Типичная для БК клиническая и морфологическая картина разворачивается через 48 часов от ректального введения ТНБС. Полагают, что интаректальное введение ТНБС индуцирует развитие трансмурального колита, характеризующегося преимущественно активацией Th1-зависимый иммунный ответ против гаптен-модифицированных аутологических белков (антигенов) в стенке толстого кишечника или микробных белков кишечной микробиоты с участием различных

провоспалительных цитокинов и медиаторов, инфильтрацией слизистой оболочки CD4⁺ Т-клетками, нейтрофилами и макрофагами, что приводит к трансмуральной инфильтрации лейкоцитами и воспалению. Помимо этого отмечается развитие тяжелой диареи, снижение массы тела и выпадение прямой кишки. Кроме этого, используемый в качестве растворителя для ТНБС 50% раствор этилового спирта вызывает дополнительное повреждение слизистой оболочки толстого кишечника.

3.2 - Изменения параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите

На данном этапе исследования нами при экспериментальном колите проведена оценка количественного состава лейкоцитов в крови и функциональной активности нейтрофилов крови по параметрам поглотительной и НСТ-редуцирующей (кислород-зависимого метаболизма) способности. Результаты представлены в таблицах 5, 6.

На 3 сутки в крови увеличивалось общее количество лейкоцитов, количество эозинофилов, лимфоцитов, моноцитов; на 5 сутки в крови возрастало общее количество лейкоцитов, количество сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов; на 7 сутки - общее количество лейкоцитов, количество лимфоцитов. Итак, при экспериментальном колите увеличивается количество лейкоцитов в крови преимущественно за счет лимфоцитов на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, а также за счет моноцитов на 3 и 5 сутки, за счет нейтрофилов на 5 сутки эксперимента.

При оценке функциональной активности нейтрофилов крови выявлено, что на 3 сутки статистически значимо увеличивается активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, повышается активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, наряду с этим растет функциональный резерв нейтрофилов, рассчитываемый по активности и интенсивности НСТ-теста (таблица 6).

Таблица 5 – Количественный состав лейкоцитов в крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры, 10 ⁹ /л	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 7 сутки (n=7)
Лейкоциты	6,00 (4,00; 6,00)	7,15 (6,20; 7,70) *	8,77 (6,50; 9,90) *	8,00 (6,00; 8,00) *
Палочкоядерные нейтрофилы	0,03 (0,00; 0,05)	0	0,09 (0,03; 0,13)	0,03 (0,00; 0,05)
Сегменто- ядерные нейтрофилы	1,35 (0,96; 1,47)	1,48 (1,48; 1,67)	3,13 (1,88; 3,65) *	1,35 (0,96; 1,47)
Нейтрофилы	1,35 (0,99; 1,53)	1,48 (1,48; 1,67)	3,20 (1,96; 3,74) *	1,36 (0,99; 1,53)
Эозинофилы	0 (0,00; 0,04)	0,05 (0,00; 0,05) *	0	0 (0,00; 0,04)
Базофилы	0	0	0	0
Лейкоциты	3,88 (3,04; 4,25)	4,93 (3,24; 5,98) *	4,89 (1,97; 6,01) *	5,88 (5,04; 6,25) *
Моноциты	0,24 (0,21; 0,27)	0,64 (0,51; 1,14) *	0,58 (0,29; 0,77) *	0,24 (0,21; 0,27)

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1.

Практически аналогичные изменения отмечены на 5 сутки эксперимента: увеличивается активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, повышается активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, функциональный резерв нейтрофилов, рассчитываемый по активности и интенсивности НСТ-теста; активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста значимо не изменяется. На 7 сутки наблюдения увеличиваются параметры поглотительной способности - активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза,

фагоцитарное число, а также параметры НСТ-редуцирующей способности – активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, функциональный резерв нейтрофилов, рассчитываемый по активности и интенсивности НСТ-теста значимо не изменяется.

Таким образом, при экспериментальном колите в крови увеличивается количество лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, растет поглотительная и НСТ-редуцирующая способности нейтрофилов крови. Механизм увеличения количества лейкоцитов в крови и активации функции нейтрофилов крови включает первичную реакцию тканей на повреждение ТНБС, когда в очаг первичной альтерации устремляются нейтрофилы – клетки первой линии обороны, позднее – моноциты, которые, с одной стороны, формируют зону вторичной альтерации за счет повреждения и гибели клеток вокруг первичной альтерации, выделяя ферменты, АФК, с другой стороны – являются источником клеточных медиаторов воспаления (простагландины, лейкотриены, АФК, цитокины – IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, ГМ-КСФ и др.).

Провоспалительные цитокины в первые часы после повреждения вызывают демаргинацию пристеночного пула нейтрофилов, выход зрелых нейтрофилов из костного мозга, а также активацию циркулирующих в крови нейтрофилов (хемотаксис, адгезия к сосудам в зоне повреждения, эмиграция в очаг повреждения, активация киллинговой способности – генерации АФК, ферментов). Это было зарегистрировано нами на 3 сутки экспериментального колита в виде активации поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови и увеличения количества в крови лейкоцитов за счет лимфоцитов и моноцитов. Вероятно, отсутствие увеличения количества нейтрофилов в это время обусловлено их аккумуляцией в зоне повреждения.

Позднее, к 5 суткам экспериментального колита эффект медиаторов воспаления на миелоидный и лимфоидный ростки костного мозга в виде активации пролиферации и дифференцировки клеток проявляется увеличением количества новых нейтрофилов и лимфоцитов в крови и сохранением

повышенной поглотительной и НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови. Данные изменения сохранялись и на 7 сутки за исключением увеличения количества нейтрофилов крови, что, по всей видимости, связано с преимущественной ролью мононуклеарных лейкоцитов – лимфоцитов и моноцитов на данном этапе развития ВЗК.

Как известно, поддержание воспаления в толстом кишечнике и других отделах ЖКТ при ВЗК обеспечивается преимущественно иммунопатологическими реакциями с участием, прежде всего, различных субпопуляций лимфоцитов. Отметим также, что на 5 сутки эксперимента не было статистически значимого увеличения НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови в индуцированном режиме, а на 7 сутки – увеличения функционального резерва нейтрофилов крови, что может отражать как истощение их способности генерировать АФК, так и переключение участия в повреждении тканей с полиморфноядерных лейкоцитов на мононуклеарные.

Далее нами проведена оценка концентрации ИЛ-23 в сыворотке при экспериментальном колите как одного из ключевых цитокинов координации иммунного ответа при этой патологии. Результаты представлены в таблице 7. На 3, 5 и 7 сутки наблюдения концентрация ИЛ-23 в сыворотке статистически значимо увеличивается. При экспериментальном колите концентрация ИЛ-23 на 7 сутки выше, чем на 3 сутки ($p < 0,05$) и 5 сутки ($p < 0,05$) эксперимента.

Таблица 6 – Параметры функциональной активности нейтрофилов крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 7 сутки (n=7)
Активность фагоцитоза, %	36,0 (32,0; 40,0)	52,0 (44,0; 54,0) *	58,5 (45,0; 64,0) *	43,0 (38,0; 67,0) *
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	0,68 (0,6; 0,8)	3,85 (3,63; 3,85) *	6,99 (6,37; 12,16) *	5,78 (3,65; 10,80) *
Фагоцитарное число, у.е.	1,88 (1,90; 2,00)	7,10 (7,10; 7,50) *	14,15 (14,15; 19,0) *	13,40 (9,60; 16,10) *
НСТ-тест сп., акт-ть, %	4,0 (4,0; 5,0)	10,0 (10,0; 10,0) *	15,0 (15,0; 16,0) *	8,5 (2,0; 12,0) *
НСТ-тест сп., инт-ть, у.е.	0,06 (0,05; 0,07)	0,17 (0,15; 0,17) *	0,19 (0,19; 0,20) *	0,09 (0,02; 0,12) *
НСТ-тест инд., акт-ть, %	5,0 (4,0; 6,0)	21,5 (8,0; 22,0) *	8,5 (8,0; 12,0)	10,0 (7,0; 16,0) *
НСТ-тест инд., инт-ть, у.е.	0,06 (0,06; 0,06)	0,26 (0,10; 0,26) *	0,07 (0,05; 0,19)	0,11 (0,07; 0,16) *
Функциональный резерв (активность НСТ-теста)	1,25 (0,80; 1,50)	1,97 (1,33; 2,20) *	1,60 (1,18; 2,00) *	1,47 (0,58; 5,50)
Функциональный резерв (интенсивность НСТ-теста)	1,00 (0,85; 1,00)	1,52 (1,52; 1,6) *	1,60 (1,15; 2,00) *	1,39 (0,58; 1,50)

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1

Ось IL-23/Th17 занимает ключевую роль в патогенезе БК, а полиморфизмы генов этого пути характерны для больных с БК [77, 81, 238, 299]. IL-23 относится к семейству IL-12, имеет общую с IL-12 субъединицу p40, продуцируется преимущественно макрофагами, дендритными и др. клетками и связывается с рецепторами IL-12β1 на Th0, Th17, макрофагах, нейтрофилах и др. клетках. IL-23 при БК имеет значение в конечной дифференцировке Th0 в Th17 после воздействия IL-1β, IL-6, IL-21, TNF-α, в то время как IL-12 индуцирует поляризацию Th1-зависимого иммунного ответа с продукцией IFN-γ, TNF-α и др. цитокинов [43, 221]. Помимо активации Th17-зависимых реакций IL-23 участвует в активации лимфоидных клеток врожденного иммунитета (ILCs), CD8⁺, NK-, NKT-клеток [127]. Th17-связанные эффекторные цитокины, такие как IL-17A и IL-17F, IL-21, IL-22, IL-1β, IL-6, IL-8, ГМ-КСФ, TNF-α, индуцируют и поддерживают воспалительный процесс в стенке толстого кишечника и др. отделов ЖКТ за счет рекрутирования из кровотока нейтрофилов при участии IL-8, синтеза макрофагами провоспалительных медиаторов IL-6, IL-1β, IL-6, TNF-α и др., секреции матриксных металлопротеиназ фибробластами кишечника [156]. Концентрация IL-23 у больных с БК повышается в сыворотке и в стенке кишечника и коррелирует с активностью заболевания. Кроме того, у нокаутированных по пути IL-23/Th17 животных не моделируется БК с использованием традиционных химических агентов, а блокада общей для IL-23 и IL-12 субъединицы p40, а также IL-17A, IL-17F в эксперименте продемонстрировала эффективность при БК [121, 200, 242]. IL-23 также рассматривается как связующее звено между реакциями врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе БК и потенциальная терапевтическая мишень [103].

Таблица 7 – Концентрация IL-23 в сыворотке (пг/мл) при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметр	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 7 сутки (n=7)
IL-23, пг/мл	32,16 (28,95; 43,42)	75,52 (65,94; 85,24) *	71,57 (59,51; 73,18) *	86,04 (78,81; 91,67) *

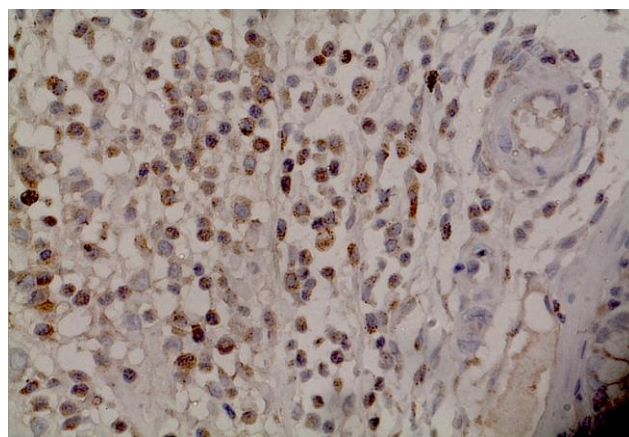
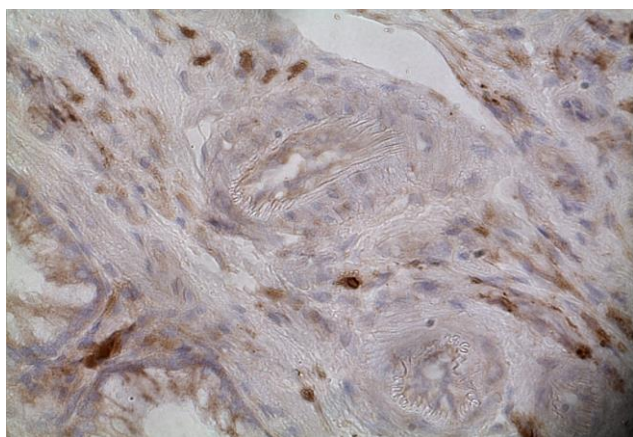
Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1

Не вызывает сомнения факт, что обнаруженные нами изменения иммунологических параметров при экспериментальном колите в виде увеличения количества лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов в крови, активация функциональной активности нейтрофилов крови, повышение концентрации IL-23 в сыворотке являются отражением иммунопатологических событий, протекающих в очаге повреждения – стенке толстого кишечника. В связи с этим, на следующем этапе нами при экспериментальном колите исследовано содержание МПО и TNF- α в стенке толстого кишечника иммуногистохимическими методами. Выбор указанных маркеров обусловлен их ролью в повреждении клеток кишечника с участием активных форм кислорода (АФК) и их деривата - гипохлорита (для образования которого необходима МПО), отражающего, в том числе деструктивную активность клеток миелоидного ряда, их участие в инициации и поддержании воспалительного процесса в толстом кишечнике. Значение TNF- α как одного из ключевых провоспалительных цитокинов и мишени препаратов биологической терапии, направленных на активацию собственно TNF- α или его рецепторов, бесспорна и также не вызывает сомнения. Роль TNF- α связана не только с активацией эффекторов врожденного иммунитета (нейтрофилов и макрофагов, продуцирующих АФК, ферменты), но и с активацией Th1- и Th17-зависимых иммунных реакций адаптивного иммунитета, рассматриваемых как маркерные при болезни Крона.

Принято считать, что активность МПО в клеточных популяциях ткани толстого кишечника является одним из ключевых маркеров ВЗК, определяет вероятность и длительность ремиссии, коррелирует с другими лабораторными маркерами, такими как уровень в сыворотке С-реактивный белок, кальпротектина, индексами клинической активности и может применяться для оценки эффективности проводимой терапии [100, 250].

Основным источником МПО в ткани толстого кишечника являются нейтрофилы, аккумуляция которых при ВЗК в стенке толстого кишечника была зафиксирована в разделе 3.1 главы 3. Не меньшее значение имеет и содержание TNF- α в ткани толстого кишечника, с которым связывают выраженность иммунопатологических реакций и повреждения стенки кишечника [311].

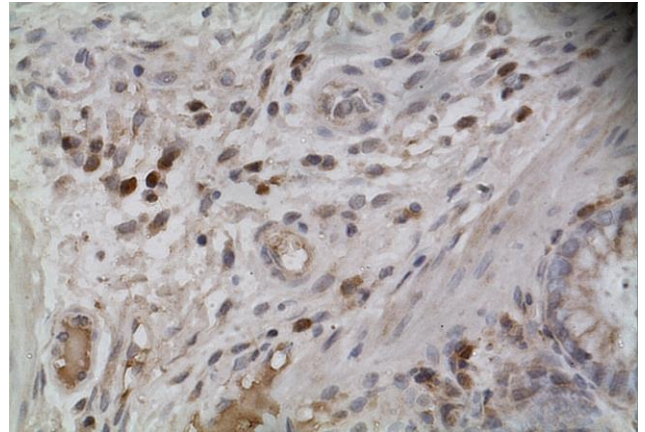
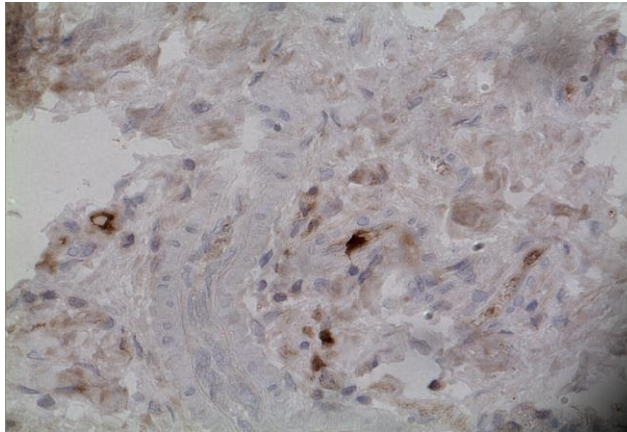
Таким образом, результаты оценки содержания миелопероксидазы (МПО) (рисунок 9) и TNF- α (рисунок 10) при экспериментальном колите представлены в таблице 8. Как видно, на 3, 5 и 7 сутки в клеточных популяциях ткани толстого кишечника значительно повышается уровень содержания МПО. При экспериментальном колите содержание МПО на 7 сутки значительно ($p < 0,05$) ниже, чем на 3 и 5 сутки. Наряду с этим, повышается содержание TNF- α на 3, 5 и 7 сутки наблюдения. Причем, содержание TNF- α на 7 сутки значительно ($p < 0,05$) ниже, чем на 3 и 5 сутки. Как видно, максимальное содержание МПО и TNF- α в толстом кишечнике при экспериментальном колите фиксируется на 3 и 5 сутки эксперимента.



а)

б)

Рисунок 9 – Иммуногистохимическое выявление МПО: а) у интактных животных; б) на 5 сутки экспериментального колита без лечения (окраска ДАБ-гематоксилин, ув. X400)



а)

б)

Рисунок 10 – Иммуногистохимическое выявление TNF- α : а) у интактных животных; б) на 5 сутки экспериментального колита без лечения (окраска ДАБ-гематоксилин, ув. X400)

Таблица 8 – Содержание миелопероксидазы и TNF- α в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 7 сутки (n=7)
Миелопероксидаза, 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)

		*	*	*
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) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1.

3.3 - Изменения параметров адаптивного иммунитета при экспериментальном колите

Результаты оценки количественного состава основных субпопуляций лимфоцитов в крови при экспериментальном колите представлены в таблице 9. Количество в крови CD3⁺ лимфоцитов, то есть суммарное представительство преимущественно Т-лимфоцитов, статистически значимо увеличивается на 5 и 7 сутки эксперимента, отличий на 7 сутки по сравнению с 3 и 5 сутками и на 5 сутки по сравнению с 3 сутками не обнаружено ($p > 0,05$). Количество в крови CD45RA⁺ клеток, отражающее преимущественно уровень В-лимфоцитов, значимо возрастает только на 7 сутки, количество CD45RA⁺ клеток на 7 сутки значимо выше, чем на 3 и 5 сутки ($p < 0,05$).

Нами обнаружено, что при экспериментальном колите повышается гибель лимфоцитов крови путем некроза и апоптоза (таблица 10). Так, на 3 сутки эксперимента снижается количество интактных лимфоцитов, увеличивается содержание лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, не изменяется содержание лимфоцитов с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток значимо. На 5 и 7 сутки экспериментальном колите статистически значимо снижается количество интактных лимфоцитов, увеличивается содержание лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток.

Таблица 9 – Субпопуляционный состав лимфоцитов крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 7 сутки (n=7)
CD3 ⁺ лимфоциты, • 10 ⁹ /л	3,38 (2,45; 4,84)	4,25 (3,64; 4,83)	4,97 (3,76; 8,15) *	4,62 (3,57; 5,67) *
CD45RA ⁺ лимфоциты, • 10 ⁹ /л	1,56 (1,49; 1,88)	1,14 (0,88; 1,74)	1,14 (1,18; 2,26)	2,18 (1,16; 3,52) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1

Однако, с учетом данных о количественном составе лейкоцитов в крови, полагаем, что лимфопоэз-стимулирующие сигналы при экспериментальном колите превалируют над факторами активации гибели лимфоцитов. К числу последних, можно отнести ряд провоспалительных цитокинов, прежде всего, TNF- α .

Внимание большинства исследователей сосредоточено на изучении гибели лимфоцитов, выделенных из кишечника пациентов с ВЗК, они констатируют, что эти лимфоциты содержат повышенный уровень антиапоптогенных факторов (Bcl-2 и Bcl-XL) и низкий – проапоптогенных (Bax) [105]. Принято считать, что лимфоциты слизистой кишечника являются более восприимчивы к проапоптогенным сигналам, чем циркулирующие лимфоциты, однако при ВЗК они аберрантно реагируют на сигналы апоптоза и тем самым способствуют хронизации воспаления в кишечнике [114, 177]. Данные по апоптозу лимфоцитов крови у больных с ВЗК крайне скудны и противоречивы, несмотря на многочисленные системные внекишечные проявления, связанные и с изменением гибели циркулирующих лимфоцитов [296].

Исследования К. Neubauer et al. показали, что в лимфоцитах, выделенных из крови больных с ВЗК, снижена экспрессия ключевого антиапоптогенного фактора Bcl-2, что рассматривается как фактор восприимчивости к апоптозу, особенно при обострении заболевания, кроме того, Bcl-2 рассматривается как диагностический

биомаркер тяжести ВЗК [220]. Однако, по данным этих же авторов, в лимфоцитах больных с ВЗК снижена концентрация и проапоптогенных факторов (цитохром С, р53, эффекторная каспаза-3), однако при обострении ВЗК концентрация цитохрома с в лимфоцитах увеличивается. У детей с ВЗК зафиксировано увеличение апоптоза лимфоцитов крови [116]. Другие исследователи констатируют в лимфоцитах крови у больных с ВЗК повышение активности как анти-, так и проапоптогенных генов [110]. Полагают, что отмена внутренних сигналов апоптоза (цитохром с, р53, эффекторная каспаза-3) делает лимфоциты более восприимчивыми к внешним проапоптогенным сигналам, таким как TNF- α [315].

Итак, полученные данные свидетельствуют о заинтересованности при БК не только Т-зависимых реакций в очаге повреждения толстого кишечника, то есть, с учетом данных литературы, Th1- и Th17-зависимого иммунного ответа, но и Th2-зависимых реакций с участием В-клеток. На современном этапе развития медицины полагают, что представление о том, что в патогенезе БК имеют значение преимущественно Th1-зависимые реакции, а в патогенезе язвенного колита – Th2-зависимые является архаичным и не отражающим фактически протекающие события смешанного характера с участием Th1- и Th2-опосредованных реакций как при БК, так и при язвенном колите.

Таблица 10 – Параметры гибели лимфоцитов крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры, % клеток	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 эксперимен- тальный колит 7 сутки (n=7)
Annexin-5-FITC- /7-AAD-	92,57 (91,29; 93,87)	89,18 (86,17; 89,97) *	86,35 (82,23; 88,76) *	83,94 (81,67; 86,27) *
Annexin-5- FITC+/7-AAD-	5,91 (4,94; 7,22)	10,28 (9,01; 11,12) *	11,05 (10,84; 16,63) *	14,69 (13,26; 17,21) *

Annexin-5- FITC+/7-AAD+	0,48 (0,21; 0,94)	0,35 (0,05; 0,41)	1,01 (0,42; 1,59) *	0,62 (0,38; 1,01) *
----------------------------	----------------------	----------------------	------------------------	------------------------

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1

Данный факт находит подтверждение при исследовании концентрации иммуноглобулинов в сыворотке при экспериментальном колите (таблица 11). Уровень IgG в сыворотке увеличивается на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Концентрация IgG на 5 сутки выше, чем на 3 сутки ($p < 0,05$), а на 7 сутки – ниже, чем на 3 и 5 сутки ($p < 0,05$). Аналогичные изменения отмечены при исследовании концентрации IgM в сыворотке: повышение на 3, 5 и 7 сутки, концентрация Ig M на 5 сутки выше, чем на 3 сутки ($p < 0,05$).

Таблица 11 – Концентрация иммуноглобулинов в крови при экспериментальном колите (Me (Q_{25} ; Q_{75}))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 3 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 5 сутки (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 7 сутки (n=7)
Иммуноглобулин G, нг/мл	3,05 (3,02; 3,22)	17,11 (17,11; 21,17) *	26,93 (23,66; 28,07) *	11,22 (5,15; 18,46) *
Иммуноглобулин M, нг/мл	10,89 (8,85; 11,69)	17,64 (12,71; 28,22) *	20,81 (20,11; 22,93) *	17,99 (13,96; 21,87) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1

3.4 - Изменения параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите

Как было отмечено выше в разделах 3.2, 3.3 главы 3, при экспериментальном колите в очаге повреждения толстого кишечника наблюдается аккумуляция лейкоцитов, в том числе нейтрофилов и макрофагов – ключевых продуцентов активных форм кислорода (АФК), повышается содержание МПО, а нейтрофилы крови характеризуются повышением поглотительной и НСТ-редуцирующей активности (кислород-зависимого

метаболизма). Указанные изменения предполагают участие процессов свободно-радикального окисления в повреждении тканей кишечника при экспериментальном колите. В связи с этим, на следующем этапе нами исследовано содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) – основных метаболитов, характеризующих интенсивность процессов с участием АФК, в гомогенате слизистой оболочки очага повреждения толстого кишечника.

В липидном экстракте слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите изменяется содержание продуктов ПОЛ (таблица 12). Так, на 3 сутки наблюдения увеличивается в гептановой фазе количество первичных и вторичных продуктов, в изопропанольной фазе – первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ. На 5 сутки эксперимента увеличивается в гептановой фазе количество вторичных, в изопропанольной фазе – первичных, вторичных продуктов ПОЛ, а на 7 сутки возрастает в гептановой фазе количество первичных и конечных продуктов, в изопропанольной фазе – первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ.

Итак, при экспериментальном колите зафиксировано накопление продуктов ПОЛ как в изопропанольной фазе липидного экстракта слизистой толстого кишечника, которая аккумулирует преимущественно фосфолипиды клеточных мембран, так и в гептановой фазе, то есть в триацилглицеридах. Отметим преимущественное накопление продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе. В гептановой фазе содержание вторичных продуктов ПОЛ нарастает от 3 к 5 суткам ($p < 0,05$), в изопропанольной фазе содержание первичных продуктов ПОЛ нарастает от 3 к 5 суткам ($p < 0,05$), вторичных и конечных – от 5 к 7 суткам ($p < 0,05$).

Таблица 12 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 экспериментальный колит 3 сутки	Группа 2 экспериментальный колит 5 сутки	Группа 2 экспериментальный колит 7 сутки

		(n=7)	(n=7)	(n=7)
Диеновые конъюгаты (г), е.и.о.	0,63 (0,55; 0,65)	0,79 (0,79; 0,81) *	0,66 (0,66; 0,68)	0,75 (0,74; 0,81) *
Кетодиены и сопряженные триены (г), е.и.о.	0,06 (0,05; 0,06)	0,09 (0,06; 0,09) *	0,17 (0,17; 0,18) *	0,07 (0,06; 0,09)
Основания Шиффа (г), е.и.о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,01 (0,01; 0,01)	0,02 (0,01; 0,02)	0,03 (0,03; 0,04) *
Диеновые конъюгаты (и), е.и.о.	0,34 (0,32; 0,36)	0,38 (0,38; 0,45) *	0,53 (0,52; 0,57) *	0,43 (0,41; 0,45) *
Кетодиены и сопряженные триены (и), е.и.о.	0,31 (0,29; 0,32)	0,61 (0,61; 0,71) *	0,41 (0,38; 0,41) *	0,51 (0,51; 0,55) *
Основания Шиффа (и), е.и.о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,08 (0,08; 0,11) *	0,01 (0,00; 0,01)	0,14 (0,12; 0,14) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1. Параметры отражают содержание продуктов перекисного окисления липидов в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазах липидного экстракта гомогената слизистой оболочки толстого кишечника. Параметры выражены в единицах индексов окисления (е.и.о.)

Таким образом, при экспериментальном колите наряду с утяжелением симптомов в виде снижения массы тела, частоты и консистенции стула, наличия крови в каловых массах, выявлено увеличение количества продуктов ПОЛ в слизистой толстого кишечника. Полагаем, что эскалация оксидативного стресса, инициируемого продукцией АФК активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами в очаге первичного повреждения в условиях дефицита активности и/или количества ферментов антиокислительной защиты приводит к дополнительному повреждению, дисфункции и гибели клеток

толстого кишечника, расширению зоны вторичной альтерации и как следствие утяжелению симптомов экспериментального колита.

Далее нами проведена оценка содержания продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах при экспериментальном колите. Результаты представлены в таблицах 13, 14. Обнаружено, что на 3, 5 и 7 сутки эксперимента увеличивается суммарное количество карбонильных производных белков - необратимых продуктов окислительного стресса, формирующихся за счет окисления нескольких аминокислотных остатков, а также взаимодействия с продуктами перекисного окисления липидов и редуцирующими сахарами [39]. Суммарное содержание продуктов ОМБ снижается на 5 сутки по сравнению с 3 сутками ($p < 0,05$) и возрастает на 7 сутки по сравнению с 3 и 5 сутками наблюдения ($p < 0,05$).

Анализ содержания компонентов ОМБ в гомогенате толстого кишечника выявил, что на 3 и 7 сутки экспериментального колита увеличивается содержание альдегидов и кетонов как в области УФ-света, так и в области видимого света, а на 5 сутки экспериментального колита увеличивается количество альдегидов в области видимого света, а кетонов – в области УФ-света и в области видимого света. Поскольку в области УФ-спектра накапливаются карбонильные производные нейтрального характера, а в видимой – основного характера, то относительный анализ суммарного содержания карбониллов в области УФ-света и в области видимого света позволяет оценить природу образовавшихся продуктов при экспериментальном колите. Так, на 3 и 5 сутки экспериментального колита относительное содержание продуктов ОМБ основного и нейтрального характера не отличается от группы интактных животных, несмотря на увеличение абсолютного содержания этих продуктов ОМБ.

Таблица 13 – Параметры спонтанной окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1	Группа 2	Группа 2	Группа 2
-----------	----------	----------	----------	----------

	Интактные (n=7)	эксперимен-тальный колит 3 сутки (n=7)	эксперимен-тальный колит 5 сутки (n=7)	эксперимен-тальный колит 7 сутки (n=7)
S АДНФГ uv, у.е./мг белка	151,21 (128,47; 158,35)	283,62 (216,12; 291,47) *	150,17 (148,52; 161,95)	345,15 (298,16; 400,92) *
S АДНФГ vs, у.е./мг белка	5,03 (4,43; 5,14)	14,19 (13,25; 15,21) *	7,76 (7,53; 8,38) *	16,08 (15,93; 32,03) *
S КДНФГ uv, у.е./мг белка	9,45 (8,29; 9,81)	19,77 (18,28; 26,67) *	15,31 (14,83; 16,61) *	29,84 (28,85; 51,81) *
S КДНФГ vs, у.е./мг белка	0,67 (0,65; 0,68)	1,59 (1,38; 1,91) *	0,89 (0,87; 0,93) *	2,43 (2,21; 4,25) *
S ОМБ спонт., у.е./мг белка	141,86 (136,04; 166,74)	324,21 (313,48; 340,93) *	185,88 (170,67; 242,59) *	392,31 (272,17; 497,71) *
S АДНФГ, у.е./мг белка	132,91 (124,19; 156,25)	302,83 (293,81; 312,35) *	169,72 (157,23; 222,68)	432,96 (361,24; 470,71) *
S КДНФГ, у.е./мг белка	10,23 (8,94; 10,49)	21,37 (19,66; 28,57) *	16,16 (14,61; 18,61) *	31,95 (31,05; 58,21) *
% АДНФГ	93,71 (93,69; 93,71)	92,59 (91,61; 93,41)	91,43 (91,31; 92,51)	89,13 (88,99; 90,02)
% КДНФГ	6,29 (6,29; 6,31)	7,41 (6,59; 8,38)	8,56 (7,49; 8,69) *	11,02 (10,93; 11,12) *
S uv, у.е./мг белка	161,03 (136,76; 167,81)	311,25 (301,91; 324,83) *	162,24 (161,97; 177,26)	374,01 (254,37; 461,42) *
S vs, у.е./мг белка	5,71 (5,09; 5,92)	12,95 (11,57; 16,09) *	8,43 (7,98; 8,62) *	27,33 (18,33; 40,52) *
% uv	96,57 (96,41; 96,58)	95,57 (95,27; 96,01)	95,29 (95,13; 95,36)	92,88 (92,72; 93,59) *
% vs	3,42 (3,41; 3,59)	4,42 (3,99; 4,72)	4,71 (4,63; 4,86)	7,11 (6,41; 7,27) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1. S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, uv – ультрафиолет, vs – видимый свет.

На 7 сутки эксперимента зафиксировано смещение спектра в сторону образования продуктов ОМБ основного характера, о чем свидетельствует снижение суммарного относительного содержания продуктов в области УФ-спектра и повышение суммарного относительного содержания продуктов в области видимого света.

Суммарное содержание в кишечнике при экспериментальном колите альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) повышается на 3 и 7 сутки, содержание кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) – на 3, 5 и 7 сутки. При

этом, относительное распределение АДНФГ и КДНФГ значимо не изменяется на 3 сутки, а на 5 и 7 сутки эксперимента не изменяется относительное содержание АДНФГ и повышается - КДНФГ. Данный факт позволяет констатировать на 5 и 7 сутки экспериментального колита преимущественное накопление вторичных продуктов ОМБ, то есть поздних маркеров окислительной деструкции белка, а также преимущественно фрагментацию белков под влиянием совместного действия радикалов $\text{OH}\cdot$ и $\text{O}_2\cdot^-$ [104]. Белковые фрагменты высокоустойчивы к протеолизу, имеют токсические свойства и могут инициировать апоптоз или некроз клеток, расширяя зону вторичной альтерации [24].

Проведена оценка резервно-адаптационного потенциала в гомогенате толстого кишечника при экспериментальном колите путем подсчета отношения общей содержания продуктов ОМБ в спонтанном режиме и металл-индуцированном (таблица 14). Для этого исследовано содержание продуктов ОМБ в гомогенате толстого кишечника после индукции окисления белков компонентами реакционной смеси, содержащей Fe^{2+} и H_2O_2 , что сопровождается образованием высокоректогенного радикала $\text{OH}\cdot$ в реакции Фентона. Это позволяет оценить прирост образования *in vitro* под действием реактива Фентона карбонильных производных с подсчетом отношения результатов измерения продуктов спонтанного окисления к индуцированному. Обнаружено, что параметры ОМБ в металл-индуцированном режиме в гомогенате толстого кишечника повышаются на 3, 5 и 7 сутки экспериментального колита в отношении суммарного содержания продуктов ОМБ, содержания АДНФГ и КДНФГ как при оценке в области УФ-спектра, так и видимого спектра, повышается и суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ в области УФ-спектра и видимого спектра.

Таблица 14 – Параметры металл-зависимой окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры,	Группа 1	Группа 2	Группа 2	Группа 2
------------	----------	----------	----------	----------

у.е./мг белка	Интактные (n=7)	эксперимен- тальный колит 3 сутки (n=7)	эксперимен- тальный колит 5 сутки (n=7)	эксперимен- тальный колит 7 сутки (n=7)
S АДНФГ uv, у.е./мг белка	202,95 (202,95; 205,68)	313,07 (311,25; 347,79) *	316,74 (293,11; 326,78) *	464,16 (416,31; 585,37) *
S АДНФГ vs, у.е./мг белка	25,94 (25,22; 25,94)	32,25 (32,02; 32,82) *	61,99 (51,39; 70,35) *	89,52 (77,11; 107,87) *
S КДНФГ uv, у.е./мг белка	33,94 (33,55; 33,95)	42,42 (41,01; 43,42) *	71,12 (60,14; 80,76) *	107,81 (98,51; 128,56)*
S КДНФГ vs, у.е./мг белка	3,35 (3,35; 3,41)	4,46 (4,16; 4,46) *	6,72 (5,84; 8,98) *	12,94 (11,62; 13,31) *
S ОМБ индуц., у.е./мг белка	266,21 (266,21; 280,81)	380,93 (373,56; 427,51) *	414,95 (414,94; 486,89) *	662,05 (643,29; 690,09) *
S АДНФГ, у.е./мг белка	228,91 (227,81; 228,91)	340,36 (336,48; 380,61) *	360,77 (346,74; 397,13) *	533,57 (525,35; 585,49) *
S КДНФГ, у.е./мг белка	37,31 (37,07; 37,31)	46,88 (45,16; 47,88) *	68,19 (64,65; 89,75) *	135,03 (123,99; 159,56) *
% АДНФГ	86,94 (85,98; 88,02)	89,34 (89,03; 90,07)	81,56 (81,56; 83,56) *	81,15 (81,01; 83,48) *
% КДНФГ	13,05 (11,97; 14,01)	10,65 (9,92; 10,96)	18,43 (16,43; 18,43) *	18,84 (16,51; 18,99) *
S uv, у.е./мг белка	236,91 (236,91; 297,16)	350,11 (344,81; 390,21) *	354,59 (348,42; 407,54) *	527,74 (334,25; 541,24) *
S vs, у.е./мг белка	29,29 (29,29; 29,98)	36,19 (30,83; 36,71) *	60,35 (55,01; 79,34) *	87,26 (52,72; 101,14)*
% uv	88,99 (88,99; 90,83)	91,91 (91,27; 92,31) *	83,71 (83,71; 85,45) *	84,52 (83,91; 86,37) *
% vs	11,01 (9,16; 11,01)	8,09 (7,69; 8,72) *	16,29 (14,54; 16,29) *	15,47 (13,62; 16,08) *
РАП, %	54,71 (51,53; 56,71)	80,25 (74,89; 87,87) *	45,39 (42,73; 51,97)*	57,15 (50,11; 59,71)

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1. S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, ОМБ – окислительная модификация белков, uv – ультрафиолет, vs – видимый свет, РАП – резервно-адаптационный потенциал

Таким образом, как видно, изменения параметров ОМБ в металл-индуцированном режиме по своей направленности соответствуют изменениям параметров ОМБ в спонтанном режиме. Общий резервно-адаптационный потенциал значительно повысился на 3 сутки экспериментального колита и снизился на 5 сутки, к 7 суткам наблюдения – статистически значимо не отличался от группы интактных животных. Данное изменение резервно-адаптационного потенциала обусловлено на 3 сутки повышением резервно-

адаптационного потенциала альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ) в области УФ-спектра и видимого спектра, но преимущественно – КДНФГ, регистрируемых в области видимого спектра, на 5 сутки - снижением резервно-адаптационного потенциала АДНФГ в области УФ-спектра и видимого спектра и КДНФГ, регистрируемых в области УФ-спектра, но преимущественно - АДНФГ в области УФ-спектра.

3.5 - Экспериментальное обоснование состава и стандартизация ректальных суппозиторий, содержащих спиртовой экстракт корневищ куркумы длинной

Технология получения экстрактов подразумевает использование различных методов [21]. Для получения жидкого экстракта корневищ куркумы длинной нами был предложен метод ускоренной дробной мацерации по принципу противотока, отличающийся простотой в исполнении, не требующий дорогостоящего оборудования, применяемый на небольших производствах и в лабораториях [18]. Кроме того, данный метод позволяет получать при меньшем расходе чистого экстрагента более концентрированные вытяжки, так как в каждом перколяторе поддерживается значительная разница концентраций [18]. Поскольку куркуминоиды, представляющие собой полифенольные соединения, практически нерастворимы в воде, но растворимы в спирте этиловом, то в качестве растворителя мы использовали именно его, тем более, что для приготовления жидких экстрактов в качестве экстрагента используют спирт этиловый в концентрации 50 – 70%, реже – другой концентрации [10, 21]. Основным условием для выполнения методики было определение степени высвобождения куркумина из экстракта корневищ куркумы длинной. В связи с этим нами были проведены исследования с использованием спирта этилового 40 – 96%. Методом УФ-спектрофотометрии по методике, предложенной в проекте ФС «Куркумы длинной корневища», принятый в ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России [3] при длине волны 545 нм, определяли содержание куркумина, экстрагированного с

использованием спирта этилового различной концентрации. Содержание куркуминоидов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x * 25 * 25}{A_{1cm}^{1\%} * a * V_a}, \quad (4)$$

где A_x – оптическая плотность экстракта корневищ куркумы длиной спиртового; $A_{1cm}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения окрашенного комплекса куркумина при длине волны 545 нм, равный 2050; a – навеска экстракта, г; V_a – объём аликвоты, мл.

Результаты представлены на рисунке 11.

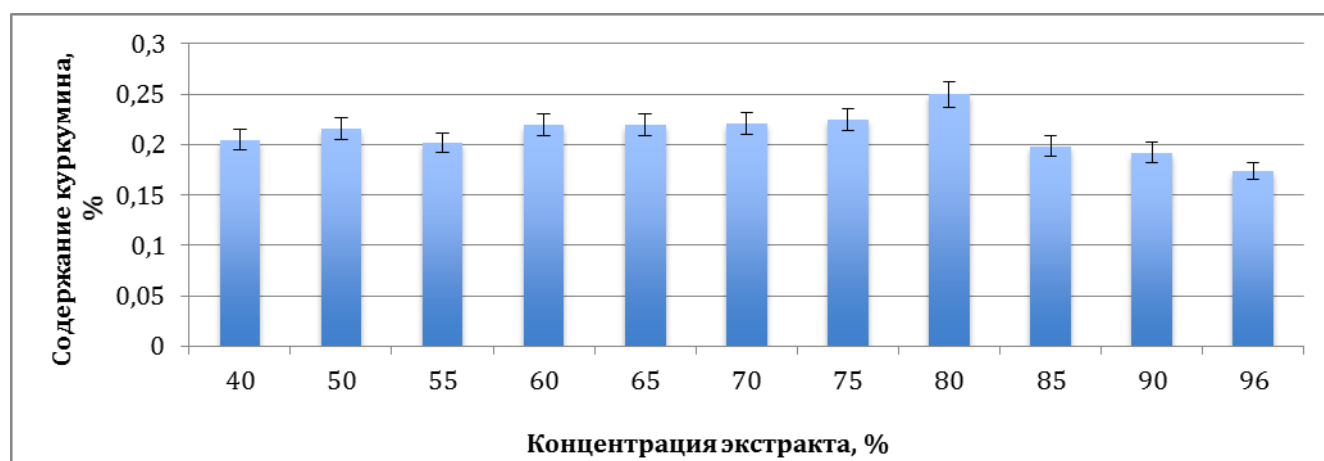


Рисунок 11 – Оценка высвобождения действующих веществ из экстрактов корневищ куркумы длиной спиртовых различной концентрации.

Установлено, что максимальное количество действующих веществ высвобождалось из экстракта корневищ куркумы длиной с использованием в качестве растворителя спирта этилового 80%.

Следующим этапом исследования была стандартизация полученного экстракта по показателям, приведенным в ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты» [13], а также по показателям подлинности методом ТСХ, приведенным в ОФС.1.2.1.2.0003.15 [12] и количественного определения куркумина.

Для определения подлинности куркумина использовали метод ТСХ в системе растворителей хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1) [6, 36]. Было

установлено, что при детектировании УФ светом при длине волны 365 нм наблюдалась зона, характерная для куркумина с величиной фактора удерживания R_f $0,64 \pm 0,0085$, имеющая желто-зеленую флуоресценцию; а при длине волны 254 нм также обнаруживалась дополнительное пятно фиолетового цвета, выше всех зон адсорбции с величиной R_f $0,88 \pm 0,0087$.

Для количественной оценки содержания куркумина в экстракте корневищ куркумы длинной спиртовом была выбрана методика УФ-спектрофотометрического определения, основанная на способности куркумина реагировать с раствором борной кислоты с образованием розоцианина. Оптическую плотность полученного комплекса измеряли при 545 ± 2 нм (рисунок 12) [3].



Рисунок 12 - УФ - спектр раствора спиртового экстракта корневищ куркумы длинной

Нами проведено исследование 6 серий экстрактов, полученных из одного вида сырья в одинаковых условиях. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Определение количественного содержания куркумина в составе спиртового экстракта корневищ куркумы длинной.

№ образца экстракта	Содержание куркумина, г/мл	Валидационные характеристики
1 образец	0,0002511	$X_{cp} = 0,000250$ $SD = 1,094 \cdot 10^{-5}$ $RSD = 7,92 \cdot 10^{-6}$
2 образец	0,0002492	

3 образец	0,0002523	$\Delta x = 2,03 \cdot 10^{-5}$ $\varepsilon = 0,81\%$
4 образец	0,0002482	
5 образец	0,0002532	
6 образец	0,0002534	

Примечание: $X_{\text{ср}}$ – средний результат, SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, Δx – полуширина доверительного интервала величины, ε – относительная ошибка.

Ошибка определения не превысила 1%. Стандартизацию полученного экстракта проводили на образцах 6 серий при хранении в естественных условиях в течение 18 месяцев. Результаты представлены в таблице 16. Таким образом, полученный экстракт в течение 18 месяцев оставался стабильным.

Следующим этапом исследования был выбор дозировки полученного экстракта в суппозиторную основу для обеспечения антиоксидантного эффекта и предупреждения развития прооксидантного действия. Определение проводили спектрофотометрическим методом, основанным на способности антиоксидантов нейтрализовывать пероксида водорода, снижая его концентрацию и препятствуя его связыванию с молибдатом аммония с образованием окрашенного комплекса.

Величину антиоксидантной активности рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%, \quad (5)$$

где A_1 – оптическая плотность раствора без добавления исследуемого вещества; A_2 – оптическая плотность раствора с добавлением исследуемого вещества.

Установлено, что максимальный эффект будет наблюдаться при введении в суппозиторий 0,3 мл экстракта (рисунок 13).

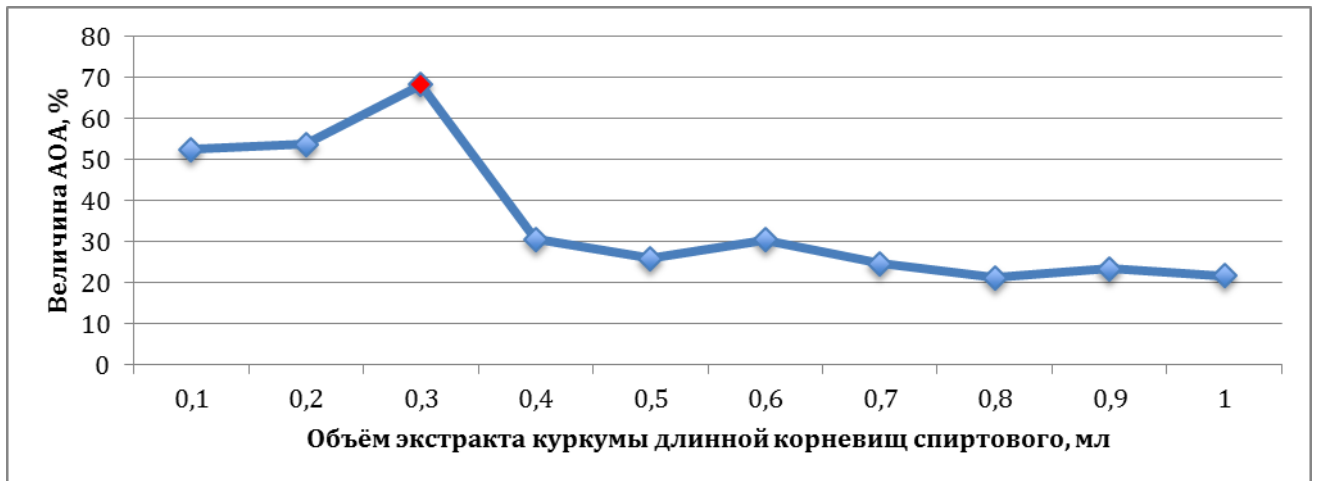


Рисунок 13 – Показатели антиоксидантной активности спиртового экстракта корневищ куркумы длинной.

Выбор лекарственной формы в виде ректальных суппозиториях обусловлен рядом их преимуществ перед иными препаратами: возможностью замены инъекционных лекарственных форм благодаря высокой биодоступности ректальных суппозиториях, отсутствие риска травмирования ЖКТ и инактивации веществ пищеварительными ферментами, простота, удобство применения, возможность использования данной лекарственной формы у пациентов в тех случаях, когда затруднителен иной путь введения [33].

Таблица 16 – Оценка показателей качества спиртового экстракта корневищ куркумы длинной

Показатели качества							
	Описание	Спирт этиловый	Тяжелые металлы	Сухой остаток, %	Микробиологическая чистота	Подлинность спиртового экстракта куркумы длинной корневищ	Содержание куркумина в спиртовом экстракте корневищ куркумы длинной 80% в пересчете на куркумин, г
Нормируемые требования							
Период хранения	Прозрачная жидкость, окрашенная в интенсивный желто-оранжевый цвет	В соответствии с ОФС .1.2.1.0016.1 5 Не менее 70%	В соответствии с ОФС.1.2.2.2.0012.1 5 Требование по содержанию тяжелых металлов – не более 0,01%	В соответствии с ОФС.1.4.2.0021.15 3,48±0,11	В соответствии с ОФС.1.4.2.0002.18 Микробиологическая чистота (Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10 ⁵ КОЕ/г; общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 ⁴ КОЕ/г; энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10 ³ КОЕ в 1 г; отсутствие Escherichia coli в 1 г; отсутствие бактерий рода Salmonella в 25 г)	Методом ТСХ В системе растворителей хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1), должны обнаруживаться 2 пятна с величиной Rf 0,64±0,0085 при 365 нм и Rf 0,88±0,0087 при 254 нм	УФ – спектрофотометрия Содержание куркумина, г/мл должно быть 0,00025±0,0000203

Продолжение таблицы 16

1 мес	Соответств.	75,22	Соответств.	3,52	Соответств.	Соответств.	0,0000249
2 мес	Соответств.	75,93	Соответств.	3,49	Соответств.	Соответств.	0,0000251
4 мес	Соответств.	74,15	Соответств.	3,37	Соответств.	Соответств.	0,0000252
6 мес	Соответств.	74,53	Соответств.	3,58	Соответств.	Соответств.	0,000250
8 мес	Соответств.	75,35	Соответств.	3,54	Соответств.	Соответств.	0,000249
10 мес	Соответств.	73,33	Соответств.	3,42	Соответств.	Соответств.	0,000251
12 мес	Соответств.	74,23	Соответств.	3,44	Соответств.	Соответств.	0,000252
14 мес	Соответств.	73,38	Соответств.	3,51	Соответств.	Соответств.	0,000249
16 мес	Соответств.	73,19	Соответств.	3,47	Соответств.	Соответств.	0,000253
18 мес	Соответств.	74,23	Соответств.	3,52	Соответств.	Соответств.	0,000249

Примечание: ОФС – общая фармакопейная статья, КОЕ – колониеобразующие единицы, ТСХ – тонкослойная хроматография, УФ – ультрафиолет, Rf – скорость перемещения.

Рядом авторов [3] были проведены предварительные исследования по разработке состава суппозиторий с густым экстрактом куркумы длинной.

Выбор оптимальной основы, обеспечивающей максимальное высвобождение действующих веществ, базировался на исследовании кинетики высвобождения куркумина из суппозиторий в тесте «Растворение». Установлено, что высвобождение экстракта корневищ куркумы длинной спиртового происходит преимущественно из гидрофильных основ, в то время как липофильные основы высвобождали действующие вещества за 45 минут не более чем на 60%. Поэтому дальнейшие исследования проводили с гидрофильными составами на основе ПЭГов с различной молекулярной массой, в состав которых входили различные по своей природе вспомогательные вещества. Всего рассмотрено 20 композиций, состав которых представлен в таблице 17.

Таблица 17 – Составы суппозиторных основ из расчета на 10 суппозиторий

№ основы	ПЭГ 1500	ПЭГ 6000	Колифор Р 188	Кремофор RH-40	Эмульгатор Т-2
1 образец	0,05	0,80	0,55	1,05	0,3
2 образец	0,10	0,70	0,90	1,00	0,3
3 образец	0,15	0,60	0,80	1,15	0,3
4 образец	0,25	0,95	0,50	1,20	0,3
5 образец	0,30	0,80	0,60	1,20	0,3
6 образец	0,30	0,70	0,75	1,25	0,1
7 образец	0,30	0,70	0,55	1,20	0,3
8 образец	0,30	0,80	0,65	1,15	0,3
9 образец	0,20	0,70	0,65	1,15	0,3
10 образец	0,30	0,60	0,65	1,15	0,3
11 образец	0,30	0,70	0,65	1,25	0,2
12 образец	0,30	0,60	0,75	1,25	0,2
13 образец	0,35	0,65	0,75	1,05	0,1
14 образец	0,30	0,80	0,55	1,05	0,1
15 образец	0,30	0,70	0,90	1,00	0,1
16 образец	0,30	0,60	0,80	1,15	0,1
17 образец	0,30	0,80	0,65	1,15	0,1
18 образец	0,30	0,70	0,65	1,15	0,1
19 образец	0,40	0,60	0,65	1,15	0,1
20 образец	0,30	0,60	0,65	1,15	0,1

Примечание: ПЭГ – полиэтиленгликоль.

В модельные смеси вводили 0,3 мл исследуемого спиртового экстракта корневищ куркумы длинной в пересчете на 1 суппозиторий. Поскольку речь идет

о создании принципиально новых лекарственных препаратов, то необходимо проводить и биофармацевтические исследования, поскольку не всегда при соответствии лекарственной формы всем фармацевтико–технологическим параметрам наблюдается максимальное высвобождение действующего вещества. В качестве среды растворения использовали буферный раствор с рН = 6,8. Время отбора проб – через каждые 15 минут. Так, за 45 минут из состава 6 степень высвобождения составила более 90% (рисунок 15).

Проведенные исследования позволили нам определить состав суппозитория: Экстракта корневищ куркумы длинной– 0,3 мл; ПЭГ 1500 – 0,3 г; ПЭГ 6000 – 0,7 г; эмульгатор Т-2 – 0,1 г; кремофор RH-40 – 1,25 г; колифор Р 188 – 0,75 г. Полученная лекарственная форма была стандартизирована по показателям, представленным в ОФС.1.4.1.0013.15 «Суппозитории» [13]. Для идентификации куркумина в лекарственной форме использовали ТСХ. Для этого около 3,0 измельченной суппозиторной массы растворяли в 5 мл спирта этилового 95%, взбалтывали в течение 10 минут и фильтровали, отбрасывая первые 2 мл экстракта. На линию старта хроматографической пластинки Сорбфил наносили 2 мкл полученного раствора и хроматографировали в условиях, описанных в п. Методика идентификации экстракта корневищ куркумы длинной спиртового в составе ректальных суппозиториях методом ТСХ. Для количественного определения куркумина в суппозиториях использовали метод УФ – спектрофотометрии по методике, описанной в п. Спектрофотометрическое определение ректальных суппозиториях, содержащих спиртовый экстракт корневищ куркумы длинной. Результаты представлены на рисунке 14.

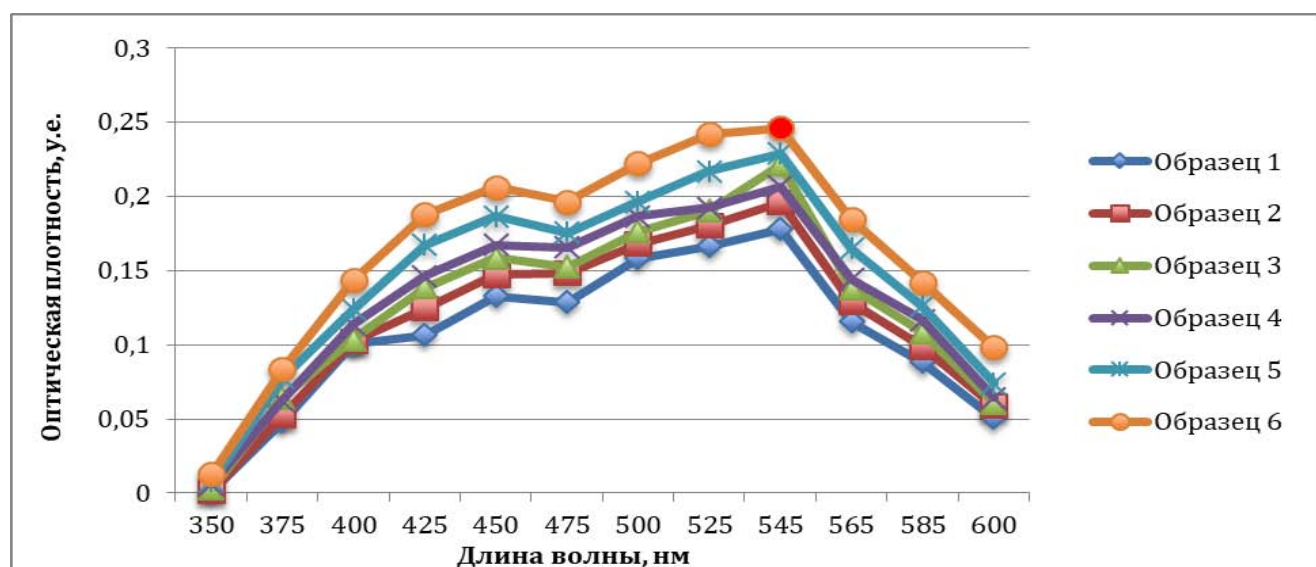


Рисунок 14 – Ультрафиолетовый спектр растворов экстракта корневищ куркумы длинной спиртового в составе ректальных суппозиториях.

Проведена валидация методики количественного определения, включающая в себя определение правильности аналитического метода, характеризующего близость результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению, приемлемости, прецизионности, включающей в себя показатели сходимости и воспроизводимости, а также линейности. Результаты представлены в таблицах (18 – 23).

Таблица 18 – Определение правильности методики количественного определения содержания куркумина в составе ректальных суппозиториях со спиртовым экстрактом корневищ куркумы длинной.

№ основы	Содержание куркумина, г	Валидационные характеристики
1 образец	0,0000732	$\bar{X}_{\text{ср}} = 0,000075$ $SD = 2,36 \cdot 10^{-5}$ $RSD = 9,66 \cdot 10^{-5}$ $\Delta x = 2,48 \cdot 10^{-5}$ $\varepsilon = 3,31\%$
2 образец	0,0000781	
3 образец	0,0000762	
4 образец	0,0000745	
5 образец	0,0000771	
6 образец	0,0000724	

Примечание: $\bar{X}_{\text{ср}}$ – средний результат, SD – стандартное отклонение, RSD – относительное стандартное отклонение, Δx – полуширина доверительного интервала величины, ε – относительная ошибка.

Таким образом, содержание куркумина в 1 суппозитории составляет $0,000075 \pm 0,000024$.

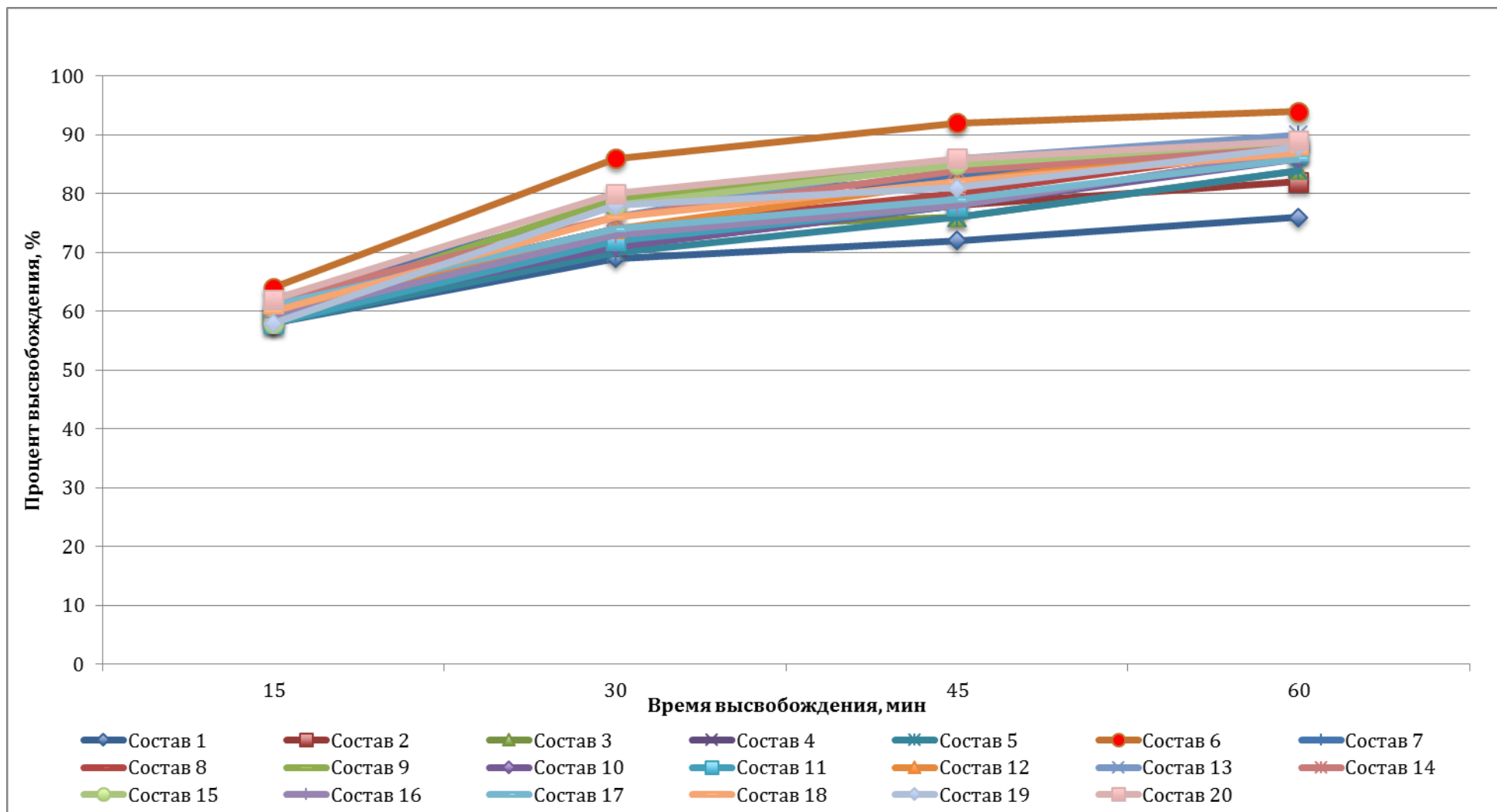


Рисунок 15 – Кинетика высвобождения куркумина из основ 1-20 в буферный раствор с pH 6,8

Для определения критерия приемлемости методики готовили ректальные суппозитории с различным содержанием экстракта корневищ куркумы длинной спиртового в процентах относительно первоначального значения (70, 100 и 130%). Результаты представлены в таблицах 19, 20 и 21, соответственно.

Таблица 19 – Определение критерия приемлемости методики для ректальных суппозиториев с 70% содержанием экстракта корневищ куркумы длинной спиртового от номинального содержания.

№ основы	Значение измеряемой величины модельной смеси, г	Значение, найденное экспериментально	
		Абсолютная величина, г	Процент восстановления, %
1 образец	0,0000525	0,0000515	97,29
2 образец	0,0000525	0,0000517	98,17
3 образец	0,0000525	0,0000509	98,55
4 образец	0,0000525	0,0000510	97,14
5 образец	0,0000525	0,0000517	97,20
6 образец	0,0000525	0,0000515	98,48
Средний процент восстановления, %			97,90

Таблица 20 – Определение критерия приемлемости методики для ректальных суппозиториев с 100% содержанием экстракта корневищ куркумы длинной спиртового от номинального содержания.

№ основы	Значение измеряемой величины модельной смеси, г	Значение, найденное экспериментально	
		Абсолютная величина, г	Процент восстановления, %
1 образец	0,000075	0,000073	97,33%
2 образец	0,000075	0,000078	104,00%
3 образец	0,000075	0,000076	101,33%
4 образец	0,000075	0,000074	98,67%
5 образец	0,000075	0,000077	102,67%
6 образец	0,000075	0,000072	96,00%
Средний процент восстановления, %			100,00

Таблица 21 – Определение критерия приемлемости методики для ректальных суппозиториях с 130% содержанием экстракта корневищ куркумы длинной спиртового от номинального содержания.

№ основы	Значение измеряемой величины модельной смеси, г	Значение, найденное экспериментально	
		Абсолютная величина, г	Процент восстановления, %
1	0,0000975	0,0000961	98,57
2	0,0000975	0,0000959	98,38
3	0,0000975	0,0000957	98,24
4	0,0000975	0,0000963	98,86
5	0,0000975	0,0000960	98,53
6	0,0000975	0,0000961	98,64
Средний процент восстановления, %			98,53

Полученный средний процент восстановления в трех проводимых концентрациях по средним результатам составил 98,81% для куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым, что укладывается в допустимые пределы приемлемости $100 \pm 5\%$.

Прецизионность методики количественного определения куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым была оценена в шести сериях. Результаты статистической обработки представлены в таблицах 22, 23.

Таблица 22 – Оценка сходимости методики количественного определения куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым в один день.

Истинное значение определяемой величины куркумина 0,000075 г					
Образец №	Результаты определения, г	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Критерий Стьюдента	
1 определение					
среднее	0,0000750	$2,36 \cdot 10^{-5}$	$9,66 \cdot 10^{-5}$	выч. 0,08	таб. 2,57
2 определение					
среднее	0,0000752	$2,13 \cdot 10^{-5}$	$8,72 \cdot 10^{-6}$	0,38	2,57

Таблица 23 – Оценка воспроизводимости методики количественного определения куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым в разные дни.

Истинное значение определяемой величины куркумина 0,000075 г					
	Результаты определения, г	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Критерий Стьюдента	
1 день					
среднее	0,0000750	$2,36 \cdot 10^{-5}$	$9,66 \cdot 10^{-5}$	выч. 0,08	таб. 2,57
2 день					
среднее	0,0000755	$1,87 \cdot 10^{-5}$	$7,63 \cdot 10^{-6}$	0,1	2,57

Для оценки линейности методики рассчитывали содержание куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым и строили график линейной зависимости содержания куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым от концентрации (рисунок 16).

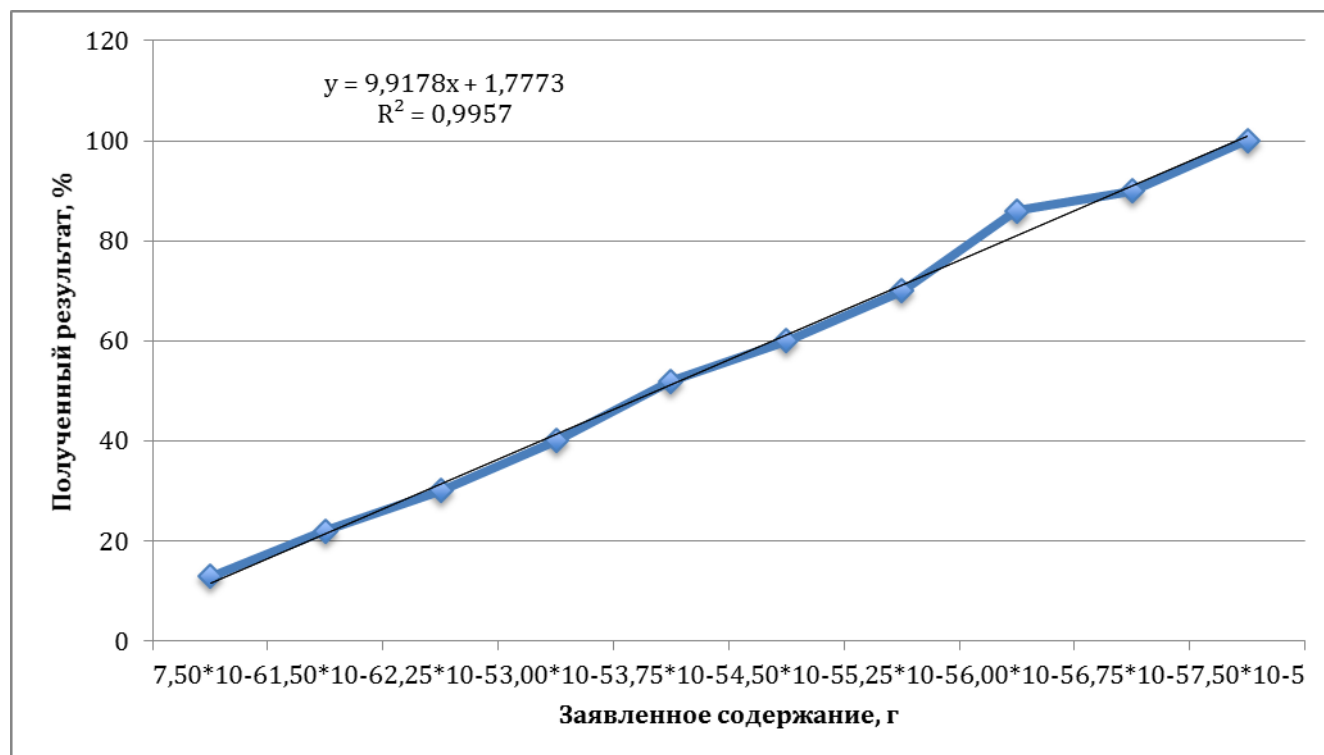


Рисунок 16 – Зависимость содержания куркумина в составе ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной спиртовым от концентрации.

Таким образом, предложенная спектрофотометрическая методика пригодна для количественного определения и оценки степени высвобождения куркумина из суппозиториев. Стандартизацию полученных ректальных суппозиториев проводили на образцах 8 серий при хранении в естественных условиях в течение 18 месяцев. Результаты представлены в таблице 24.

Список статей, опубликованных по материалам 3 главы:

1. Особенности свободнорадикального окисления в толстом кишечнике при язвенном колите и болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Давыдова, М.С. Бойко, А.Е. Бакеева, Н.В. Кайгородцева, И.Р. Галеева, А.А. Федосов, М.А. Ильиных, Л.В. Воргова // Вестник РГМУ. – 2020. – № 3. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027 (дата обращения: 09.05.2020).

Таблица 24 – Результаты стандартизации и определения стабильности суппозитория, содержащего экстракт корневищ куркумы длинной спиртовой, в процессе хранения при 5°C в герметичной упаковке

№ серии	Показатели качества						
	Описание	Однородность дозирования	Растворение	Распадаемость	Микробиологическая чистота	Подлинность	Количественное определение
Нормируемые требования							
Период хранения	Однородные суппозитории с желтоватым оттенком и характерным запахом	В соответствии с ОФС.1.4.2.0008.15 Однородность массы дозированных лекарственных форм (3,4±0,17)	В соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15 Растворение для твердых дозированных лекарственных форм (кислотная стадия (через 2 часа) – не более 10% вещества/ щелочная стадия (через 45 минут) – не менее 80% вещества)	В соответствии с ОФС.1.4.2.0012.15 Распадаемость суппозитория и вагинальных таблеток (не более 60 минут)	В соответствии с ОФС.1.4.2.0002.18 Микробиологическая чистота (Общее число аэробных микроорганизмов – не более 10 ³ КОЕ/г; общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 10 ² КОЕ/г)	Методом ТСХ В системе растворителей хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1), должны обнаруживаться 2 пятна с величиной Rf 0,64±0,0085 при 365 нм и Rf 0,88±0,0087 при 254 нм	УФ-спектрофотометрия Содержание куркумина в суппозитории, г должно быть 0,000075±0,0000248
1 мес	Соответств.	3,24±0,06	3,45±0,44/ 87,2±4,2	20,14±0,181	Соответств.	Соответств.	0,000074
2 мес	Соответств.	3,39±0,11	4,68±0,96/ 89,4±3,6	20,18±0,221	Соответств.	Соответств.	0,000072

Продолжение таблицы 24

3 мес	Соответств.	3,27±0,13	3,14±0,72/ 92,4±3,5	20,21±0,194	Соответств.	Соответств.	0,000073
6 мес	Соответств.	3,42±0,07	5,54±0,41/ 86,5±3,0	20,13±0,104	Соответств.	Соответств.	0,000077
9 мес	Соответств.	3,34±0,06	4,64±0,24/ 90,4±4,7	20,09±0,198	Соответств.	Соответств.	0,000076
12 мес	Соответств.	3,38±0,08	3,88±0,46/ 92,6±2,5	20,15±0,196	Соответств.	Соответств.	0,000073
15 мес	Соответств.	3,47±0,12	3,64±0,42/ 90,6±2,6	20,24±0,192	Соответств.	Соответств.	0,000074
18 мес	Соответств.	3,54±0,09	3,76±0,64/ 88,4±3,4	20,17±0,187	Соответств.	Соответств.	0,000075

Примечание: ОФС – общая фармакопейная статья, КОЕ – колониеобразующие единицы, ТСХ – тонкослойная хроматография, УФ – ультрафиолет, Rf – скорость перемещения.

ГЛАВА 4 - ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ГОМЕОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ЭКСТРАКТОМ КУРКУМЫ

4.1 - Клинико-морфологическая характеристика экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы

В условиях локального применения экстракта куркумы у животных с экспериментальным колитом зафиксированы изменения клинических параметров: увеличилось потребление корма, повысилась двигательная активность крыс в клетках, животные больше времени уделяли грумингу. С 3 суток наблюдения был отмечен более оформленный стул и отсутствие видимых признаков кишечного кровотечения в виде крови в каловых массах и окрашивания ануса. Указанные признаки нашли отражение в интегральном параметре оценки клинических признаков DAI, значения которого представлены в таблице 25. Как видно, на 3 сутки эксперимента параметр DAI статистически значимо не отличался от значений в контрольной группе, при тенденции к снижению, а на 5 и 7 сутки – достоверно снижался. Отметим, что, несмотря на снижение, значения DAI на 5 и 7 сутки достоверно отличались от значений в группе интактных животных, что позволяет говорить на данных сроках наблюдения только о частичном восстановлении DAI при экспериментальном колите на фоне применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы. При экспериментальном колите значения DAI на 5 сутки значимо не отличаются от значений на 3 сутки ($p>0,05$), а на 7 сутки – от значений на 3 и 5 сутки ($p>0,05$).

Далее нами проведена оценка морфологических изменений в стенке толстого кишечника при экспериментальном колите на фоне применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы. На 3 сутки наблюдения в

исследованных фрагментах толстой кишки наблюдались язвенные дефекты, дно которых располагалось в пределах собственной пластинки слизистой оболочки или в подслизистом слое (рисунок 17а). Во всех полях зрения наблюдались явления дисплазии в виде формирования псевдополипов - выступающих в просвет кишки фрагментов подслизистого слоя с нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией стромы, покрытых неизменной слизистой оболочкой (рисунок 17б). Стенки язвенных дефектов представлены отечной слизистой оболочкой. Кишечные крипты дисконфлексированы за счет нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации интерстициальных пространств между ними (рисунок 18а). Просветы крипт расширены, эпителий в состоянии тяжелой белковой дистрофии: цитоплазма клеток вакуолизирована, ядра просветленные, набухшие (рисунок 18б). На поверхности язвенных дефектов заметны признаки репарации: столбчатый каемчатый эпителий поверхности сохранившейся слизистой оболочки пролиферировал (рисунок 19а), приобретая кубическую и плоскую форму, и укрывал язвенный дефект (рисунок 19б).

На 5 сутки выявлялось умеренное количество юных веретеновидных фибробластов (рисунок 22а, 22б). Немногочисленные 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 (рисунок 20). В перифокальных зонах в подслизистом слое наблюдались умеренный отек межучной ткани и полнокровие сосудов всех калибров. Стенки язвенных дефектов были представлены дистрофически измененной слизистой оболочкой с укороченными криптами. Просветы крипт расширены, эпителий вакуолизирован, частично слущен в просветы крипт (рисунок 21). 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 (рисунок 22б).

На 7 сутки отмечались однотипные изменения во всех исследованных препаратах. В представленных фрагментах толстой кишки наблюдаются процессы полной эпителизации язвенных дефектов (рисунок 23, 24б). В этих областях отмечалось небольшое снижение высоты слизистой оболочки с нарушением рисунка строения: крипты укорочены, просветы их расширены. Резкая дисконфлексация крипт за счет густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации интерстициальных пространств (рисунок 24а, 25а). Сохранялась белковая дистрофия эпителия крипт с частичной десквамацией клеток в просветы (рисунок 25б).

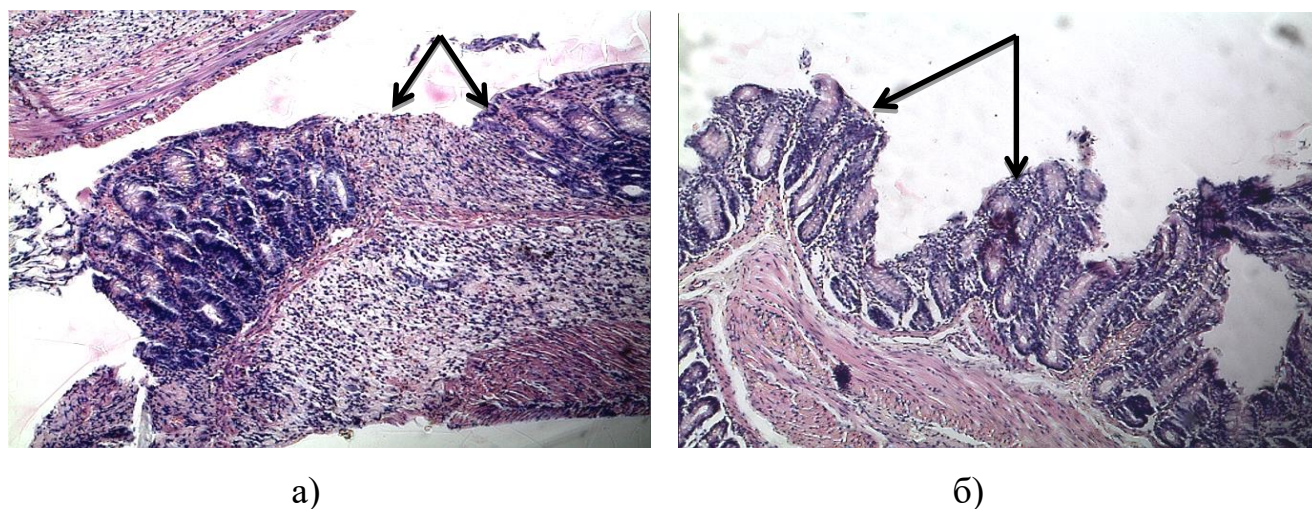
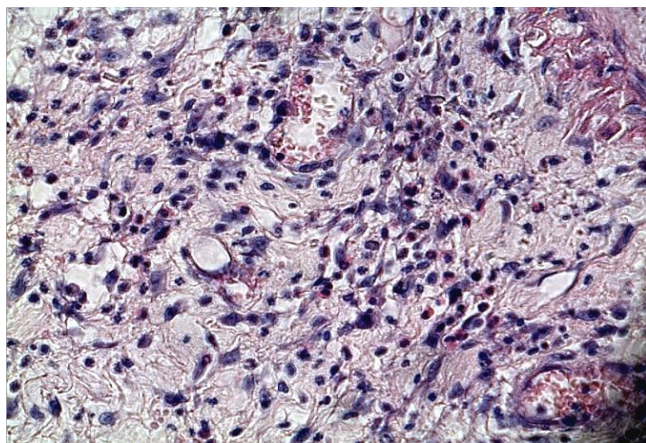
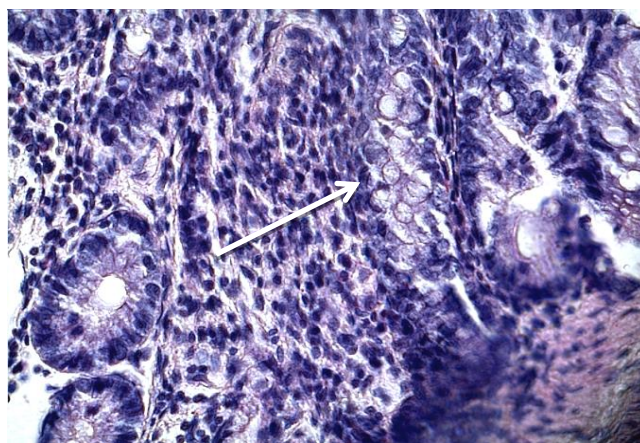


Рисунок 17 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) без лечения – язвенный дефект (стрелки) в пределах подслизистого слоя толстой кишки (окраска гематоксилин эозином, ув. x100); б) в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы – дисплазия слизистой оболочки с формированием псевдополипов (стрелки) (окраска гематоксилин эозином, ув. x100).

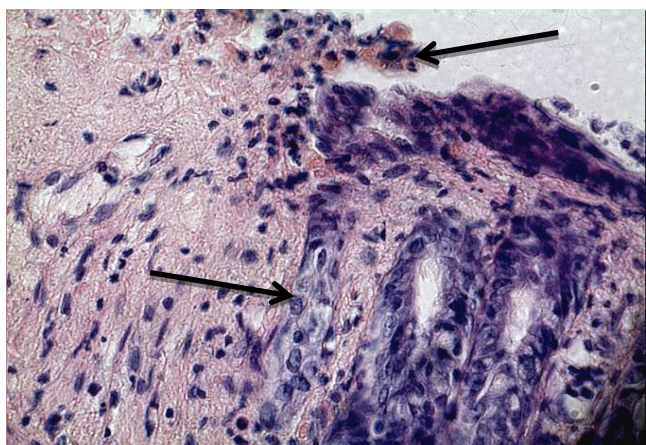


а)

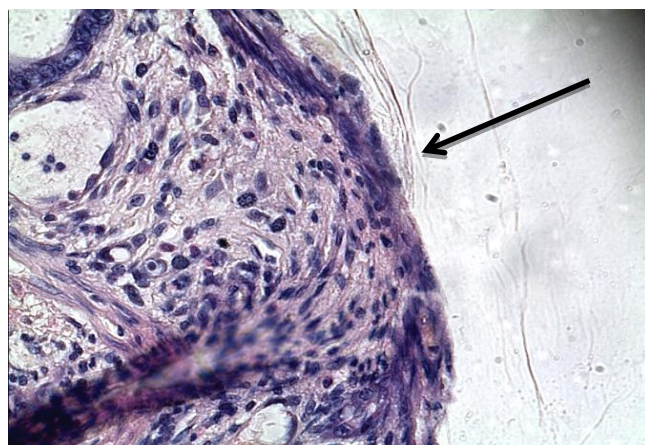


б)

Рисунок 18 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) без лечения – венозное и капиллярное полнокровие подслизистого слоя, нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация с примесью эозинофилов (окр. гематоксилин эозином, ув. х400); б) при применении экстракта куркумы – дисконплексація и укорочение крипт; эпителий некоторых крипт (стрелка) в состоянии тяжелой белковой дистрофии (окр. гематоксилин эозином, ув. х400).

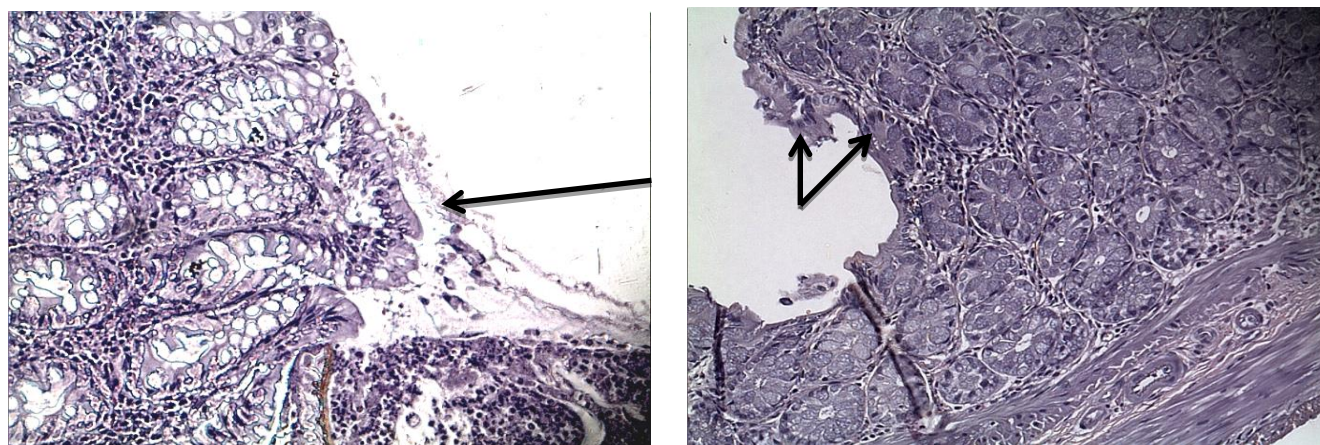


а)



б)

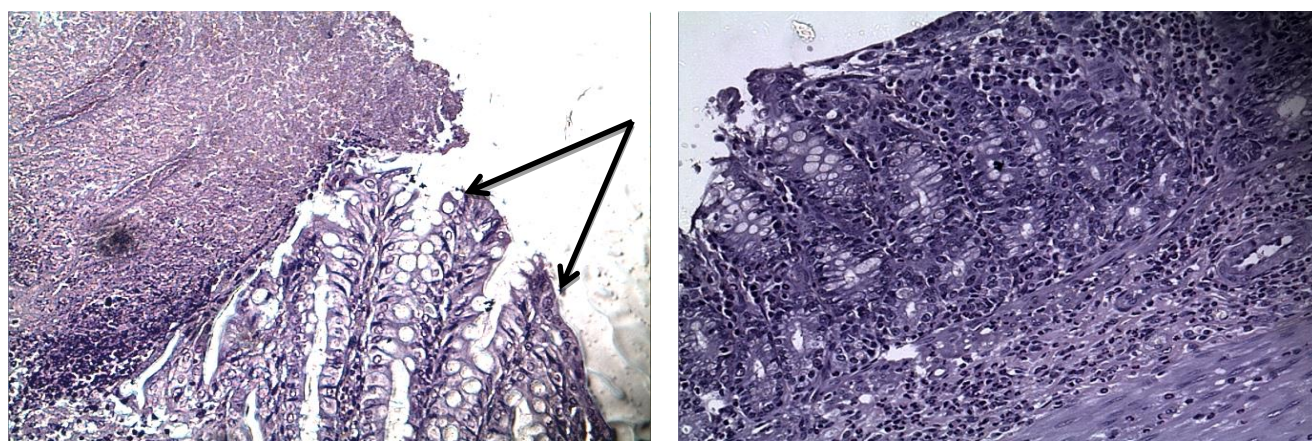
Рисунок 19 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) без лечения – начальные процессы пролиферации столбчатого каемчатого эпителия (стрелки) в стенке язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. х400); б) при применении экстракта куркумы – эпителизированная поверхность (стрелка) язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. х400).



а)

б)

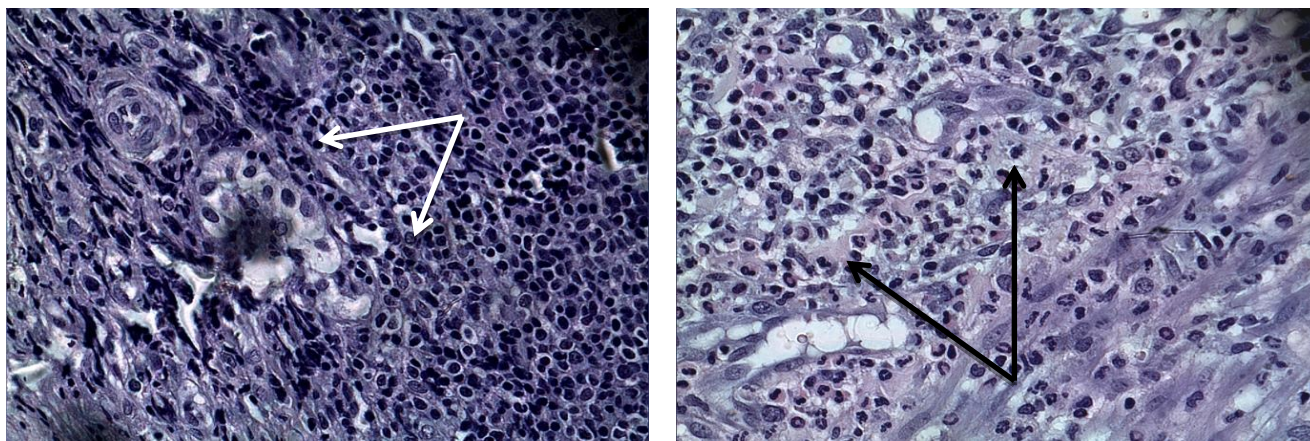
Рисунок 20 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 5 сутки экспериментального колита: а) без лечения – начальные явления пролиферации однорядного эпителия (стрелка) поверхности слизистой оболочки с язвенным дефектом (окр. гематоксилин-эозин, ув. x200); б) при применении экстракта куркумы – пролиферация столбчатого каемчатого эпителия (стрелки) на поверхности язвенного дефекта (окр. гематоксилин-эозин, ув. x200).



а)

б)

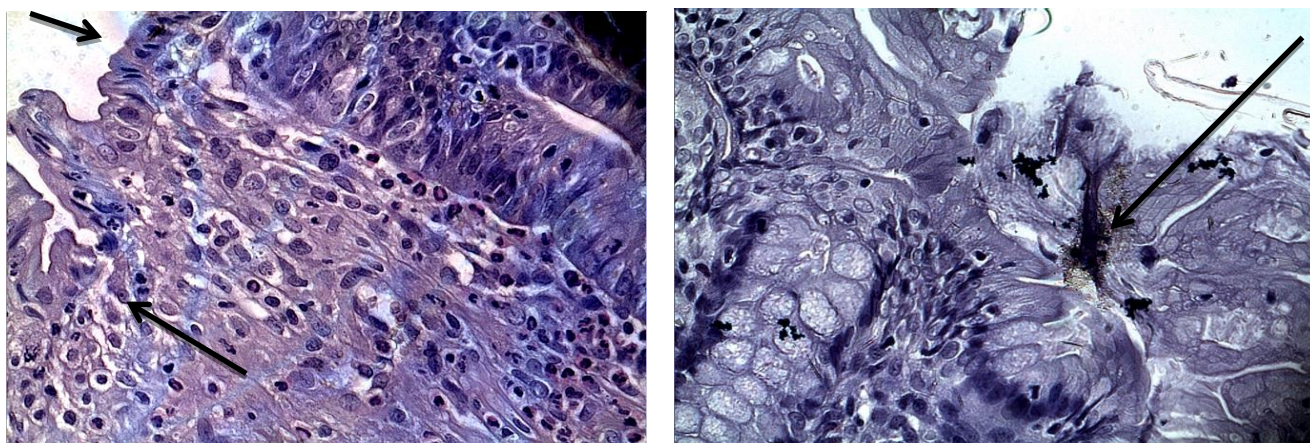
Рисунок 21 – Морфология очага повреждения толстого кишечника на 5 сутки экспериментального колита: а) без лечения – тяжелая белковая дистрофия эпителия крипт (стрелки) слизистой оболочки в стенке язвенного дефекта (окр. гематоксилин эозином, ув. x200); б) при применении экстракта куркумы – стенка дефекта: нарушение архитектоники, укорочение крипт, нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация интерстиция (окр. гематоксилин эозином, ув. x200).



а)

б)

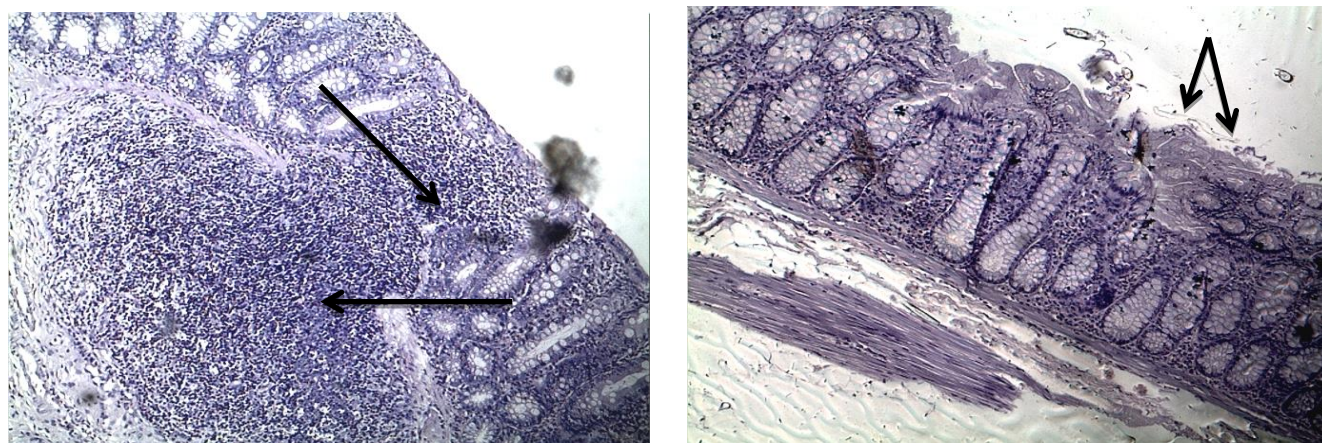
Рисунок 22 – Морфология очага повреждения на 5 сутки экспериментального колита: а) без лечения – пролиферация камбиального эпителия (стрелки) в глубине язвенного дефекта, пролиферация веретеновидных фибробластов (стрелки) (окр. гематоксилин эозином, ув. х400); б) при применении экстракта куркумы – нейтрофильно-лимфоцитарный инфильтрат в подслизистом слое; очаги инфильтрации резидентными макрофагами (стрелка) и пролиферация фибробластов (пунктирные стрелки) (окр. гематоксилин эозином, ув. х400).



а)

б)

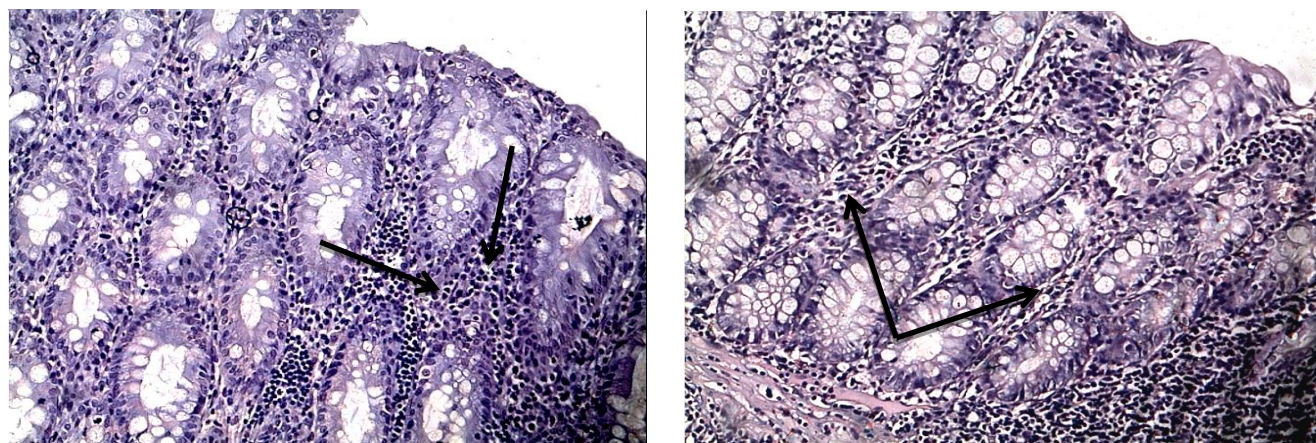
Рисунок 23 – Морфология очага повреждения толстого кишечника на 7 сутки экспериментального колита: а) без лечения – эпителизация (стрелки) поверхности язвенного дефекта (окр. гематоксилин эозином, ув. х400); б) при применении экстракта куркумы – пролиферация столбчатого эпителия (стрелка) на поверхности язвенного дефекта (окр. гематоксилин эозином, ув. х400).



а)

б)

Рисунок 24 – Морфология очага повреждения на 7 сутки экспериментального колита: а) без лечения – язвенный дефект, распространяющийся глубоко в подслизистый слой (стрелки) с грануляционной тканью и обширными участками нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации (стрелки) (окр. гематоксилин эозином, ув. x100); б) при применении экстракта куркумы – эпителизированный язвенный дефект (стрелки) (окр. гематоксилин эозином, ув. x100).



а)

б)

Рисунок 25 – Морфология очага повреждения на 7 сутки экспериментального колита: а) без лечения - нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация соединительно-тканых прослоек (стрелки) между укороченными криптами слизистой оболочки рядом с язвенными дефектами (окр. гематоксилин эозином, ув. x200); б) при применении экстракта куркумы - белковая дистрофия эпителия кишечных крипт, очаговая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация интерстиция (стрелки) между криптами (окр. гематоксилин эозином, ув. x200).

Результаты морфометрических исследований в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите на фоне применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы представлены в таблице 26. Инфильтрация очага повреждения толстого кишечника клеточными элементами изменялась неоднозначно. Содержание лимфоцитов значимо уменьшалось на 5 сутки. Количество нейтрофилов было ниже, чем в группе без лечения на 3, 5 и 7 сутки, а количество эозинофилов значимо уменьшалось только на 3 сутки, на 5 и 7 сутки – на правах тенденции. Установлено, что содержание гистиоцитов увеличивалось на 3 сутки, уменьшалось – на 7 сутки эксперимента, плазмоцитов – увеличивалось на 3 сутки, уменьшалось – на 5 и 7 сутки эксперимента, фибробластов – увеличивалось на 3 сутки. На этом фоне размер язвенного дефекта сокращался на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Указанные изменения морфометрических параметров нашли отражение в индексе TDI – он снижался на 5 и 7 сутки наблюдения.

При экспериментальном колите количество нейтрофилов в очаге повреждения на 5 сутки снижалось по сравнению с 3 сутками, а на 7 сутки – увеличивалось по сравнению с 5 сутками; размер язвенного дефекта на 7 сутки эксперимента значимо уменьшался по сравнению с 3 сутками наблюдения. Отметим, что все исследуемые морфометрические параметры не достигали значений в группе интактных животных во все сроки наблюдения, то есть восстанавливались частично.

Таблица 25 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на активность патологического процесса, оцениваемого с использованием индекса при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Группы животных	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Индекс активности болезни (DAI, у.е.)	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 ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таким образом, улучшение клинической картины (снижение выраженности симптомов, уменьшение индекса DAI) при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы соответствует изменениям морфологии в очаге повреждения: уменьшается инфильтрация нейтрофилами на 3, 5 и 7 сутки, эозинофилами на 3 сутки, лимфоцитами на 5 сутки, гистиоцитами - на 7 сутки, плазмоцитами – на 5 и 7 сутки, увеличивается представительство плазмоцитов, гистиоцитов и фибробластов на 3 сутки, снижается размер язвенного дефекта на 3, 5 и 7 сутки, уменьшается индекс TDI на 5 и 7 сутки наблюдения. Полагаем, что увеличение количества в очаге повреждения на 3 сутки плазмоцитов, 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.

Таблица 26 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на морфометрические параметры в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Лейкоциты, 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) *
Нейтрофилы, ед./мм ²	196,93 (189,70; 214,76)	2888,087 (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) *#
Эозинофилы, 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) *
Гистиоциты, 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) *#
Плазма- тические клетки, 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) * #
Фибробласты, 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) *#

Примечание. * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, TDI – tissue damage index.

4.2 - Изменения параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы

Оценка количества в крови популяций лейкоцитов при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы представлена в таблице 27. На 3 сутки наблюдения значительно снижается общее количество лейкоцитов за счет сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов, на 5 сутки снижение общего количества лейкоцитов обусловлено уменьшением числа сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, на 7 сутки эксперимента общее количество лейкоцитов снижается за счет лимфоцитов. Отметим, что во все сроки наблюдения общее количество лейкоцитов не отличалось от значений в группе интактных животных, а на 5 сутки не зафиксировано значимых отличий с 3 сутками, а на 7 сутки – с 3 и 5 сутками эксперимента.

Итак, применение ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы при экспериментальном колите приводит к уменьшению до уровня интактных животных общего количества лейкоцитов на 3, 5 и 7 сутки, количества лимфоцитов – на 5 и 7 сутки, моноцитов – на 3 сутки, количество нейтрофилов за счет сегментоядерных форм снижалось на 3 сутки до уровня интактных животных, а на 5 сутки достоверно отличалось от значений в группе интактных животных. Полученные результаты позволяют говорить о восстановлении представительства лейкоцитов в крови преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов. По всей видимости, снижение представительства лейкоцитов в крови обусловлено протекторными эффектами экстракта куркумы в очаге повреждения толстого кишечника, возможно, в связи с ограничением площади и интенсивности вторичной альтерации, что приводит к меньшему образованию медиаторов воспаления (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF, G-CSF и др.), выделению их в кровь и воздействию на сосудистый и

костно-мозговой пулы лейкоцитов, а также на пролиферацию и дифференцировку клеток миелоидного и лимфоидного рядов в костном мозге.

Далее исследовано влияние применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы при экспериментальном колите на функциональную активность нейтрофилов крови (таблица 28). При оценке поглотительной способности нейтрофилов выявлено, что на 3 сутки наблюдения снижается активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, на 5 сутки – снижается только фагоцитарное число, на 7 сутки – снижается интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число. При этом, во все сроки наблюдения параметры активности фагоцитоза, интенсивности фагоцитоза, фагоцитарного числа были выше, чем в группе интактных животных, то есть восстанавливались частично.

При оценке НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови обнаружено, что на 3 сутки эксперимента параметры спонтанного НСТ-теста достоверно не изменяются, значимо снижаются активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, функциональный резерв нейтрофилов, оцениваемый по активности и интенсивности НСТ-теста, на 5 сутки эксперимента снижается активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста, активность индуцированного НСТ-теста и функциональный резерв нейтрофилов, оцениваемый по активности НСТ-теста, на 7 сутки зафиксировано статистически значимое снижение только активности спонтанного НСТ-теста и повышение функционального резерва нейтрофилов, оцениваемого по интенсивности НСТ-теста. Отметим, что все параметры во все сроки наблюдения, кроме активности спонтанного НСТ-теста на 7 сутки не достигали значений в группе интактных животных. Итак, результаты оценки функциональной активности нейтрофилов крови при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы позволяют говорить о снижении и частичном восстановлении поглотительной активности нейтрофилов на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, снижении и частичном восстановлении НСТ-редуцирующей

активности нейтрофилов в спонтанном режиме на 5 и 7 сутки, в индуцированном режиме – на 3 и 5 сутки наблюдения.

Полагаем, что изменение функциональной активности нейтрофилов крови в условиях локального применения экстракта куркумы при экспериментальном колите, как и снижение количества лейкоцитов в крови, обусловлено ограничением деструктивных процессов в очаге повреждения толстого кишечника, уменьшением синтеза провоспалительных медиаторов, ограничению активации фагоцитов как в зоне повреждения, так и циркулирующих в крови нейтрофилов.

Данное предположение, в определенной мере, подтверждается результатами исследования концентрации IL-23 в сыворотке, о провоспалительных и иммунорегуляторных эффектах которого, а также об участии в патогенезе ВЗК было отмечено в разделе 3.2 главы 3. Как видно из таблицы 29, уровень IL-23 в сыворотке снижается на 3, 5 и 7 сутки эксперимента. Причем, концентрация IL-23 в сыворотке на 3 сутки значительно отличается, а на 5 и 7 сутки не имеет отличий с группой интактных животных, что позволяет констатировать на 3 сутки частичное, а на 5 и 7 сутки выраженное восстановление его концентрации в сыворотке.

Особый интерес представляют данные относительно содержания TNF- α (рисунок 26) и МПО (рисунок 27) в клеточных популяциях ткани толстого кишечника при экспериментальном колите на фоне локального применения экстракта куркумы (таблица 30). На 3 сутки содержание TNF- α и МПО значительно не отличается от соответствующих параметров в контрольной группе животных с экспериментальным колитом без лечения и сохраняется повышенной по сравнению с группой интактных животных. На 5 и 7 сутки наблюдения содержание TNF- α и МПО снижается, но сохраняется повышенной по сравнению с группой интактных животных. Таким образом, можно говорить о частичном восстановлении уровня TNF- α и МПО в клеточных популяциях ткани толстого

кишечника на 5 и 7 сутки при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы.

Итак, оценка параметров врожденного иммунитета, включая цитокиновый профиль в крови и в очаге повреждения позволила выявить, что при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы наблюдается полное или частичное восстановление параметров на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, в частности, снижается количество лейкоцитов в крови преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, снижается поглотительная и НСТ-редуцирующая способности нейтрофилов крови, снижается концентрация IL-23 в сыворотке и содержание TNF- α и МПО в клеточных популяциях ткани толстого кишечника.

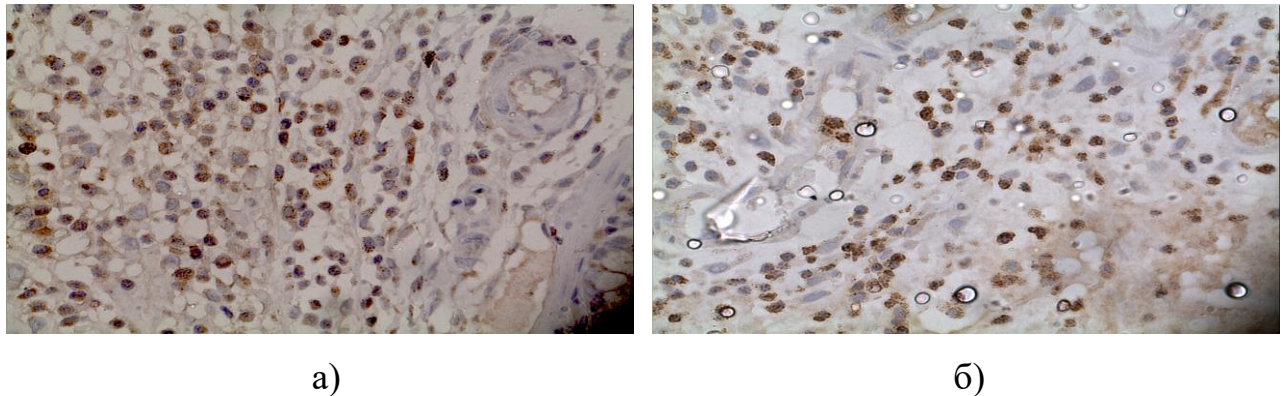


Рисунок 26 – Иммуногистохимическое выявление МПО: а) на 5 сутки экспериментального колита (окраска ДАБ-гематоксилин, ув. X400): б) на 5 сутки экспериментального колита при применении экстракта куркумы

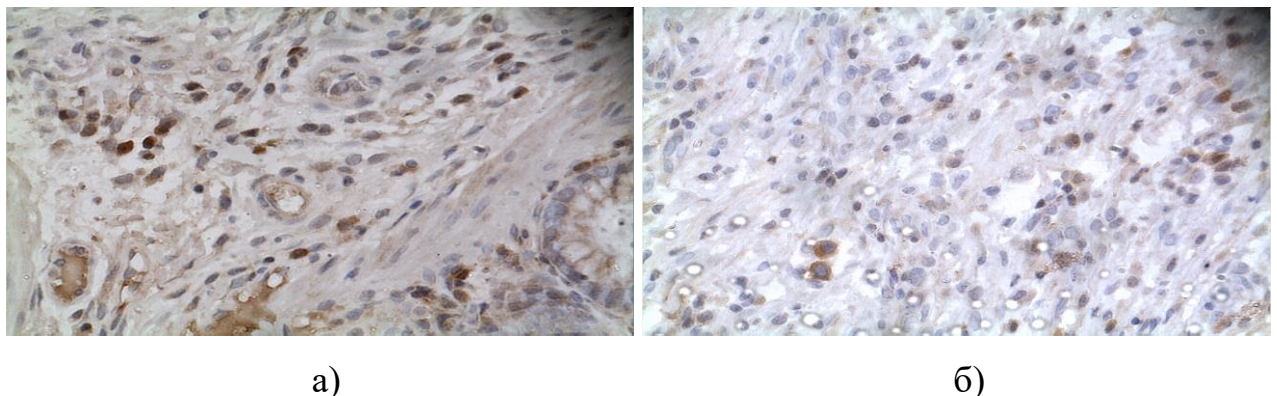


Рисунок 27 – Иммуногистохимическое выявление TNF- α : а) на 5 сутки экспериментального колита (окраска ДАБ-гематоксилин, ув. X400): б) на 5 сутки экспериментального колита при применении экстракта куркумы

Таблица 27 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на количественный состав лейкоцитов в крови при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры, 10 ⁹ /л	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Лейкоциты	6,00 (4,00; 6,00)	7,15 (6,20; 7,70) *	8,77 (6,50; 9,90) *	8,00 (6,00; 8,00) *	5,55 (5,20; 5,70) #	5,99 (5,40; 6,60) #	5,40 (4,70; 5,80) #
Палочкоядерные нейтрофилы	0,03 (0,00; 0,05)	0	0,09 (0,03; 0,13)	0,03 (0,00; 0,05)	0 (0; 0,06)	0	0
Сегментоядерные нейтрофилы	1,35 (0,96; 1,47)	1,48 (1,48; 1,67)	3,13 (1,88; 3,65) *	1,35 (0,96; 1,47)	1,20 (1,07; 1,70) #	1,93 (1,60; 2,30) * #	1,60 (0,89; 1,73)
Нейтрофилы	1,35 (0,99; 1,53)	1,48 (1,48; 1,67)	3,20 (1,96; 3,74) *	1,35 (0,99; 1,53)	1,20 (1,07; 1,70) #	1,93 (1,60; 2,30) * #	1,60 (0,89; 1,73)
Эозинофилы	0 (0; 0,04)	0,05 (0; 0,05) *	0	0 (0; 0,04)	0,05 (0; 0,06)	0	0,07 (0,05; 0,08) *
Базофилы	0	0	0	0	0	0	0
Лимфоциты	3,88 (3,04; 4,25)	4,93 (3,24; 5,98) *	4,89 (1,97; 6,01) *	5,88 (5,04; 6,25) *	3,93 (3,25; 4,99) *	3,40 (1,90; 4,99) #	3,42 (3,05; 3,84) #
Моноциты	0,24 (0,21; 0,27)	0,64 (0,51; 1,14) *	0,58 (0,29- 0,77) *	0,24 (0,21; 0,27)	0,23 (0,22; 0,37) #	0,55 (0,41; 0,84) *	0,34 (0,22; 0,37)

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таблица 28 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на параметры функциональной активности нейтрофилов крови при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Активность фагоцитоза, %	36,0 (32,0; 40,0)	52,0 (44,0; 54,0) *	58,5 (45,0; 64,0) *	43,0 (38,0; 67,0) *	44,0 (33,0; 53,0) * #	58,0 (45,0; 64,0) *	44,5 (38,0; 65,0) *
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	0,68 (0,6; 0,8)	3,85 (3,63; 3,85) *	6,99 (6,37; 12,16) *	5,78 (3,65; 10,80) *	2,83 (1,92; 3,16) * #	6,50 (6,37; 12,16) *	4,89 (3,64; 5,97) * #
Фагоцитарное число, у.е.	1,88 (1,90; 2,00)	7,10 (7,10; 7,50) *	14,15 (14,15; 19,0) *	13,40 (9,60; 16,10) *	5,90 (5,80; 6,10) * #	4,20 (14,2; 19,0) * #	9,20 (9,2; 11,0) * #
НСТ-тест спонт., акт-ть, %	4,0 (4,0; 5,0)	10,0 (10,0; 10,0) *	15,0 (15,0; 16,0) *	8,5 (2,0; 12,0)	8,5 (8,0; 12,0) *	9,0 (4,0; 10,0) * #	5,5 (5,0; 9,0) #
НСТ-тест спонт., инт-ть, у.е.	0,06 (0,05; 0,07)	0,17 (0,15; 0,17) *	0,19 (0,19; 0,20) *	0,09 (0,02; 0,12)	0,13 (0,13; 0,17) *	0,10 (0,06; 0,14) * #	0,05 (0,05; 0,09)
НСТ-тест инд., акт-ть, %	5,0 (4,0; 6,0)	21,5 (8,0; 22,0) *	8,5 (8,0; 12,0)	10,0 (7,0; 16,0) *	7,0 (7,0; 9,0) * #	6,5 (3,0; 13,0) * #	9,0 (7,0; 10,0) *
НСТ-тест инд., инт-ть, у.е.	0,06 (0,06; 0,06)	0,26 (0,10; 0,26) *	0,07 (0,05; 0,19)	0,11 (0,07; 0,16) *	0,11 (0,11; 0,11) * #	0,07 (0,05; 0,19)	0,09 (0,08; 0,11) *
Функциональный резерв (акт-ть НСТ-теста)	1,25 (0,80; 1,50)	1,97 (1,33; 2,20) *	1,60 (1,18; 2,00) *	1,47 (0,58; 5,50)	0,81 (0,56; 0,88) * #	0,76 (0,2; 0,86) * #	1,58 (0,88; 2,00) *
Функциональный резерв (инт-ть НСТ-теста)	1,00 (0,85; 1,00)	1,52 (1,52; 1,6) *	1,60 (1,15; 2,00) *	1,39 (0,58; 1,50)	0,85 (0,65; 0,85) * #	0,78 (0,26; 1,00) #	1,68 (0,88; 2,20) * #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таблица 29 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на концентрацию IL-23 в сыворотке (пг/мл) при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметр	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
IL-23, пг/мл	32,16 (28,95; 43,42)	75,52 (65,94; 85,24) *	71,57 (59,51; 73,18) *	86,04 (78,81; 91,67) *	40,21 (11,26; 45,84) * #	32,16 (22,52; 48,25) #	35,62 (25,66; 44,81) #

Примечание. * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ - куркума

Таблица 30 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на содержание миелопероксидазы и TNF- α в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Миелопероксидаза, 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 ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таким образом, механизм иммунотропных эффектов экстракта куркумы на данном этапе исследования полностью не ясен, поскольку о прямом действии куркумина на иммунные клетки вряд ли можно говорить, данных о наличии рецепторов на иммунокомпетентных клетках для куркумина в доступной литературе отсутствует. Однако, снижение выраженности лейкоцитарной инфильтрации очага повреждения толстого кишечника, снижение активности фагоцитирующих клеток и продукции провоспалительных факторов и медиаторов ограничивают зону вторичной альтерации и, вероятно, являются факторами снижения активности иммунных реакций с участием субпопуляций лимфоцитов и поддержания воспалительного процесса в толстом кишечнике. Как было отмечено в главе 1, при БК имеют место как Th1- (преимущественно), так и Th2-зависимые иммунные реакции и наряду с нейтрофилами и макрофагами, продуцируемыми ими АФК, ферментами, в повреждении стенки кишечника участвуют CD8⁺ лимфоциты, иммуноглобулины и др. факторы. Одним из ключевых механизмов действия экстракта куркумы в условиях локального применения при ВЗК может быть его антиоксидантный эффект, широко описываемый в литературе и продемонстрированный при различной патологии в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, а также в клинических условиях.

4.3 - Изменения параметров адаптивного иммунитета в крови при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы

Результаты исследования количественного состава субпопуляционного спектра лимфоцитов крови при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы представлены в таблице 31. На 3, 5 и 7 сутки эксперимента в крови снижается количество CD3⁺ лимфоцитов (суммарное количество Т-лимфоцитов), представительство CD45RA⁺ лимфоцитов, то есть преимущественно В-лимфоцитов, статистически значимо не

изменяется. Не обнаружено достоверных изменений количества CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов на 5 сутки по сравнению с 3 сутками и на 7 сутки по сравнению с 3 и 5 сутками. Отметим, что количество в крови CD3⁺ лимфоцитов в группе крыс с экспериментальным колитом в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы не отличалось от значений в группе интактных животных, что позволяет говорить о полном восстановлении уровня CD3⁺ лимфоцитов в крови. Впрочем, представительство CD45RA⁺ лимфоцитов также не имело значимых отличий с группой интактных животных.

При исследовании гибели лимфоцитов крови путем некроза и апоптоза обнаружено, что применение при экспериментальном колите суппозиториев с экстрактом куркумы на 3 сутки снижается представительство в крови интактных лимфоцитов, увеличивается количество лимфоцитов с признаками раннего апоптоза, а также признаками позднего апоптоза и частично некротических клеток (таблица 32). На 5 и 7 сутки эксперимента зафиксированы аналогичные изменения: с одной стороны, снижается количество в крови интактных лимфоцитов, с другой – увеличивается с признаками раннего апоптоза и позднего апоптоза и частично некротических клеток. Кроме этого, во все сроки наблюдения исследуемые параметры в крови значимо отличаются от группы интактных животных.

Полагаем, что данные изменения количества в крови лимфоцитов с признаками некроза и апоптоза обусловлены событиями в очаге повреждения: с одной стороны, наблюдается опосредованный эффект куркумина в составе экстракта куркумы за счет ограничения области повреждения в толстом кишечнике, синтеза и секреции цитокинов, в частности уменьшения синтеза IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α и мн. др., участвующих в пролиферации и дифференцировке субпопуляций лимфоцитов, что приводит к уменьшению количества лимфоцитов в крови. С другой стороны, позитивные события в очаге повреждения толстого кишечника и отсутствие сигналов для формирования пула аутоагрессивных лимфоцитов, а также их мишеней в стенке толстого кишечника

может запускать процесс естественной элиминации, негативной селекции этой группы лимфоцитов путем некроза и апоптоза с увеличением в кровотоке количества лимфоцитов с признаками раннего апоптоза и позднего апоптоза и частично некротических клеток и снижением количества интактных лимфоцитов. Известно, что один из механизмов действия ингибиторов TNF- α , применяемых у больных с экспериментальным колитом, таких как инфликсимаб и адалимумаб, связан с индукцией гибели лимфоцитов в крови, что приводит к снижению их поступления в стенку кишечника и ограничению выраженности деструктивных процессов [205]. Далее нами проведена оценка концентрации IgM и IgG в сыворотке при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы (таблица 33). Обнаружено, что концентрация IgM в сыворотке снижается на 3, 5 и 7 сутки наблюдения. При этом, концентрация IgM на 5 сутки меньше, чем на 3 сутки ($p < 0,05$), а на 7 сутки выше, чем на 5 сутки ($p < 0,05$). Концентрация IgG в сыворотке статистически значимо снижается на 3, 5 и 7 сутки эксперимента, на 5 сутки данный параметр выше, чем на 3 сутки эксперимента ($p < 0,05$), а на 7 сутки ниже, чем на 5 сутки ($p < 0,05$). Отметим, что концентрация IgM в сыворотке во все сроки наблюдения достоверно не отличается от значений в группе интактных животных ($p > 0,05$), а концентрация IgG на 3, 5 и 7 сутки наблюдения значимо выше, чем в группе интактных животных ($p < 0,05$).

Таблица 31 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий на субпопуляционный состав лимфоцитов крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
CD3 ⁺ лимфоциты, • 10 ⁹ /л	3,38 (2,45; 4,84)	4,25 (3,64; 4,83)	4,97 (3,76; 8,15) *	4,62 (3,57; 5,67) *	3,29 (2,61; 4,31) #	3,63 (2,54; 4,71) #	3,65 (3,28; 4,21) #
CD45RA ⁺ лимфоциты, • 10 ⁹ /л	1,56 (1,49; 1,88)	1,14 (0,88; 1,74)	1,14 (1,18; 2,26)	2,18 (1,16; 3,52) *	1,39 (0,24; 2,31)	1,72 (1,57; 2,31)	1,89 (1,15; 2,82)

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таблица 32 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на параметры гибели лимфоцитов крови при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры, % клеток	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Annexin-5- FITC-/7- AAD-	92,57 (91,29; 93,87)	89,18 (86,17; 89,97) *	86,35 (82,23; 88,76) *	83,94 (81,67; 86,27) *	78,79 (76,34; 79,36) * #	74,52 (74,33; 74,93) * #	70,07 (67,85; 72,47) * #
Annexin-5- FITC+/7- AAD-	5,91 (4,94; 7,22)	10,28 (9,01; 11,12) *	11,05 (10,84; 16,63) *	14,69 (13,26; 17,21) *	18,91 (17,33; 19,97) * #	23,74 (23,12; 25,21) * #	27,75 (22,01; 30,01) * #
Annexin-5- FITC+/7- AAD+	0,48 (0,21; 0,94)	0,35 (0,05; 0,41)	1,01 (0,42; 1,59) *	0,62 (0,38; 1,01) *	1,71 (0,98; 2,34) * #	0,98 (0,32; 1,23) * #	1,75 (0,69; 2,71) * #

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таблица 33 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на концентрацию иммуноглобулинов в крови при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
IgG, нг/мл	3,05 (3,02; 3,22)	17,11 (17,11; 21,17) *	26,93 (23,66; 28,07) *	11,22 (5,15; 18,46) *	7,27 (2,84; 7,88) * #	9,96 (6,94; 21,27) * #	5,26 (3,37; 8,41) * #
IgM, нг/мл	10,89 (8,85; 11,69)	17,64 (12,71; 28,22) *	20,81 (20,11; 22,93) *	17,99 (13,96; 21,87) *	10,69 (9,11; 11,95) #	8,99 (8,01; 9,71) #	10,89 (10,43; 11,29) #

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума.

Таким образом, несмотря на то, что при экспериментальном колите в условиях локального применения экстракта куркумы количество $CD45RA^+$ лимфоцитов, то есть преимущественно В-лимфоцитов, предшественников плазматических клеток – продуцентов иммуноглобулинов значимо не изменяется, концентрация в сыворотке IgM и IgG снижается, причем, первых полностью, а вторых – частично восстанавливается. Данный факт может быть связан с восстановлением функциональной активности В-клеток и плазмоцитов в условиях снижения продукции цитокинов-активаторов Th2-зависимого иммунного ответа. Таким образом, применение при экспериментальном колите ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы приводит в течение 7-дневного наблюдения к снижению в крови количества лейкоцитов преимущественно за счет сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, в том числе $CD3^+$, увеличению количества в крови лимфоцитов с признаками раннего апоптоза, с признаками позднего апоптоза и частично некротических клеток, снижению поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижению концентрации IL-23, IgM и IgG в сыворотке и содержание TNF- α и МПО в очаге повреждения толстого кишечника. Полагаем, принимая во внимание данные литературы, что эффекты экстракта куркумы в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите во многом обусловлены влиянием на процессы свободно-радикального окисления, в частности, прямым действием куркумина как антиоксиданта и опосредованным в связи с ограничением активности клеток-продуцентов АФК в условиях снижения площади вторичной альтерации.

4.4 - Изменения параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы

Накоплено большое количество экспериментальных и клинических данных о роли оксидативного стресса в патогенезе ВЗК за счет повреждения стенки кишечника, вмешательства в процессы внутриклеточной регуляции иммунокомпетентных клеток и др. механизмов в условиях избыточной генерации активных форм кислорода и азота и/или недостаточной активности компонентов антиокислительной защиты [288]. Эндогенными источниками оксидантов являются реакции в клетках слизистой оболочки кишечника: энтероцитах, нейтрофилах, моноцитах/макрофагах, эндотелиоцитах при участии НАДФН-оксидазы, ксантинооксидазы, липоксигеназ, миелопероксидазы, синтазы оксида азота (II) и др. ферментов [223]. Факторами антиокислительной защиты в ЖКТ выступают внутриклеточные ферменты (СОД-1, СОД-2, СОД-3, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза); внутриклеточные неэнзимные антиоксиданты (глутатион, мелатонин и др.); экзогенные антиоксиданты (витамины А, С, Е, флавоноиды и полифенолы) [287]. У больных с ВЗК показан дисбаланс в активности СОД-1, СОД-2, СОД-3, глутатионпероксидазы, каталазы, снижается содержание глутатиона и мелатонина, а уменьшение в рационе овощей и фруктов сопряжено с ограничением эффектов экзогенных антиоксидантов [70, 142].

Эскалация оксидативного стресса при ВЗК приводит к активации ПОЛ клеток ЖКТ, гибели энтероцитов, повреждению эндотелиоцитов сосудов стенки кишечника и др. неблагоприятным последствиям [263, 288, 301]. В связи с этим, продукты ПОЛ могут рассматриваться как патохимические маркеры ВЗК, а их содержание в стенке кишечника позволяет судить о выраженности воспалительного процесса и эффективности применяемой терапии. Ранее, в главе

3.2.4, нами продемонстрировано накопление продуктов ПОЛ и ОМБ в очаге повреждения слизистой оболочки толстого кишечника.

Применение при экспериментальном колите ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы приводит к снижению содержания продуктов ПОЛ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника.

Так, на 3 и 5 сутки наблюдения уменьшалось количество первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, а на 7 сутки – снижалось количество первичных продуктов в гептановой фазе, а также вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе липидного экстракта (таблица 34). На фоне применения экстракта куркумы содержание первичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе и вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе снижалось на 5 сутки по сравнению с 3 сутками ($p < 0,05$), а содержание вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе и первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе увеличивалось на 5 сутки по сравнению с 3 сутками экспериментального колита ($p < 0,05$); содержание вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе и первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе снижалось, а содержание вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе увеличивалось на 7 сутки по сравнению с 5 сутками экспериментального колита ($p < 0,05$). Анализ содержания продуктов ПОЛ в группах 1 и 3 позволяет констатировать на фоне локального применения экстракта куркумы при экспериментальном колите их снижение и частичное восстановление - на 5 сутки первичных продуктов в изопропанольной фазе, на 7 сутки первичных продуктов в гептановой фазе, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе, а также выраженное восстановление уровня первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе на 3 сутки.

Наиболее выраженный ПОЛ-ограничивающий эффект экстракта куркумы в толстом кишечнике зафиксирован в изопропанольной фазе липидного экстракта [3], что косвенно позволяет констатировать цитопротекторное действие в отношении фосфолипидов клеточных мембран. Наличие двух фенольных гидроксильных групп в его составе делают куркумин уникальным классическим

антиоксидантом: фенольные вещества легко взаимодействуют с АФК за счет их способности отдавать электрон и протон и переходить в форму относительно стабильного феноксильного радикала с последующей делокализацией неспаренного электрона [132]. Косвенный антиоксидантный эффект куркумина связан с его способностью ограничивать продукцию провоспалительных цитокинов, метаболитов арахидоновой кислоты, матриксных металлопротеиназ за счет ингибции NF- κ B зависимого пути, что приводит к снижению активности клеток-продуцентов АФК [134].

Полагаем, что зафиксированный нами при экспериментальном колите ПОЛ-ограничивающий эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев имеет значение в частичном сохранении целостности и функциональной активности толстого кишечника, препятствует прогрессированию болезни и тяжести ее симптомов. Далее проведена оценка содержания продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки области повреждения толстого кишечника в спонтанном и металл-индуцированном режимах (таблицы 35, 36).

При оценке спонтанной ОМБ выявлено, что на 3 сутки эксперимента снижается общее содержание карбонильных производных белков, в том числе АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых как в области УФ-света, так и в области видимого света спектра. При интегративном анализе видно, что снижается суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ, а также суммарное количество производных нейтрального характера (АДНФГ и КДНФГ в области УФ-света спектра) и производных основного характера (АДНФГ и КДНФГ в области видимого света спектра). Однако, на 3 сутки наблюдения доля относительного содержания АДНФГ, относительного содержания КДНФГ, а также относительного количества производных нейтрального характера и производных основного характера статистически значимо не изменяется.

На 5 сутки эксперимента не зафиксировано достоверного изменения общего содержания продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника, при этом снижается количество КДНФГ, регистрируемых в области

УФ-света и в области видимого света спектра, суммарное количество КДНФГ. На 7 сутки наблюдения изменение содержания продуктов ОМБ в спонтанном режиме аналогичны таковым на 3 сутки: снижается общее количество продуктов ОМБ, в том числе АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых как в области УФ-света, так и в области видимого света спектра, суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ, а также суммарное количество карбонильных производных нейтрального характера и основного характера. На 7 сутки эксперимента доля суммарного содержания АДНФГ, суммарного содержания КДНФГ, а также доля суммарного количества производных нейтрального характера и производных основного характера статистически значимо не изменяется.

При оценке металл-индуцированной ОМБ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника зафиксировано на 3, 5 и 7 сутки экспериментальном колите снижение общего количества продуктов ОМБ, в том числе АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых как в области УФ-света, так и в области видимого света спектра, суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ, на 3 и 7 сутки – снижение суммарного количества карбонильных производных нейтрального характера и основного характера. Однако, доля карбонильных производных значимо снижется только в отношении АДНФГ и производных нейтрального характера на 3 сутки наблюдения.

При подсчете отношения содержания всех продуктов ОМБ и их отдельных компонентов при спонтанном окислении протеинов к индуцированному по реакции Фентона проведена оценка резервно-адаптационного потенциала. Выявлено, что резервно-адаптационный потенциал при экспериментальном колите в условиях применения экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий по суммарному содержанию продуктов ОМБ снижается на 3 и 7 сутки, повышается – на 5 сутки наблюдения.

При этом, на 3 и 5 сутки он достигает значений в группе интактных животных, а на 7 сутки – становится значимо ниже, чем в группе интактных животных. Детальный анализ компонентов ОМБ позволил выяснить, что

снижение резервно-адаптационного потенциала на 3 и 7 сутки происходит за счет всех составляющих (АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых в области УФ-света и в области видимого света спектра), но преимущественно за счет АДНФГ, образующихся при повреждении аминокислот нейтрального характера, а также КДНФГ, образующихся при повреждении аминокислот основного характера. Повышение резервно-адаптационного потенциала на 5 сутки происходит преимущественно за счет АДНФГ, образующихся при повреждении аминокислот нейтрального характера.

Таблица 34 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий на содержание продуктов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
Диеновые конъюгаты (г), е.и.о.	0,63 (0,55; 0,65)	0,79 (0,79; 0,81) *	0,66 (0,66; 0,68)	0,75 (0,74; 0,81) *	0,79 (0,77; 0,82) *	0,61 (0,61; 0,64)	0,72 (0,71; 0,73) * #
Кетодиены и сопряженные триены (г), е.и.о.	0,06 (0,05; 0,06)	0,09 (0,06; 0,09) *	0,17 (0,17; 0,18) *	0,07 (0,06; 0,09)	0,08 (0,06; 0,08)	0,17 (0,16; 0,17) *	0,06 (0,05; 0,07)
Основания Шиффа (г), е.и.о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,01 (0,01; 0,01)	0,02 (0,01; 0,02)	0,03 (0,03; 0,04) *	0,03 (0,03; 0,03)	0,02 (0,01; 0,02)	0,03 (0,02; 0,03) *
Диеновые конъюгаты (и), е.и.о.	0,34 (0,32; 0,36)	0,38 (0,38; 0,45) *	0,53 (0,52; 0,57) *	0,43 (0,41; 0,45) *	0,35 (0,33; 0,42) #	0,49 (0,47; 0,52) * #	0,39 (0,38; 0,41) *
Кетодиены и сопряженные триены (и), е.и.о.	0,31 (0,29; 0,32)	0,61 (0,61; 0,71) *	0,41 (0,38; 0,41) *	0,51 (0,51; 0,55) *	0,64 (0,56; 0,71) *	0,34 (0,30; 0,39) *	0,41 (0,41; 0,44) * #
Основания Шиффа (и), е.и.о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,08 (0,08; 0,11) *	0,01 (0,00; 0,01)	0,14 (0,12; 0,14) *	0,08 (0,06; 0,09) *	0,01 (0,01; 0,01)	0,09 (0,08; 0,11) * #

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума. Параметры отражают содержание продуктов ПОЛ в гептановой (г) и изопропанольной (и) фазах липидного экстракта гомогената слизистой оболочки толстого кишечника.

Таблица 35 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на параметры спонтанной окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
S _{АДНФГ uv} , у.е./мг белка	151,21 (128,47; 158,35)	283,62 (216,12; 291,47) *	150,17 (148,52; 161,95)	345,15 (298,16; 400,92) *	108,38 (107,82; 147,68) * #	157,42 (81,95; 162,61)	186,62 (182,19; 254,38) * #
S _{АДНФГ vs} , у.е./мг белка	5,03 (4,43; 5,14)	14,19 (13,25; 15,21) *	7,76 (7,53; 8,38) *	16,08 (15,93; 32,03) *	6,63 (5,26; 7,19) #	6,45 (3,71; 7,19)	13,41 (12,78; 13,81) * #
S _{КДНФГ uv} , у.е./мг белка	9,45 (8,29; 9,81)	19,77 (18,28; 26,67) *	15,31 (14,83; 16,61) *	29,84 (28,85; 51,81) *	11,77 (8,33; 13,03) #	12,54 (6,85; 13,45) #	23,64 (22,62; 25,06) * #
S _{КДНФГ vs} , у.е./мг белка	0,67 (0,65; 0,68)	1,59 (1,38; 1,91) *	0,89 (0,87; 0,93) *	2,43 (2,21; 4,25) *	0,81 (0,78; 1,04) * #	0,63 (0,44; 0,91) #	1,74 (1,64; 1,94) * #
S _{ОМБ спонт.} , у.е./мг белка	141,86 (136,04; 166,74)	324,21 (313,48; 340,93) *	185,88 (170,67; 242,59) *	392,31 (272,17; 497,71) *	128,31 (122,75; 167,69) #	177,97 (92,96; 183,28) *	225,42 (219,84; 257,96) * #
S _{АДНФГ} , у.е./мг белка	132,91 (124,19; 156,25)	302,83 (293,81; 312,35) *	169,72 (157,23; 222,68)	432,96 (361,24; 470,71) *	114,46 (113,64; 154,88) #	163,87 (85,66; 169,81)	199,48 (195,38; 231,15) * #
S _{КДНФГ} , у.е./мг белка	10,23 (8,94; 10,49)	21,37 (19,66; 28,57) *	16,16 (14,61; 18,61) *	31,95 (31,05; 58,21) *	12,81 (9,11; 13,84) #	13,46 (7,31; 14,09) #	25,33 (24,46; 26,81) * #
% АДНФГ	93,71 (93,69; 93,71)	92,59 (91,61; 93,41)	91,43 (91,31; 92,51) *	89,13 (88,99; 90,02) *	91,28 (91,19; 92,35)	92,62 (92,14; 92,65)	88,89 (87,96; 92,03) *
% КДНФГ	6,29 (6,29; 6,31)	7,41 (6,59; 8,38)	8,56 (7,49; 8,69) *	11,02 (10,93; 11,12) *	8,17 (7,53; 8,76)	7,37 (7,34; 7,85)	11,29 (10,96; 12,03) *
S _{uv} , у.е./мг белка	161,03 (136,76; 167,81)	311,25 (301,91; 324,83) *	162,24 (161,97; 177,26)	374,01 (254,37; 461,42) *	120,86 (116,71; 159,45) * #	170,88 (88,81; 175,16)	210,92 (204,81; 242,81) * #
S _{vs} , у.е./мг белка	5,71 (5,09; 5,92)	12,95 (11,57; 16,09) *	8,43 (7,98; 8,62) *	27,33 (18,33; 40,52) *	7,44 (6,04; 8,24) * #	7,08 (4,15; 8,11)	15,15 (14,47; 15,71) * #
% uv	96,57 (96,41; 96,58)	95,57 (95,27; 96,01)	95,29 (95,13; 95,36)	92,88 (92,72; 93,59) *	94,53 (94,19; 95,07)	95,57 (95,53; 96,01)	93,33 (92,51; 93,81) *
% vs	3,42 (3,41; 3,59)	4,42 (3,99; 4,72)	4,71 (4,63; 4,86)	7,11 (6,41; 7,27) *	5,46 (4,92; 5,81)	4,42 (3,98; 4,46)	6,66 (6,19; 7,49) *

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, uv – ультрафиолет, vs – видимый свет.

Таблица 36 – Влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев на параметры металл-зависимой окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры, у.е./мг белка	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)
S аднфг uv, у.е./мг белка	202,95 (202,95; 205,68)	313,07 (311,25; 347,79) *	316,74 (293,11; 326,78) *	464,16 (416,31; 585,37) *	174,37 (168,04; 242,01) * #	256,57 (168,94; 295,41)* #	351,71 (342,29; 359,21)* #
S аднфг vs, у.е./мг белка	25,94 (25,22; 25,94)	32,25 (32,02; 32,82) *	61,99 (51,39; 70,35) *	89,52 (77,11; 107,87) *	23,07 (22,04; 26,52) #	48,67 (39,33; 54,16)* #	68,03 (65,53; 73,08)* #
S кднфг uv, у.е./мг белка	33,94 (33,55; 33,95)	42,42 (41,01; 43,42)*	71,12 (60,14; 80,76)*	107,81 (98,51; 128,56)*	30,61 (27,41; 32,31)#	54,88 (45,02; 63,33)* #	82,41 (79,24; 87,29)* #
S кднфг vs, у.е./мг белка	3,35 (3,35; 3,41)	4,46 (4,16; 4,46)*	6,72 (5,84; 8,98)*	12,94 (11,62; 13,31)*	3,16 (3,02; 3,63)#	6,31 (4,81; 6,81)*	8,34 (8,12; 9,23)* #
S ОМБ индуц., у.е./мг белка	266,21 (266,21; 280,81)	380,93 (373,56; 427,51)*	414,95 (414,94; 486,89)*	662,05 (643,29; 690,09)*	230,16 (226,81; 298,76)* #	366,45 (258,11; 419,71)* #	509,53 (499,98; 549,63)* #
S аднфг, у.е./мг белка	228,91 (227,81; 228,91)	340,36 (336,48; 380,61)*	360,77 (346,74; 397,13)*	533,57 (525,35; 585,49)*	196,41 (194,57; 265,09)* #	305,25 (208,28; 349,56)* #	421,11 (412,54; 452,17)* #
S кднфг, у.е./мг белка	37,31 (37,07; 37,31)	46,88 (45,16; 47,88)*	68,19 (64,65; 89,75)*	135,03 (123,99; 159,56)*	34,63 (32,03; 37,67)#	61,21 (49,83; 70,14)* #	91,22 (90,26; 101,71)* #
% АДНФГ	86,94 (85,98; 88,02)	89,34 (89,03; 90,07)	81,56 (81,56; 83,56)*	81,15 (81,01; 83,48)*	86,61 (85,32; 88,64)#	81,53 (80,69; 83,28)*	82,48 (82,41; 82,79)*
% КДНФГ	13,05 (11,97; 14,01)	10,65 (9,92; 10,96)	18,43 (16,43; 18,43)*	18,84 (16,51; 18,99)*	11,31 (11,27; 11,35)*	18,46 (16,71; 19,31)*	17,51 (17,21; 17,59)*
S uv, у.е./мг белка	236,91 (236,91; 297,16)	350,11 (344,81; 390,21)*	354,59 (348,42; 407,54)*	527,74 (334,25; 541,24)*	201,77 (200,36; 272,63)* #	358,73 (311,45; 485,09)*	435,25 (426,25; 467,38)* #
S vs, у.е./мг белка	29,29 (29,29; 29,98)	36,19 (30,83; 36,71)*	60,35 (55,01; 79,34)*	87,26 (52,72; 101,14)*	26,13 (25,02; 29,81) #	60,97 (54,99; 99,59)*	76,38 (73,72; 82,25)* #
% uv	88,99 (88,99; 90,83)	91,91 (91,27; 92,31)*	83,71 (83,71; 85,45)*	84,52 (83,91; 86,37)*	88,48 (87,05; 88,96)#	83,25 (82,89; 84,99)*	85,26 (84,83; 85,76)*
% vs	11,01 (9,1; - 11,01)	8,09 (7,69; 8,72)*	16,29 (14,54; 16,29)*	15,47 (13,62; 16,08)*	8,98 (8,74; 11,51) *	16,74 (15,01; 17,11)*	14,73 (14,23; 15,16)*
РАП, %	54,71 (51,53; 56,71)	80,25 (74,89; 87,87)*	45,39 (42,73; 51,97)*	57,15 (50,11; 59,71)	56,25 (53,87; 58,87)#	51,98 (49,89; 53,59)#	45,09 (45,33; 46,73)* #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, ОМБ – окислительная модификация белков uv – ультрафиолет, vs – видимый свет.

Таким образом, локальное применение экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев при экспериментальном колите приводит в толстом кишечнике к снижению суммарного содержания продуктов ОМБ на 3 и 7 сутки эксперимента, равнозначному ограничению повреждения аминокислотных остатков как основного, так и нейтрального характера, равнозначному ограничению образования первичных и вторичных карбонильных производных белков, а также процессов фрагментации и агрегации белков и частичному восстановлению резервно-адаптационного потенциала по параметрам окислительной модификации белков. Наряду с этим, на 5 сутки эксперимента снижалось образование вторичных карбонильных производных белков как основного, так и нейтрального характера. Как видно, ОМБ-ограничивающий эффект экстракта куркумы при экспериментальном колите более выражен в отношении КДНФГ (вторичных карбонильных производных белков).

Полученные данные позволяют констатировать антиоксидантный эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев при экспериментальном колите на основании ПОЛ-ограничивающего и ОМБ-ограничивающего эффектов.

Список работ, опубликованных по главе 4

1. Афлятунова А.А. Бакеева А.Е. Клинический статус и некоторые показатели врожденного иммунитета при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы длинной // XXVI Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 26 – 27 марта 2020). – Санкт-Петербург, 2020. – С. 34 – 36.

2. Бакеева, А.Е. Влияние спиртового экстракта куркумы длинной в составе ректальных суппозиториев на клинический статус и показатели перекисного окисления липидов при экспериментальной болезни Крона // Актуальные проблемы биомедицины – 2020 : сборник тезисов XXVI Всероссийской

конференции молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020). – Санкт-Петербург, 2020. - С. 36-37.

3. Осиков, М.В. Антиоксидантный эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях оригинального состава при экспериментальной болезни Крона // М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 3. – С. 314 – 319.

4. Осиков, М.В. Влияние экстракта корневищ куркумы длинной в составе ректальных суппозиториях на показатели перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 175. – № 3. – С. 80 – 86.

5. Осиков, М.В. Динамика показателей перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом корневищ куркумы длинной / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64. - № 3. – С. 131 – 136.

6. Осиков, М.В. Иммуотропные эффекты куркумина в составе оригинальных ректальных суппозиториях при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 483 – 496.

7. Осиков, М.В. Клинико-иммунологическая характеристика экспериментальной болезни Крона в условиях локального применения экстракта корневищ куркумы длинной / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2020. – Т. 17. - №1. – С. 61 – 71.

8. Осиков, М.В. Эффективность локального применения экстракта куркумы при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 178. – № 6. – С. 133 – 140.

9. Афлятунова А.А., Бивалькевич В.А., Бакеева А.Е. Влияние новой лекарственной формы с экстрактом куркумы на количественный состав лейкоцитов и функциональную активность нейтрофилов крови при экспериментальной болезни Крона // XXV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 28 – 29 марта 2019). – Санкт-Петербург, 2019. – С. 25 – 26.

10. Осиков, М.В. Иммуотропные эффекты экстракта *Curcuma longa* в составе ректальных суппозиториях при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29207> (дата обращения: 23.06.2020).

11. Осиков, М.В. Сравнительный анализ влияния куркумина в составе ректальных суппозиториях на концентрацию IgG и IgM в сыворотке при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, М.С. Бойко // Рос. иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22). – № 3. – С. 1235 – 1238.

ГЛАВА 5 - СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С ЭКСТРАКТОМ КУРКУМЫ И РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ С 5-АМИНОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ НА ПАРАМЕТРЫ ГОМЕОСТАЗА В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОЛИТА

5.1 - Клинико-морфологическая характеристика экспериментального колита в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой

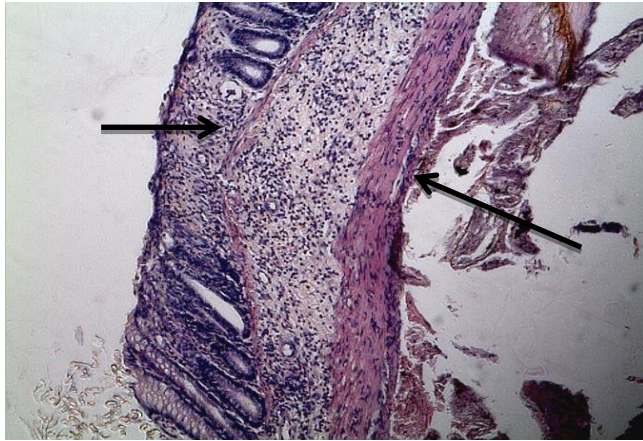
На данном этапе исследования выполнялось решение задачи при экспериментальном колите по сопоставлению эффектов экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев с эффектами наиболее часто используемого базисного средства для лечения ВЗК 5-АСК в составе ректальных суппозиториев.

Прежде всего, отметим, что на фоне применения 5-АСК выраженность клинических симптомов экспериментального колита уменьшалась: уже на 3 сутки, а также на 5 и 7 сутки наблюдения консистенция стула становилась более оформленной, не у всех животных, а при наличии реже и в меньшем объеме фиксировалось ректальное кровотечение, снижение массы тела преимущественно не фиксировалось. Указанные симптомы нашли отражение в изменении индекса клинической активности болезни (таблица 37). На 5 и 7 сутки эксперимента параметр DAI статистически значимо снижался по сравнению с контрольной группой, но оставался значимо выше, чем в группе интактных животных. На фоне применения 5-АСК не отмечено достоверных различий параметра DAI на 5 сутки по сравнению с 3 сутками и на 7 сутки по сравнению с 3 и 5 сутками наблюдения. Кроме этого, параметр индекса клинической активности болезни в группе животных с экспериментальным колитом на фоне применения 5-АСК и в группе животных с экспериментальным колитом на фоне применения экстракта куркумы не имел статистически значимых отличий на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, что

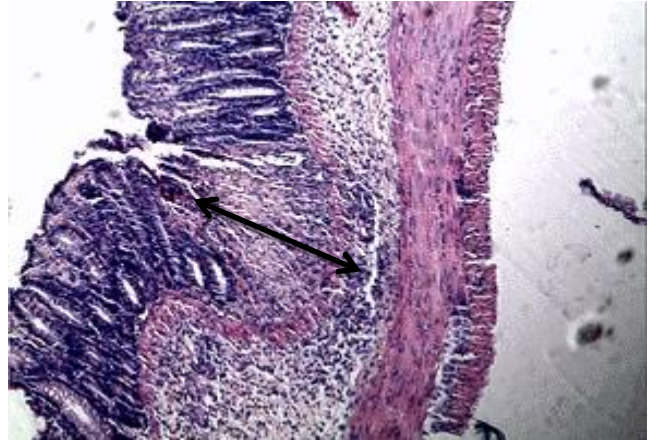
свидетельствует о сопоставимости эффектов экстракта куркумы и 5-АСК в отношении клинических симптомов экспериментального колита по параметру DAI.

Клиническая картина при экспериментальном колите на фоне применения 5-АСК находит отражение в морфологии очага повреждения. На 3 сутки наблюдения определялись язвенные дефекты, различные по глубине распространения – от поверхностных, распространяющихся до собственной пластинки слизистой, до трансмуральных. Язвенные дефекты, дно которых располагалось в пределах собственной пластинки слизистой или в подслизистом слое (рисунок 28), имели чашеобразную форму, выполнены мелкозернистыми бесструктурными массами с густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 30а). Собственная пластинка и подслизистый слой разрыхлены, утолщены за счет клеточной инфильтрации преимущественно из лимфоцитов и нейтрофильных лейкоцитов с примесью эозинофилов (рисунок 29). Стенки сосудов мелкого калибра гомогенизированы, утолщены за счет плазматического пропитывания, эндотелиоциты набухшие (рисунок 31а). В случаях, когда изъязвление носило трансмуральный характер, обращало на себя внимание наличие большого количества эозинофилов в инфильтрате (рисунок 31б) и слабо выраженная пролиферация однорядного эпителия по краю язвенных дефектов (рисунок 30б).

На 5 сутки на участках, занимающих от одного до нескольких полей зрения, определялись язвенные дефекты чашеобразной формы. Дно дефектов располагалось в слизистой (рисунок 32), подслизистой, иногда в циркулярном слое мышечной оболочки. Непрерывность собственной пластинки слизистой оболочки в проекции язвенных дефектов была местами нарушена, волокна разрыхлены, раздвинуты экссудатом, состоящим преимущественно из лимфоцитов и нейтрофилов с примесью эозинофилов (рисунок 33).

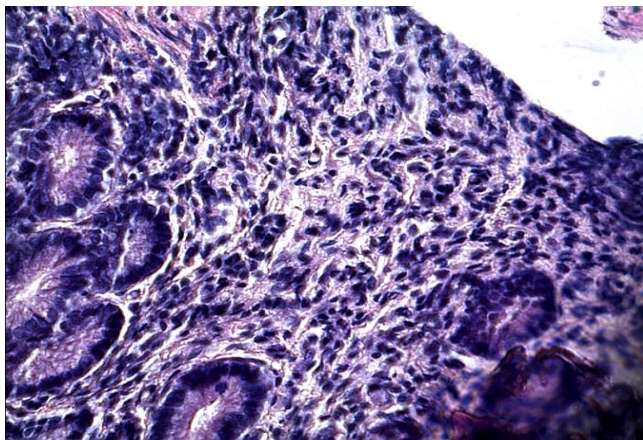


а)

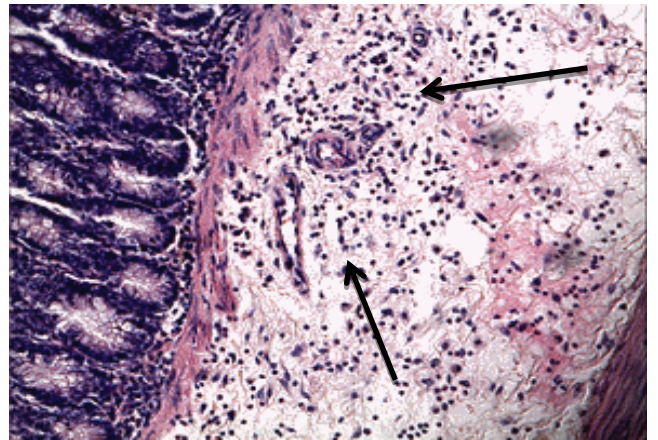


б)

Рисунок 28 – Морфология очага повреждения на 3 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – язвенный дефект в пределах слизистой оболочки, ее собственной пластинки и подслизистого слоя (окр. гематоксилин-эозин, ув. х50); б) при применении 5-АСК – язвенный дефект в пределах слизистой оболочки, собственной пластинки и подслизистого слоя (окр. гематоксилин эозином, ув. х50).

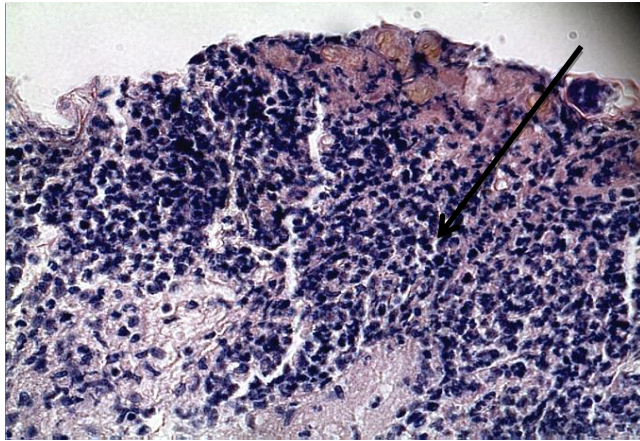


а)

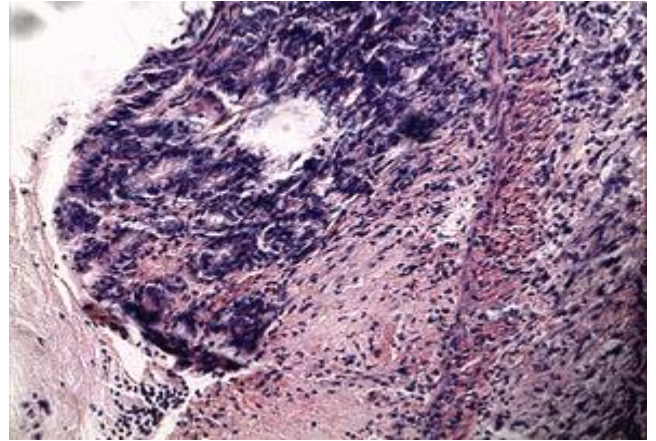


б)

Рисунок 29 – Морфология очага повреждения на 3 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – в слизистой оболочке грануляционная ткань (стрелка) с умеренным количеством клеток и неполной эпителизацией; нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация интерстия, дисконкомплексация крипт (окр. гематоксилин-эозин, ув. х200); б) при применении 5-АСК – утолщенный подслизистый слой с нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией (стрелки) (окр. гематоксилин эозином, ув. х200).

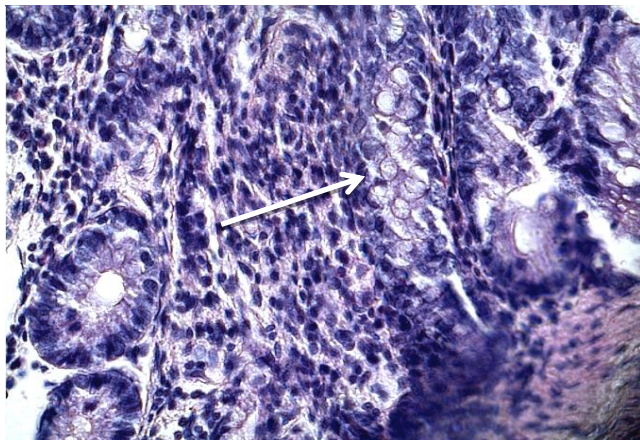


а)

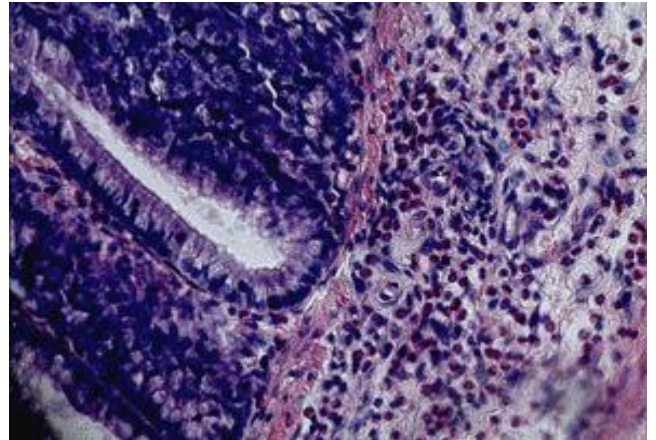


б)

Рисунок 30 – Морфология очага повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – клеточный детрит в области язвы с густой инфильтрацией (стрелка) распадающимися полиморфноядерными лейкоцитами (окраска гематоксилин эозином, ув. x200); б) при применении 5-АСК – слабо выраженные признаки пролиферации однорядного эпителия на границе с язвенным дефектом (окраска гематоксилин эозином, ув. x200).

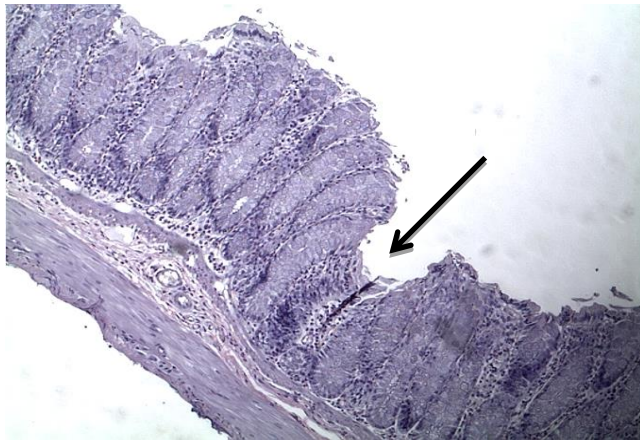


а)

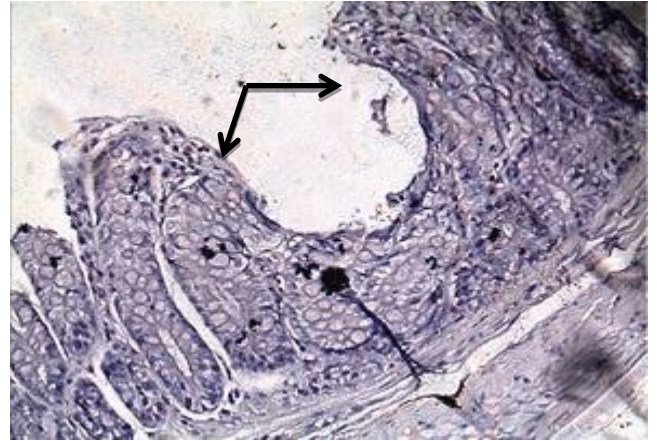


б)

Рисунок 31 – Морфология очага повреждения толстого кишечника на 3 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – дисконфлексация и укорочение крипт; эпителий некоторых крипт (стрелка) в состоянии тяжелой белковой дистрофии (окраска гематоксилин эозином, ув. x400); б) при применении 5-АСК – большое количество эозинофилов (стрелки) в составе инфильтрата подслизистого слоя при трансмуральном изъязвлении (окраска гематоксилин эозином, ув. x400).

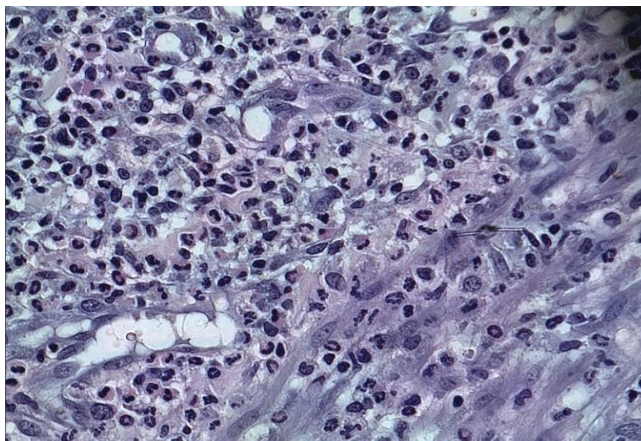


а)

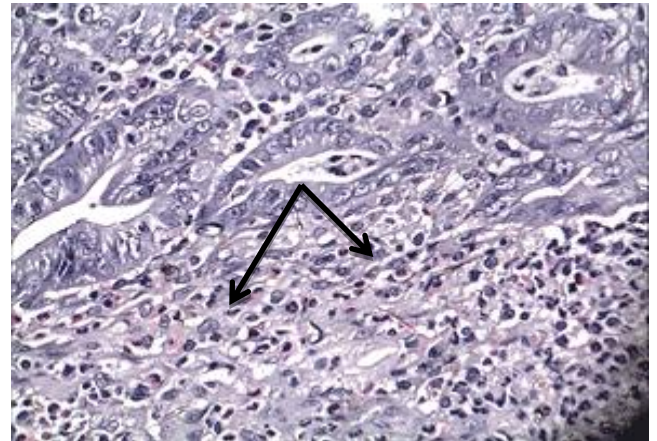


б)

Рисунок 32 – Морфология очага повреждения толстого кишечника на 5 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – эрозивный дефект в пределах слизистой оболочки (окр. гематоксилин-эозин, ув. x100); б) при применении 5-АСК - поверхностный язвенный дефект (стрелки) в пределах слизистой оболочки (окр. гематоксилин-эозин, ув. x100).



а)

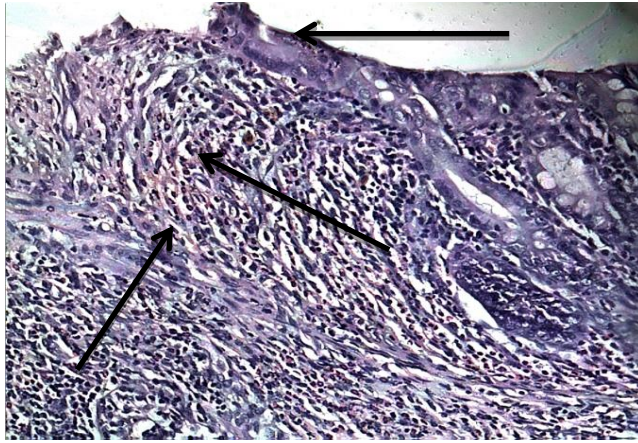


б)

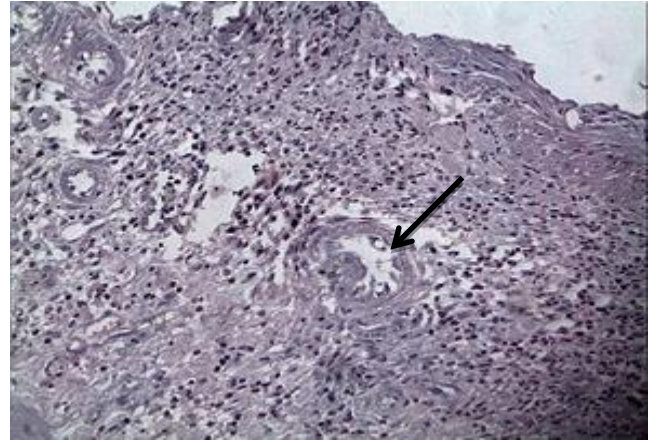
Рисунок 33 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 5 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – нейтрофильно-лимфоцитарный инфильтрат в подслизистом слое; видны очаги инфильтрации резидентными макрофагами (стрелка) и участки пролиферации молодых фибробластов (стрелки) (окраска гематоксилин эозином, ув. x400); б) при применении 5-АСК – нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (стрелки) дна язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. x400).

Определялись очаги инфильтрации макрофагами и плазматическими клетками и поля пролиферации молодых веретеновидных фибробластов (рисунок 35а). В перифокальных зонах в подслизистом слое сохранялся отек межучной ткани, выраженное венозное и капиллярное полнокровие с картиной плазматического пропитывания и фибриноидного набухания сосудистых стенок (рисунок 34б). Стенки язвенных дефектов представлены дистрофически измененной слизистой оболочкой. Просветы кишечных желез расширены, эпителий в состоянии тяжелой белковой дистрофии: цитоплазма клеток с крупными вакуолями, ядра их просветлены. Крипты укорочены. В глубине стенок язвенных дефектов видна пролиферация сохранившихся камбиальных клеток кишечных желез и крипт, а на поверхности – пролиферация однорядного столбчатого эпителия (рисунок 34а, 35б).

На 7 сутки глубина язвенных дефектов варьировала от очень поверхностных (в пределах слизистой оболочки) до проникающих в подслизистый слой, но ни в одном случае не распространяющихся в мышечный слой. Иногда дно дефектов располагалось глубоко в подслизистом слое, наблюдался отек межучной ткани, выраженное венозное и капиллярное полнокровие, плазматическое пропитывание и фибриноидное набухание сосудистых стенок, густая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация с примесью плазматических клеток, гистиоцитов и эозинофилов. В этом варианте язвенного поражения встретились 3 случая вовлечения в воспалительный процесс лимфоидных фолликулов с нагноением в виде густой нейтрофильной инфильтрации на фоне гиперплазии лимфоидной ткани без центров размножения (рисунок 36). При этом, язвенные дефекты были довольно узкими, с отвесными стенками, на их поверхности – пролиферация однорядного эпителия с практически полным укрытием язвенной поверхности.

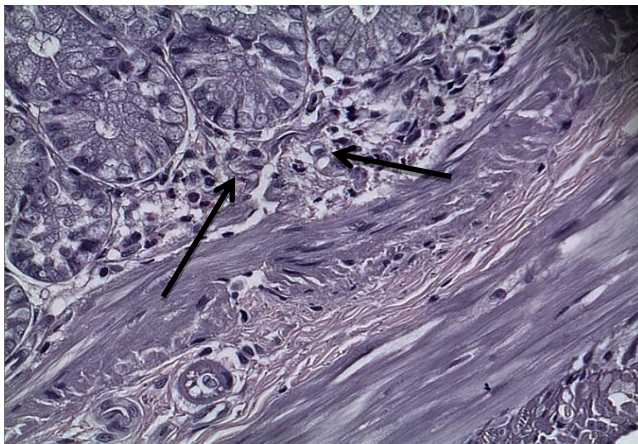


а)

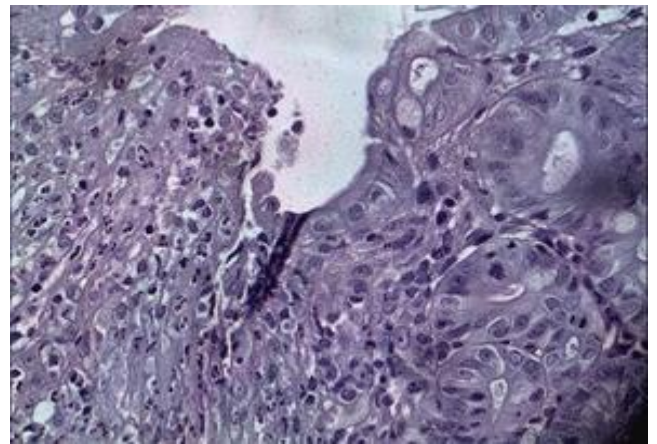


б)

Рисунок 34 – Морфология очага повреждения на 5 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – хорошо выраженная формирующаяся соединительнотканная основа грануляционной ткани в подслизистом слое и поля пролиферации фибробластов (стрелки); пролиферация столбчатого однорядного эпителия (стрелка) на поверхности язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. х200); б) при применении 5-АСК – в подслизистом слое в зоне язвенного дефекта с явлениями фибриноидного набухания стенки (окраска гематоксилин эозином, ув. х200).



а)



б)

Рисунок 35 – Морфология очага повреждения на 5 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы – слабая клеточная инфильтрация (стрелки) собственной пластинки слизистой (окраска гематоксилин эозином, ув. х400); б) при применении 5-АСК – явления эпителизации язвенного дефекта (стрелка): пролиферация однорядного эпителия и миграция эпителиального пласта на поверхность язвенного дефекта (окраска гематоксилин эозином, ув. х400).

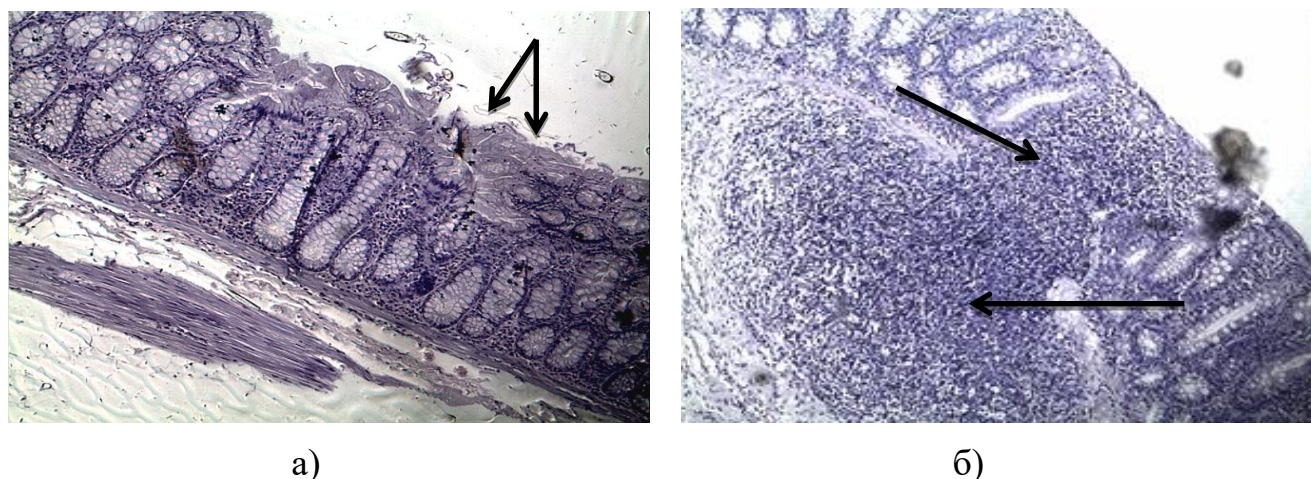


Рисунок 36 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 7 сутки экспериментального колита: а) при применении экстракта куркумы - эпителизированный язвенный дефект (стрелки) (окраска гематоксилин эозином, ув. x100); б) при применении 5-АСК – язвенный дефект с распространением дефекта подслизистый слой (стрелки) (окраска гематоксилин эозином, ув. x100).

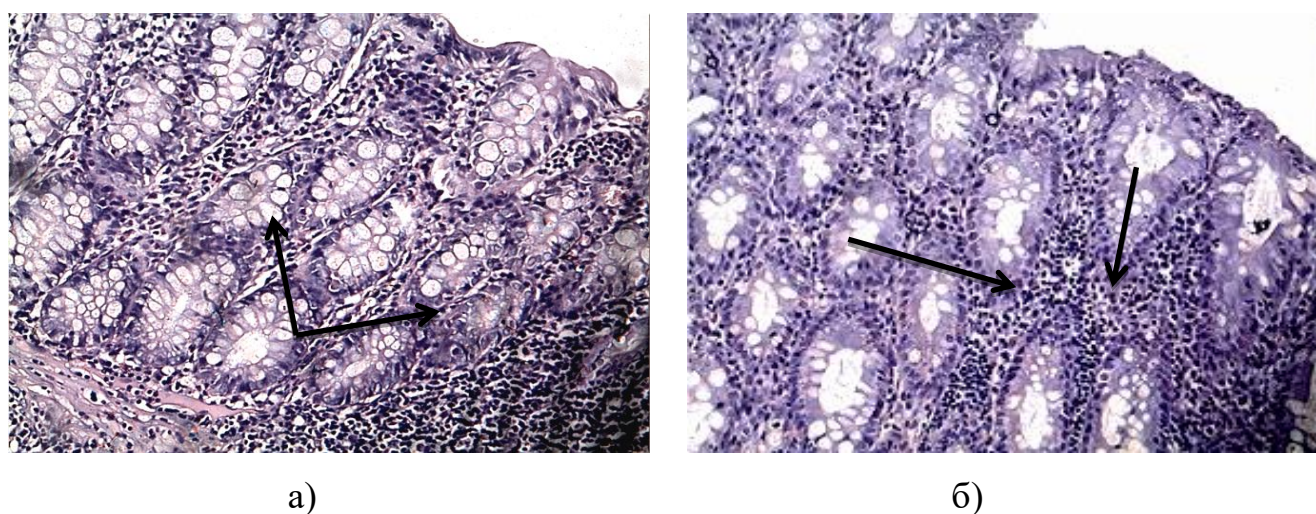


Рисунок 37 – Морфологические изменения в очаге повреждения толстого кишечника на 7 сутки экспериментального колита: а) в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы: белковая дистрофия эпителия кишечных крипт, очаговая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация интерстициальных пространств (стрелки) между криптами, (окраска гематоксилин эозином, ув. x200); б) в условиях применения ректальных суппозиториях с 5-АСК: нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация соединительно-тканых прослоек (стрелки) между укороченными криптами слизистой оболочки рядом с язвенными дефектами (окраска гематоксилин эозином, ув. x200).

В перифокальных зонах сохранялся отек и дистрофические изменения слизистой оболочки. Просветы кишечных желез расширены, крипты укорочены. Цитоплазма клеток эпителия просветлена, вакуолизирована. Прослойки рыхлой соединительной ткани, лежащие между криптами, разрыхлены, с густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией (рисунок 37). Сравнительный анализ морфологии очага повреждения при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и 5-АСК выявил на 3 сутки наблюдения менее выраженные по глубине язвенные дефекты, они не носили трансмурального характера, не распространялись глубже подслизистого слоя, визуальна нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация стромы была менее густая. На 5 сутки эксперимента в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы в отличие от 5-АСК сохранялись только поверхностные, в пределах слизистой оболочки эрозии, наблюдались только единичные эпителиальные клетки с признаками белковой дистрофии, менее выраженная лейкоцитарная инфильтрация. Кроме этого, обращает внимание большее представительство фибробластов и как следствие новообразованных соединительно-тканых волокон параллельно поверхности слизистой оболочки. На 7 сутки эксперимента в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы в отличие от 5-АСК во всех препаратах кишки наблюдалась полная эпителизация язвенных дефектов, менее густая нейтрофильная инфильтрация, отсутствие гиперплазии лимфоидной ткани, отсутствие отека межучной ткани, венозного и капиллярного полнокровия, плазматического пропитывания и фибриноидного набухания сосудистых стенок. Итак, при экспериментальном колите на фоне применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы в отличие от 5-АСК наблюдалась репарация язвенных дефектов, морфологические признаки воспалительного процесса в виде лейкоцитарной инфильтрации, отека были менее выражены и раньше фиксировались признаки заживления язвенных дефектов, репарации поврежденных тканей кишечника. Морфометрический анализ очага повреждения

в толстом кишечнике при экспериментальном колите при применении ректальных суппозиториев с 5-АСК установил, что на 3 сутки снижалась инфильтрация нейтрофилами и эозинофилами, на 5 сутки эксперимента - снижалась инфильтрация нейтрофилами, эозинофилами, лимфоцитами, гистиоцитами, плазмоцитами, а также уменьшается размер язвенного дефекта и снижается индекс повреждения тканей, на 7 сутки - снижается инфильтрация нейтрофилами, эозинофилами, гистиоцитами, плазмоцитами, уменьшение размер язвенного дефекта и снижается индекс повреждения тканей (таблица 38). Все исследуемые параметры не достигали значений в группе интактных животных, что позволяет говорить об их частичном восстановлении преимущественно на 5 и 7 сутки наблюдения. При сравнении морфометрических параметров в очаге повреждения толстого кишечника в группах 3 и 4 (применение экстракта куркумы и 5-АСК в составе суппозиториев) выявлено, что на 3 сутки экспериментального колита в обеих группах снижается представительство лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, особенностью при при применении куркумы является более выраженное снижение количества эозинофилов, увеличение количества гистиоцитов, фибробластов, плазмоцитов, уменьшение размера язвенного дефекта. На 5 сутки эксперимента отличия наблюдались только по количеству в очаге гистиоцитов, которых при применении экстракта куркумы было больше, чем при применении 5-АСК, на 7 сутки значимых отличий по всем параметрам не наблюдалось. Итак, морфология очага повреждения при экспериментальном колите в условиях локального применения экстракта куркумы в отличие от 5-АСК характеризовалась увеличением представительства гистиоцитов, фибробластов, снижением количества эозинофилов и как следствие ограничения деструктивных процессов и активации репаративных событий, обнаружено уменьшение размеров язвенных дефектов уже на 3 сутки наблюдения. Интегральный параметр повреждения ткани кишечника, индекс TDI, значимо снижался на 3 и 5 сутки эксперимента одинаково как в условиях применения экстракта куркумы, так и применения 5-АСК.

Таблица 37 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на активность патологического процесса, оцениваемого с использованием индекса при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Группы живот-ных	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Индекс актив-ности болезни (DAI, у.е.)	7,00 (3,00; 7,00) *	8,00 (6,00; 10,00) *	11,00 (11,00; 11,00) *	5,00 (5,00; 5,00) *	4,00 (4,00; 5,00) * #	4,00 (4,00; 4,00) * #	5,00 (4,00; 5,00) *	5,00 (5,00; 5,00) * #	4,00 (2,00; 4,00) * #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 38 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на морфометрические параметры толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интакт- ные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Лимфоциты, 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) *	1237,11 (858,65; 2376,23) *	770,97 (635,83; 903,49) * #	2559,24 (1006,28; 3423,42) *
Нейтрофилы, ед./мм ²	196,93 (189,70; 214,76)	2888,087 (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) * #	529,59 (318,93; 1089,11) * #	362,81 (303,46; 559,61) * #	1213,59 (545,07; 1327,01) * #
Эозинофилы, 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) *	421,81 (346,53; 1117,02) * # &	349,34 (180,45; 608,27) * #	565,21 (339,81; 710,91) * #
Гистиоциты, 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) * #	172,34 (124,91; 260,74) * # &	480,34 (369,61; 827,25) * # &	790,37 (524,11; 1198,51) * #
Плазматические клетки, 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) * #	136,13 (118,15; 197,01) * &	308,01 (131,01; 364,96) * #	423,56 (272,53; 473,93) * #

Продолжение таблицы 38

Фибробласты, 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) *	357,44 (284,19; 386,13) * &	1362,53 (1037,59; 2075,47) *	1456,31 (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) * #	420,00 (262,00; 634,00) * &	199,00 (149,00; 628,00) * #	294,00 (164,00; 397,00) * #
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) * #	3,14 (3,00; 4,00) *	2,50 (1,00; 3,00) * #	2,35 (1,00; 3,00) * #

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. ЭК – экспериментальный колит, КKM – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота, TDI – tissue damage index.

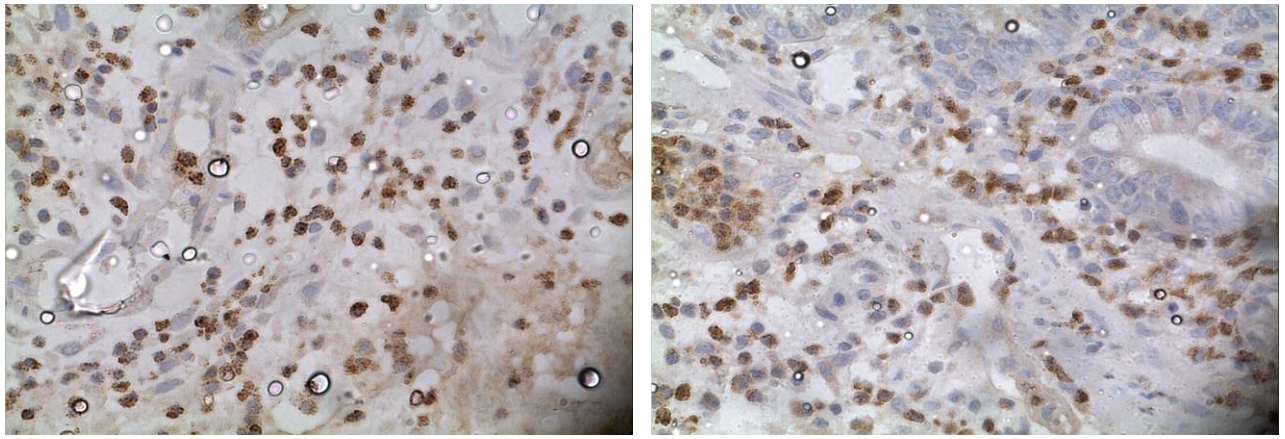
Таким образом, проведенный анализ позволил говорить при экспериментальном колите о сопоставимости клинических и морфологических параметров на 5 и 7 сутки наблюдения при применении ректальных суппозиториях с экстракта куркумы и ректальных суппозиториях 5-АСК. Максимальный эффект как экстракта куркумы, так и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях был зафиксирован нами также на 5 и 7 сутки эксперимента, когда клинические и морфологические признаки заболевания были максимально выражены. Однако, протекторный эффект экстракта куркумы в виде ограничения инфильтрации нейтрофилами, эозинофилами, лимфоцитами, деструкции тканей кишечника и активации репаративных процессов был зафиксирован уже на 3 сутки экспериментального колита.

5.2 - Изменения параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториях с 5-аминосалициловой кислотой

При исследовании количественного состава лейкоцитов в крови выявлено, что применение ректальных суппозиториях с 5-АСК при экспериментальном колите приводит на 3 сутки к снижению количества лейкоцитов преимущественно за счет лимфоцитов, на 5 сутки – к снижению количества лейкоцитов за счет лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов, на 7 сутки - к снижению количества лейкоцитов преимущественно за счет лимфоцитов (таблица 39). Отметим, что общее количество лейкоцитов и количество лимфоцитов в крови на 3, 5 и 7 сутки эксперимента не отличалось от значений в группе интактных животных, количество сегментоядерных нейтрофилов и общее количество нейтрофилов на 3 и 7 сутки не отличалось от значений в группе интактных животных, а на 5 сутки было выше, количество моноцитов в крови на 3 и 5 сутки наблюдения было выше по сравнению с группой интактных

животных. При сравнении количественного состава лейкоцитов в крови при экспериментальном колите на фоне применения 5-АСК и на фоне применения экстракта куркумы обнаружены значимые отличия только в отношении количества моноцитов в крови на 3 сутки эксперимента, оно было выше в группе при применении 5-АСК, остальные параметры были сопоставимы. Применение ректальных суппозиториев с 5-АСК при экспериментальном колите изменяет функциональную активность нейтрофилов крови (таблица 40). Так, на 3 сутки наблюдения снижается активность фагоцитоза, интенсивность фагоцитоза, фагоцитарное число, на 5 и 7 сутки снижается активность фагоцитоза и фагоцитарное число. Причем, по сравнению с группой интактных животных имеются значимые отличия по активности фагоцитоза на 5 сутки, по интенсивности фагоцитоза и фагоцитарному числу – во все сроки наблюдения. По сравнению с группой крыс с экспериментальным колитом на фоне локального применения экстракта куркумы наблюдается более выраженное снижение активности фагоцитоза на 5 и 7 сутки, интенсивности фагоцитоза – уже на 3 сутки, что подтверждается статистически значимыми отличиями между группами. При экспериментальном колите в условиях локального применения ректальных суппозиториев с 5-АСК на 3 сутки снижается интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста, активность индуцированного НСТ-теста, функциональный резерв нейтрофилов, оцениваемый по активности НСТ-теста, на 5 сутки уменьшается активность спонтанного и индуцированного НСТ-теста, интенсивность спонтанного НСТ-теста, а также функциональный резерв нейтрофилов, оцениваемый по активности и интенсивности НСТ-теста, на 7 сутки наблюдения снижается активность и интенсивность спонтанного и индуцированного НСТ-теста (таблица 40). Все параметры НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов на 3 сутки, а также активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста на 5 сутки и активность спонтанного НСТ-теста на 7 сутки статистически значимо отличаются от группы интактных животных. Достоверные отличия с группой крыс с экспериментальным колитом на фоне

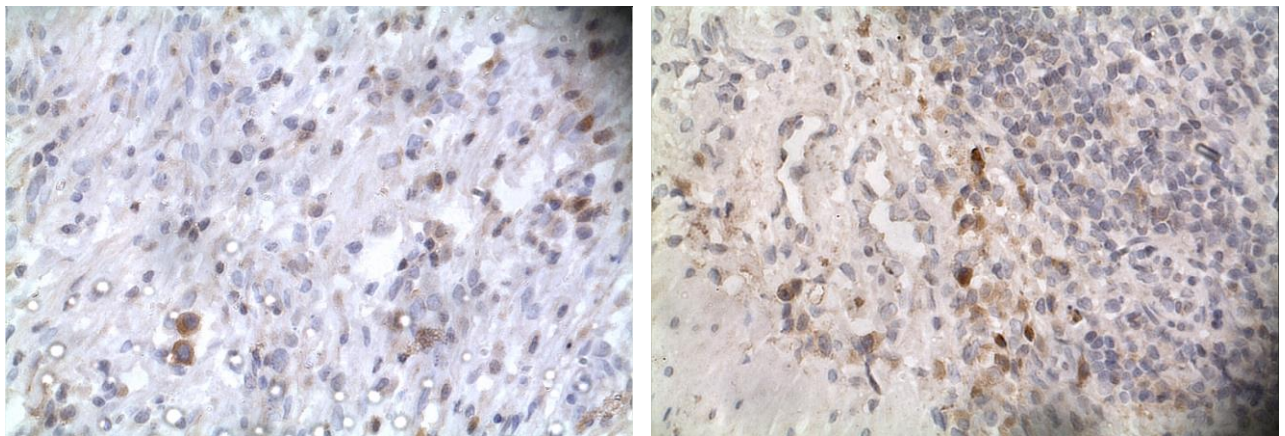
применения экстракта куркумы отмечены на 3 сутки применительно к интенсивности спонтанного и активности индуцированного НСТ-теста, а также функционального резерва нейтрофилов, оцениваемого по интенсивности НСТ-теста, на 5 и 7 сутки к активности индуцированного НСТ-теста. С учетом данных об изменении количественного состава лейкоцитов в крови, функциональной активности нейтрофилов крови, а также представленных ранее сведениях о цитокиновой регуляции иммунного ответа при экспериментальном колите и эффектах экстракта куркумы на иммунологические параметры при ВЗК на следующем этапе проведена оценка концентрации в сыворотке IL-23 и локального содержания в стенке толстого кишечника TNF- α и МПО при экспериментальном колите в условиях локального применения 5-АСК. Прежде всего отметим, что локальное применение 5-АСК приводит к снижению в сыворотке концентрации IL-23 на 3, 5 и 7 сутки наблюдения (таблица 41). На 3 сутки значение данного параметра не отличается, а на 5 и 7 сутки статистически значимо выше значений в группе интактных животных. Отличия с группой животных с экспериментальным колитом на фоне локального применения экстракта куркумы наблюдаются на 3 сутки эксперимента, когда эффект 5-АСК более выражен и приводит к полному восстановлению концентрации IL-23, на 5 и 7 сутки значимых отличий не обнаружено. При оценке содержания TNF- α (рисунок 39) и МПО (рисунок 38) в клеточных популяциях ткани толстого кишечника в условиях локального применения 5-АСК выявлено, что на 5 и 7 сутки данные параметры достоверно снижаются по сравнению с группой крыс с экспериментальным колитом (таблица 42). На 3, 5 и 7 сутки содержание TNF- α и МПО в толстом кишечнике значимо выше, чем в группе интактных животных, что констатирует их частичное восстановление. Значимые отличия по сравнению с группой экспериментального колита на фоне локального применения экстракта куркумы на 3, 5 и 7 сутки в отношении содержания МПО и на 3 и 7 сутки в отношении содержания TNF- α не зафиксированы, содержание TNF- α на 5 сутки выше в группе экспериментального колита с применением 5-АСК.



а)

б)

Рисунок 38 – Иммуногистохимическое выявление МПО: а) на 5 сутки экспериментального колита при применении экстракта куркумы (окраска ДАБ-гематоксилин, ув. X400): б) на 5 сутки экспериментального колита при применении 5-АСК



а)

б)

Рисунок 39 – Иммуногистохимическое выявление TNF- α : а) на 5 сутки экспериментального колита при применении экстракта куркумы (окраска ДАБ-гематоксилин, ув. X400): б) на 5 сутки экспериментального колита при применении 5-АСК

Таблица 39 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на количественный состав лейкоцитов в крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели, 10 ⁹ /л	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Лейкоциты	6,00 (4,00; 6,00)	7,15 (6,20; 7,70) *	8,77 (6,50; 9,90) *	8,00 (6,00; 8,00) *	5,55 (5,20; 5,70) #	5,99 (5,40; 6,60)	5,40 (4,70; 5,80) #	5,70 (4,60; 7,10) #	6,20 (4,50; 6,40) #	6,05 (4,20; 7,60) #
ПЯН	0,03 (0,00; 0,05)	0	0,09 (0,03; 0,13)	0,03 (0,00; 0,05)	0 (0; 0,06)	0	0	0	0,02 (0; 0,06)	0,03 (0; 0,03)
СЯН	1,35 (0,96; 1,47)	1,48 (1,48; 1,67)	3,13 (1,88; 3,65) *	1,35 (0,96; 1,47)	1,20 (1,07; 1,70)	1,93 (1,60; 2,30) * #	1,60 (0,89; 1,73)	1,13 (1,06; 1,17)	1,99 (1,43; 2,18) * #	1,77 (1,63; 2,69)
НФ	1,35 (0,99; 1,53)	1,48 (1,48; 1,67)	3,20 (1,96; 3,74) *	1,35 (0,99; 1,53)	1,48 (1,48; 1,70)	2,01 (1,65; 2,44) * #	1,60 (0,89; 1,73)	1,13 (1,06; 1,40)	2,06 (1,49; 2,18) * #	1,84 (1,12; 2,17)
ЭФ	0 (0; 0,04)	0,05 (0; 0,05) *	0	0 (0; 0,04)	0,05 (0; 0,06)	0	0,07 (0,05; 0,08) *	0	0,06 (0,04; 0,13) *	0
БФ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ЛЦ	3,88 (3,04; 4,25)	4,93 (3,24; 5,98) *	4,89 (1,97; 6,01) *	5,88 (5,04; 6,25) *	3,93 (3,25; 4,99) * #	3,40 (1,90; 4,99) #	3,42 (3,05; 3,84) #	3,99 (2,48; 5,04) #	3,79 (2,3; 4,15) #	3,60 (3,60; 3,90) #
МЦ	0,24 (0,21; 0,27)	0,64 (0,51; 1,14) *	0,58 (0,29; 0,77) *	0,24 (0,21; 0,27)	0,23 (0,22; 0,37) #	0,55 (0,41; 0,84) *	0,34 (0,22; 0,37)	0,57 (0,46; 0,99) * &	0,45 (0,43; 0,50) *	0,33 (0,33; 0,41)

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2, & - с группой 3; ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы, НФ – нейтрофилы, ЭФ – эозинофилы, БФ – базофилы, ЛЦ – лимфоциты, МЦ – моноциты, ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 40 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на функциональную активность нейтрофилов крови при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 (n=7)	Группа 2 3 сутки (n=7)	Группа 2 5 сутки (n=7)	Группа 2 7 сутки (n=7)	Группа 3 3 сутки (n=7)	Группа 3 5 сутки (n=7)	Группа 3 7 сутки (n=7)	Группа 4 3 сутки (n=7)	Группа 4 5 сутки (n=7)	Группа 4 7 сутки (n=7)
АФ, %	36,0 (32,0; 40,0)	52,0 (44,0; 54,0) *	58,5 (45,0; 64,0) *	43,0 (38,0; 67,0) *	44,0 (33,0; 53,0) * #	58,0 (45,0; 64,0) *	44,5 (38,0; 65,0) *	36,0 (36,0; 64,0) #	48,0 (46,0; 54,0) * # &	40,5 (33,0; 43,0) &
ИФ, у.е.	0,68 (0,6; 0,8)	3,85 (3,63; 3,85) *	6,99 (6,37; 12,16) *	5,78 (3,65; 10,80) *	2,83 (1,92; 3,16) * #	6,50 (6,37; 12,16) *	4,89 (3,64; 5,97) * #	1,68 (1,46; 6,60) * # &	8,18 (5,92; 8,92) *	5,94 (3,53; 7,34) *
ФЧ, у.е.	1,88 (1,90; 2,00)	7,10 (7,10; 7,50) *	14,15 (14,15; 19,0) *	13,40 (9,60; 16,10) *	5,90 (5,80; 6,10) * #	4,20 (14,2; 19,0) * #	9,20 (9,2; 11,0) * #	6,08 (4,05; 10,31) * #	6,05 (4,8; 8,6) * #	8,85 (4,5; 9,1) * #
НСТ-тест спонт., акт-ть, %	4,0 (4,0; 5,0)	10,0 (10,0; 10,0) *	15,0 (15,0; 16,0) *	8,5 (2,0; 12,0)	8,5 (8,0; 12,0) *	9,0 (4,0; 10,0) * #	5,5 (5,0; 9,0) #	8,00 (7,0; 11,0) *	9,0 (9,0; 9,0) * #	5,0 (5,0; 8,0) * #
НСТ-тест спонт., инт-ть, у.е.	0,06 (0,05; 0,07)	0,17 (0,15; 0,17) *	0,19 (0,19; 0,20) *	0,09 (0,02; 0,12)	0,13 (0,13; 0,17) *	0,10 (0,06; 0,14) * #	0,05 (0,05; 0,09)	0,09 (0,09; 0,12) * # &	0,11 (0,11; 0,11) * #	0,05 (0,05; 0,08) #
НСТ-тест инд., акт-ть, %	5,0 (4,0; 6,0)	21,5 (8,0; 22,0) *	8,5 (8,0; 12,0)	10,0 (7,0; 16,0) *	7,0 (7,0; 9,0) * #	6,5 (3,0; 13,0) * #	9,0 (7,0; 10,0) *	13,5 (9,0; 16,0) * # &	4,0 (2,0; 10,0) # &	7,0 (3,0; 8,0) # &
НСТ-тест инд., инт-ть, у.е.	0,06 (0,06; 0,06)	0,26 (0,10; 0,26) *	0,07 (0,05; 0,19)	0,11 (0,07; 0,16) *	0,11 (0,11; 0,11) * #	0,07 (0,05; 0,19)	0,09 (0,08; 0,11) *	0,19 (0,14; 0,25) * #	0,05 (0,02; 0,13)	0,07 (0,03; 0,1) #
ФР (акт-ть НСТ-теста)	1,25 (0,80; 1,50)	1,97 (1,33; 2,20) *	1,60 (1,18; 2,00) *	1,47 (0,58; 5,50)	0,81 (0,56; 0,88) * #	0,76 (0,2; 0,86) * #	1,58 (0,88; 2,00) *	1,12 (1,12; 2,29) #	0,66 (0,22; 1,11) * #	1,40 (0,37; 1,60)
ФР (инт-ть НСТ-теста)	1,00 (0,85; 1,00)	1,52 (1,52; 1,6) *	1,60 (1,15; 2,00) *	1,39 (0,58; 1,50)	0,85 (0,65; 0,85) * #	0,78 (0,26; 1,00) #	1,68 (0,88; 2,20) * #	1,56 (1,56; 2,78) * &	0,71 (0,18; 1,18) * #	1,60 (0,37; 2,00) *

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # – с группой 2, & – с группой 3; АФ – активность фагоцитоза, ИФ – интенсивность фагоцитоза, ФЧ – фагоцитарное число, ФР – функциональный резерв, ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 41 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на концентрацию IL-23 в сыворотке (пг/мл) при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
IL-23, пг/мл	32,16 (28,95; 43,42)	75,52 (65,94; 85,24) *	71,57 (59,51; 73,18) *	86,04 (78,81; 91,67) *	40,21 (11,26; 45,84) * #	32,16 (22,52; 48,25) * #	35,62 (25,66; 44,81) * #	34,58 (25,73; 44,23) # &	31,01 (22,16; 43,88) * #	35,84 (23,32; 49,05) * #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2, & - с группой 3; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 42 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на содержание миелопероксидазы и туморнекротического фактора-альфа в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Миело- пероксидаза, 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) * #	1187,73 (814,17; 1561,31) *	291,95 (136,39; 387,73) * #	220,31 (172,41; 287,35) * #
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) * #	785,44 (660,91; 909,96) *	622,61 (478,92; 842,91) * # &	201,14 (134,09; 287,35) * #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2, & - с группой 3; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таким образом, локальное применение 5-АСК в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном колите приводило к снижению количества в крови и полному восстановлению во все сроки наблюдения общего количества лейкоцитов, а также количества лимфоцитов, частичному восстановлению количества нейтрофилов на 5 сутки наблюдения, снижению и частичному восстановлению поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови. Эффект ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы сопоставим с действием ректальных суппозиториях с 5-АСК при экспериментальном колите в отношении общего количества лейкоцитов, количества лимфоцитов и моноцитов в крови, но более выражен в отношении восстановления поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови во все сроки наблюдения.

5.3 - Изменения параметров адаптивного иммунитета в крови при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториях с 5-аминосалициловой кислотой

Прежде всего, отметим, что применение 5-АСК в составе суппозиториях при экспериментальном колите приводит к изменению количества субпопуляций лимфоцитов в крови: на 3 сутки достоверных изменений содержания CD3⁺ и CD45RA⁺ не зафиксировано, на 5 и 7 сутки статистически значимо снижается количество CD3⁺ лимфоцитов, количество CD45RA⁺ не изменяется (таблица 43). Отметим, что во все сроки наблюдения количество CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов достоверно не отличается от соответствующих параметров в группе интактных животных, а также в группе животных с экспериментальным колитом в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы.

На фоне снижения количества в крови CD3⁺ лимфоцитов нами обнаружено изменение содержания на лимфоцитах крови маркеров апоптоза и некроза в

условиях локального применения 5-АСК при экспериментальном колите (таблица 44). На 3, 5 и 7 сутки наблюдения в крови увеличивается количество лимфоцитов с ранними признаками, поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток и как следствие снижается количество интактных лимфоцитов. Все указанные параметры гибели лимфоцитов во все сроки эксперимента значимо отличаются от группы интактных животных, то есть восстанавливаются частично, и не отличаются от группы животных с экспериментальным колитом в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы.

Полагаем, что при применении 5-АСК в составе ректальных суппозиториев при экспериментальном колите снижение количества лимфоцитов в крови, в том числе $CD3^+$, обусловлено как снижением их образования в костном мозге в условиях ограничения синтеза стимулирующих пролиферацию клеток лимфоидного ряда цитокинов в очаге повреждения, так и увеличением гибели лимфоцитов в крови путем некроза и апоптоза.

При оценке концентрации в сыворотке иммуноглобулинов выявлено снижение уровня IgM и IgG на 3, 5 и 7 сутки экспериментальном колите в условиях локального применения 5-АСК (таблица 45). Показательно, что концентрация IgM в сыворотке значимо не отличалась от значений в группе интактных животных во все сроки наблюдения, а концентрация IgG – превышала их, что говорит о частичном восстановлении IgG в сыворотке и полном - IgM при применении 5-АСК. Отметим, что во все сроки наблюдения уровни в сыворотке IgM и IgG статистически значимо не отличались от таковых в группе животных с экспериментальным колитом в условиях применения экстракта куркумы.

Таблица 43 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториев на субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
CD3 ⁺ лимфоциты, • 10 ⁹ /л	3,38 (2,45; 4,84)	4,25 (3,64; 4,83)	4,97 (3,76; 8,15) *	4,62 (3,57; 5,67) *	3,29 (2,61; 4,31) #	3,63 (2,54; 4,71) #	3,65 (3,28; 4,21) #	3,84 (1,72; 5,16)	2,56 (1,22; 3,31) #	2,53 (0,96; 3,19) #
CD45RA ⁺ лимфоциты • 10 ⁹ /л	1,56 (1,49; 1,88)	1,14 (0,88; 1,74)	1,14 (1,18; 2,26)	2,18 (1,16; 3,52) *	1,39 (0,24; 2,31)	1,72 (1,57; 2,31)	1,89 (1,15; 2,82)	1,05 (0,21; 1,91)	1,81 (0,77; 2,02)	1,73 (1,39; 1,96)

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 44 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на параметры гибели лимфоцитов при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Annexin-5- FITC-/7- AAD-, %	92,57 (91,29; 93,87)	89,18 (86,17; 89,97) *	86,35 (82,23; 88,76) *	83,94 (81,67; 86,27) *	78,79 (76,34; 79,36) * #	74,52 (74,33; 74,93) * #	70,07 (67,85; 72,47) * #	79,61 (73,92; 89,52) * #	72,54 (56,38; 67,63) * #	71,88 (66,05; 82,84) * #
Annexin-5- FITC+/7- AAD-, %	5,91 (4,94; 7,22)	10,28 (9,01; 11,12) *	11,05 (10,84; 16,63) *	14,69 (13,26; 17,21) *	18,91 (17,33; 19,97) * #	23,74 (23,12; 25,21) * #	27,75 (22,01; 30,01) * #	17,06 (12,28; 22,21) * #	25,53 (28,57; 29,56) * #	24,21 (19,37; 33,89) * #
Annexin-5- FITC+/7- AAD+, %	0,48 (0,21; 0,94)	0,35 (0,05; 0,41)	1,01 (0,42; 1,59) *	0,62 (0,38; 1,01) *	1,71 (0,98; 2,34) * #	0,98 (0,32; 1,23) * #	1,75 (0,69; 2,71) * #	1,57 (1,18; 3,97) * #	0,97 (0,42; 2,81) * #	2,51 (1,96; 3,07) * #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 45 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на концентрацию иммуноглобулинов в крови при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Иммуно- глобулин G, нг/мл	3,05 (3,02; 3,22)	17,11 (17,11; 21,17) *	26,93 (23,66; 28,07) *	11,22 (5,15; 18,46) *	7,27 (2,84; 7,88) * #	9,96 (6,94; 21,27) * #	5,26 (3,37; 8,41) * #	6,66 (6,14; 6,92) * #	9,19 (8,23; 9,54) * #	6,31 (5,61; 7,27) * #
Иммуно- глобулин M, нг/мл	10,89 (8,85; 11,69)	17,64 (12,71; 28,22) *	20,81 (20,11; 22,93) *	17,99 (13,96; 21,87) *	10,69 (9,11; 11,95) #	7,99 (7,01; 8,71) #	10,89 (10,43; 11,29) #	10,87 (6,61; 21,81) #	9,83 (6,06; 10,41) #	11,22 (6,73; 11,82) #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Механизм влияния 5-АСК при экспериментальном колите на параметры адаптивного иммунитета до конца не ясен, несмотря на значительное количество публикаций и применение данного вещества в составе различных лекарственных форм в клинической практике. Одна из ключевых гипотез предполагает снижает синтеза АФК, метаболитов арахидоновой кислоты, ферментов и цитокинов преимущественно клетками врожденного иммунитета в стенке кишечника, что ограничивает площадь альтерации и последующую активацию пролиферации лимфоидных клеток, дифференцировку и активацию [222, 292].

Таким образом, нами продемонстрировано, что при экспериментальном колите эффект экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториях сопоставим с действием 5-АСК в составе ректальных суппозиториях по количеству в крови лимфоцитов CD3⁺ и CD45RA⁺, параметрам гибели лимфоцитов в крови путем апоптоза и некроза (количеству лимфоцитов с ранними признаками, поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток), концентрации в сыворотке IgM и IgG.

5.4 - Изменения параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториях с 5-аминосалициловой кислотой

Антиоксидантные свойства 5-АСК при экспериментальном колите в условиях перорального или ректального применения описаны в доступной литературе и связывают, прежде всего, с угнетением генерации АФК фагоцитирующими клетками в стенке кишечника – нейтрофилами и моноцитами/макрофагами [130, 241]. На данном этапе исследования нас интересовал не сам факт влияния 5-АСК на содержание продуктов ПОЛ и ОМБ в очаге повреждения кишечника, а сравнительный анализ данных параметров с

эффектом локального применения экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториях для оценки сопоставимости антиоксидантного действия 5-АСК и экстракта куркумы. Для экстракта куркумы прямое или опосредованное влияние на редокс-статус в условиях *in vitro*, *in vivo*, в клинических условиях при различной патологии также описано во многих источниках и было представлено в главе 1, а при экспериментальном колите продемонстрировано в разделе 3.4 главы 3.

Применение при экспериментальном колите ректальных суппозиториях с 5-АСК снижает содержания продуктов ПОЛ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника. На 3 сутки наблюдения уменьшалось количество первичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, первичных и вторичных продуктов в изопропанольной фазе, на 5 сутки – снижалось количество первичных продуктов в изопропанольной фазе, на 7 сутки – первичных, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе липидного экстракта (таблицы 46, 47). Анализ содержания продуктов ПОЛ в группах 1 и 4 позволяет констатировать на фоне локального применения 5-АСК при экспериментальном колите их снижение и частичное восстановление: на 3 сутки первичных продуктов в гептановой фазе, вторичных продуктов в изопропанольной фазе, на 5 сутки - первичных продуктов в изопропанольной фазе, на 7 сутки – первичных, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе, а также выраженное восстановление уровня первичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе на 3 сутки. Наиболее выраженный ПОЛ-ограничивающий эффект 5-АСК в толстом кишечнике зафиксирован в изопропанольной фазе липидного экстракта на 3 и 7 сутки эксперимента, что позволяет констатировать цитопротекторное действие в отношении фосфолипидов клеточных мембран.

При сравнении содержания продуктов ПОЛ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториях с 5-АСК и экстрактом куркумы нами не

обнаружено значимых отличий по уровню первичных, вторичных и конечных продуктов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта.

Результаты оценки содержания продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки области повреждения толстого кишечника в спонтанном и металл-индуцированном режимах при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиторий с 5-АСК представлены в таблицах 48, 49. При анализе параметров ОМБ в спонтанном режиме выявлено, что на 3, 5 и 7 сутки эксперимента значительно снижается общее содержание карбонильных производных белков, в том числе АДНФГ и КДНФГ, регистрируемых как в области УФ-света, так и в области видимого света спектра. При интегративном анализе видно, что снижается суммарное содержание АДНФГ и КДНФГ, а также суммарное количество производных нейтрального характера (АДНФГ и КДНФГ в области УФ-света спектра) и производных основного характера (АДНФГ и КДНФГ в области видимого света спектра). При этом, доля относительного содержания АДНФГ, относительного содержания КДНФГ, а также относительного количества карбонильных производных нейтрального характера и основного характера статистически значимо не изменяется.

Таблица 46 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на содержание продуктов перекисного окисления липидов в гептановой фазе гомогената слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Диеновые конъюгаты, е.и.о.	0,63 (0,55; 0,65)	0,79 (0,79; 0,81) *	0,66 (0,66; 0,68)	0,75 (0,74; 0,81) *	0,79 (0,77; 0,82) *	0,61 (0,61; 0,64)	0,72 (0,71; 0,73) * #	0,73 (0,72-0,85) * #	0,63 (0,61; 0,63)	0,74 (0,68; 0,77) *
Кетодиены и сопряженные триены, е.и.о.	0,06 (0,05; 0,06)	0,09 (0,06; 0,09) *	0,17 (0,17; 0,18) *	0,07 (0,06; 0,09)	0,08 (0,06; 0,08)	0,17 (0,16; 0,17) *	0,06 (0,05; 0,07)	0,09 (0,06; 0,09)	0,15 (0,15; 0,16) *	0,06 (0,06; 0,06)
Основания Шиффа, е.и.о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,01 (0,01; 0,01)	0,02 (0,01; 0,02)	0,03 (0,03; 0,04) *	0,03 (0,03; 0,03)	0,02 (0,01; 0,02)	0,03 (0,02; 0,03) *	0,02 (0,01; 0,02)	0,01 (0,01; 0,01)	0,02 (0,01; 0,02)

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 47 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на содержание продуктов перекисного окисления липидов в изопропанольной фазе гомогената слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Me(Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
Диеновые конъюгаты, е.и.о.	0,34 (0,32; 0,36)	0,38 (0,38; 0,45) *	0,53 (0,52; 0,57) *	0,43 (0,41; 0,45) *	0,35 (0,33; 0,42) #	0,49 (0,47; 0,52) * #	0,39 (0,38; 0,41) *	0,32 (0,17; 0,45) #	0,49 (0,48; 0,51) * #	0,36 (0,36; 0,38) #
Кетодиены и сопряженные триены, е.и.о.	0,31 (0,29; 0,32)	0,61 (0,61; 0,71) *	0,41 (0,38; 0,41) *	0,51 (0,51; 0,55) *	0,64 (0,56; 0,71) *	0,34 (0,30; 0,39) *	0,41 (0,41; 0,44) * #	0,54 (0,49; 0,69) # *	0,36 (0,34; 0,40) *	0,36 (0,33; 0,39) * #
Основания Шиффа, е.и.о.	0,01 (0,01; 0,02)	0,08 (0,08; 0,11) *	0,01 (0,00; 0,01)	0,14 (0,12; 0,14) *	0,08 (0,06; 0,09) *	0,01 (0,01; 0,01)	0,09 (0,08; 0,11) * #	0,06 (0,00; 0,15) *	0,00 (0,00; 0,01)	0,07 (0,06; 0,07) * #

Примечание: * – значимые (p<0,05) различия с группой 1, # - с группой 2; ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 48 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на параметры спонтанной окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
S _{АДНФГ UV} , у.е./мг белка	151,21 (128,47; 158,35)	283,62 (216,12; 291,47) *	150,17 (148,52; 161,95)	345,15 (298,16; 400,92) *	108,38 (107,82; 147,68) * #	157,42 (81,95; 162,61)	186,62 (182,19; 254,38) * #	120,97 (100,55; 136,57) * #	98,95 (78,95; 192,49) * #	201,97 (185,83; 206,83) * #
S _{АДНФГ VS} , у.е./мг белка	5,03 (4,43; 5,14)	14,19 (13,25; 15,21) *	7,76 (7,53; 8,38) *	16,08 (15,93; 32,03) *	6,63 (5,26; 7,19) #	6,45 (3,71; 7,19)	13,41 (12,78; 13,81) * #	6,81 (5,29; 8,51) #	4,03 (4,03; 7,05) #	12,02 (11,98; 12,63) * #
S _{КДНФГ UV} , у.е./мг белка	9,45 (8,29; 9,81)	19,77 (18,28; 26,67) *	15,31 (14,83; 16,61) *	29,84 (28,85; 51,81) *	11,77 (8,33; 13,03) #	12,54 (6,85; 13,45) #	23,64 (22,62; 25,06) * #	12,27 (9,83; 14,96) * #	7,49 (7,22; 14,64) #	22,17 (20,99; 22,41) * #
S _{КДНФГ VS} , у.е./мг белка	0,67 (0,65; 0,68)	1,59 (1,38; 1,91) *	0,89 (0,87; 0,93) *	2,43 (2,21; 4,25) *	0,81 (0,78; 1,04) * #	0,63 (0,44; 0,91) #	1,74 (1,64; 1,94) * #	0,85 (0,62; 1,37) * #	0,45 (0,45; 0,82) #	1,76 (1,61; 1,97) * #
S _{ОМБ} спонт., у.е./мг белка	141,86 (136,04; 166,74)	324,21 (313,48; 340,93) *	185,88 (170,67; 242,59) *	392,31 (272,17; 497,71) *	128,31 (122,75; 167,69) #	177,97 (92,96; 183,28) *	225,42 (219,84; 257,96) * #	140,64 (116,31; 163,92) #	110,94 (90,27; 170,41) * #	221,84 (221,84; 239,01) * #
S _{АДНФГ} , у.е./мг белка	132,91 (124,19; 156,25)	302,83 (293,81; 312,35) *	169,72 (157,23; 222,68)	432,96 (361,24; 470,71) *	114,46 (113,64; 154,88) #	163,87 (85,66; 169,81)	199,48 (195,38; 231,15) * #	127,59 (105,85; 147,27) #	102,99 (82,42; 161,32) #	197,81 (185,31; 206,48) * #

Продолжение таблицы 48

S _{кДНФГ} , у.е./мг белка	10,23 (8,94-10,49)	21,37 (19,66- 28,57) *	16,16 (14,61- 18,61) *	31,95 (31,05- 58,21) *	12,81 (9,11-13,84) #	13,46 (7,31-14,09) #	25,33 (24,46- 26,81) * #	13,04 (10,45- 16,65) #	7,95 (7,95-7,95) #	23,94 (22,82- 24,03) * #
% АДНФГ	93,71 (93,69; 93,71)	92,59 (91,61; 93,41)	91,43 (91,31; 92,51) *	89,13 (88,99; 90,02) *	91,28 (91,19; 92,35)	92,62 (92,14; 92,65)	88,89 (87,96; 92,03) *	89,83 (89,44; 89,93) *	92,82 (92,82; 92,82)	88,71 (87,62; 89,16) *
% КДНФГ	6,29 (6,29; 6,31)	7,41 (6,59; 8,38)	8,56 (7,49; 8,69) *	11,02 (10,93; 11,12) *	8,17 (7,53; 8,76)	7,37 (7,34; 7,85)	11,29 (10,96; 12,03) *	10,08 (10,04; 10,24) *	7,17 (7,17; 7,17)	10,83 (10,41; 11,28) *
S _{ув} , у.е./мг белка	161,03 (136,76; 167,81)	311,25 (301,91; 324,83) *	162,24 (161,97; 177,26)	374,01 (254,37; 461,42) *	120,86 (116,71; 159,45) * #	170,88 (88,81; 175,16)	210,92 (204,81; 242,81) * #	140,86 (125,63; 162,21) * #	106,45 (106,45; 205,21) * #	208,24 (208,24; 223,91) * #
S _{vs} , у.е./мг белка	5,71 (5,09; 5,92)	12,95 (11,57; 16,09) *	8,43 (7,98; 8,62) *	27,33 (18,33; 40,52) *	7,44 (6,04; 8,24) * #	7,08 (4,15; 8,11)	15,15 (14,47; 15,71) * #	9,14 (6,21; 15,63) * #	4,49 (4,19; 9,43) #	13,84 (13,59; 15,09) * #
% _{ув}	96,57 (96,41; 96,58)	95,57 (95,27; 96,01)	95,29 (95,13; 95,36)	92,88 (92,72; 93,59) *	94,53 (94,19; 95,07)	95,57 (95,53; 96,01)	93,33 (92,51; 93,81) *	93,91 (93,87; 94,25) *	95,94 (95,94; 95,94)	93,68 (93,46; 93,87) *
% _{vs}	3,42 (3,41; 3,59)	4,42 (3,99; 4,72)	4,71 (4,63; 4,86)	7,11 (6,41; 7,27) *	5,46 (4,92; 5,81)	4,42 (3,98; 4,46)	6,66 (6,19; 7,49) *	6,09 (5,74; 6,12) *	4,05 (4,05; 4,05)	6,31 (6,12; 6,53) *

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2. S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, uv – ультрафиолет, vs – видимый свет, ОМБ – окислительная модификация белков, ЭК – экспериментальный колит, КKM – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

Таблица 49 – Влияние куркумина и 5-АСК в составе ректальных суппозиториев на параметры металл-зависимой окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры, у.е./мг белка	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
S _{аднфг} uv, у.е./мг белка	202,95 (202,95; 205,68)	313,07 (311,25; 347,79) *	316,74 (293,11; 326,78) *	464,16 (416,31; 585,37) *	174,37 (168,04; 242,01) * #	256,57 (168,94; 295,41) * #	351,71 (342,29; 359,21) * #	289,74 (262,29; 333,85) * # &	222,56 (201,76; 229,76) * #	373,41 (314,19; 437,98) * #
S _{аднфг} vs, у.е./мг белка	25,94 (25,22; 25,94)	32,25 (32,02; 32,82) *	61,99 (51,39; 70,35) *	89,52 (77,11; 107,87) *	23,07 (22,04; 26,52) #	48,67 (39,33; 54,16) * #	68,03 (65,53; 73,08) * #	48,11 (44,66; 77,73) * # &	51,91 (41,07; 61,12) * #	75,23 (66,86; 83,05) * #
S _{кднфг} uv, у.е./мг белка	33,94 (33,55; 33,95)	42,42 (41,01; 43,42) *	71,12 (60,14; 80,76) *	107,81 (98,51; 128,56) *	30,61 (27,41; 32,31) #	54,88 (45,02; 63,33) * #	82,41 (79,24; 87,29) * #	60,61 (33,91; 73,04) * #	68,64 (48,49; 69,68) *	91,86 (83,05; 94,44) * #
S _{кднфг} vs, у.е./мг белка	3,35 (3,35; 3,41)	4,46 (4,16; 4,46) *	6,72 (5,84; 8,98) *	12,94 (11,62; 13,31) *	3,16 (3,02; 3,63) #	6,31 (4,81; 6,81) *	8,34 (8,12; 9,23) * #	5,86 (3,67; 9,62) *	6,49 (5,02; 7,75) *	8,36 (5,91; 9,12) * #
S _{ОМБ} индуц., у.е./мг белка	266,21 (266,21; 280,81)	380,93 (373,56; 427,51) *	414,95 (414,94; 486,89) *	662,05 (643,29; 690,09) *	230,16 (226,81; 298,76) * #	366,45 (258,11; 419,71) * #	509,53 (499,98; 549,63) * #	404,33 (263,33; 514,25) *	368,44 (293,67; 374,11) * #	483,21 (479,65; 628,88) * #
S _{аднфг} , у.е./мг белка	228,91 (227,81; 228,91)	340,36 (336,48; 380,61) *	360,77 (346,74; 397,13) *	533,57 (525,35; 585,49) *	196,41 (194,57; 265,09) * #	305,25 (208,28; 349,56) * #	421,11 (412,54; 452,17) * #	337,85 (204,91; 411,59) * &	265,31 (221,96; 320,31) * #	385,24 (352,64; 448,85) * #
S _{кднфг} , у.е./мг белка	37,31 (37,07; 37,31)	46,88 (45,16; 47,88) *	68,19 (64,65; 89,75) *	135,03 (123,99; 159,56) *	34,63 (32,03; 37,67) #	61,21 (49,83; 70,14) * #	91,22 (90,26; 101,71) * #	66,48 (39,58; 72,66) * #	65,11 (53,19; 76,91) *	102,79 (96,19; 107,16) * #

% АДНФГ	86,94 (85,98; 88,02)	89,34 (89,03; 90,07)	81,56 (81,56; 83,56) *	81,15 (81,01; 83,48) *	86,61 (85,32; 88,64) #	81,53 (80,69; 83,28) *	82,48 (82,41; 82,79) *	80,03 (79,71; 83,55) * #	79,02 (78,19; 79,58) * #	80,94 (80,33; 81,71) *
% КДНФГ	13,05 (11,97; 14,01)	10,65 (9,92; 10,96)	18,43 (16,43; 18,43) *	18,84 (16,51; 18,99) *	11,31 (11,27; 11,35) *	18,46 (16,71; 19,31) *	17,51 (17,21; 17,59) *	19,96 (10,44; 22,28) * #	20,95 (19,87; 21,01) * #	19,05 (18,29; 19,66) *
S uv, у.е./мг белка	236,91 (236,91; 297,16)	350,11 (344,81; 390,21) *	354,59 (348,42; 407,54) *	527,74 (334,25; 541,24) *	201,77 (200,36; 272,63) * #	358,73 (311,45; 485,09) *	435,25 (426,25; 467,38) * #	350,36 (215,39; 376,89) *	299,06 (249,61; 299,44) *#	540,71 (404,43; 549,02) *
S vs, у.е./мг белка	29,29 (29,29; 29,98)	36,19 (30,83; 36,71) *	60,35 (55,01; 79,34) *	87,26 (52,72; 101,14) *	26,13 (25,02; 29,81) #	60,97 (54,99; 99,59) *	76,38 (73,72; 82,25) * #	53,97 (50,34; 87,36) *# &	68,76 (48,13; 88,99) *#	94,26 (74,36; 113,21) *
% uv	88,99 (88,99; 90,83)	91,91 (91,27; 92,31) *	83,71 (83,71; 85,45) *	84,52 (83,91; 86,37) *	88,48 (87,05; 88,96) #	83,25 (82,89; 84,99) *	85,26 (84,83; 85,76) *	83,01 (82,82; 86,65) *#	81,27 (81,24; 82,12) *	84,31 (82,68; 84,82) *
% vs	11,01 (9,16; 11,01)	8,09 (7,69; 8,72) *	16,29 (14,54; 16,29) *	15,47 (13,62; 16,08) *	8,98 (8,74; 11,51) *	16,74 (15,01; 17,11) *	14,73 (14,23; 15,16) *	16,98 (11,34; 17,17) *#	18,72 (17,87; 18,75) *#	15,68 (15,17; 17,31) *
РАП, %	54,71 (51,53; 56,71)	80,25 (74,89; 87,87) *	45,39 (42,73; 51,97) *	57,15 (50,11; 59,71)	56,25 (53,87; 58,87) #	51,98 (49,89; 53,59) #	45,09 (45,33; 46,73) * #	35,17 (32,32; 57,53) #	55,56 (25,36; 50,34) #	45,27 (39,44; 51,94) * #

Примечание: * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1, # - с группой 2, & - с группой 3. S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, uv – ультрафиолет, vs – видимый свет, ОМБ – окислительная модификация белков, РАП – резервно-адаптационный потенциал, ЭК – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.

При оценке металл-индуцированной ОМБ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника зафиксировано на 5 и 7 сутки экспериментального колита выявлено снижение общего количества продуктов ОМБ, в том числе снижение общего содержания АДНФГ на 5 и 7 сутки, КДНФГ – на 3 и 7 сутки, снижение общего содержания карбонильных производных белков в области УФ-света на 3 сутки, в области видимого света спектра – на 3 и 5 сутки. Однако, доля карбонильных производных значительно снижется в отношении АДНФГ и КДНФГ на 3 и 5 сутки наблюдения, в отношении производных нейтрального характера на 3 сутки, основного характера – на 3 и 5 сутки наблюдения. Выявлено, что резервно-адаптационный потенциал при экспериментальном колите в условиях применения 5-АСК в составе ректальных суппозиториев по суммарному содержанию продуктов ОМБ снижается на 3 и 7 сутки, повышается – на 5 сутки наблюдения. При этом, на 5 сутки он достигает значений в группе интактных животных, а на 3 и 7 сутки – значительно отличается от значений в группе интактных животных.

При сравнении параметров ОМБ в группах с экспериментальным колитом при применении 5-АСК и экстракта куркумы установлено, что в спонтанном режиме все параметры во все сроки наблюдения не имеют значимых отличий между группами, в индуцированном режиме на 3 сутки эксперимента выявлены отличия суммарного содержания АДНФГ, а также содержания АДНФГ нейтрального и основного характера, суммарного содержания карбонильных производных основного характера, эффект 5-АСК более выражен.

Таким образом, параметры содержания продуктов ПОЛ, продуктов ОМБ в спонтанном и металл-индуцированном режимах в гомогенате слизистой оболочки области повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и с 5-АСК сопоставимы.

Список работ, опубликованных по главе 5

1. Афлятунова А.А. Бакеева А.Е. Клинический статус и некоторые показатели врожденного иммунитета при экспериментальной болезни Крона в

условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы длинной // XXVI Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 26 – 27 марта 2020). – Санкт-Петербург, 2020. – С. 34 – 36.

2. Бакеева, А.Е. Влияние спиртового экстракта куркумы длинной в составе ректальных суппозиториев на клинический статус и показатели перекисного окисления липидов при экспериментальной болезни Крона // Актуальные проблемы биомедицины – 2020 : сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020). – Санкт-Петербург, 2020. - С. 36-37.

3. Осиков, М.В. Антиоксидантный эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев оригинального состава при экспериментальной болезни Крона // М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 3. – С. 314 – 319.

4. Осиков, М.В. Влияние экстракта корневищ куркумы длинной в составе ректальных суппозиториев на показатели перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 175. – № 3. – С. 80 – 86.

5. Осиков, М.В. Динамика показателей перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом корневищ куркумы длинной / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64. - № 3. – С. 131 – 136.

6. Осиков, М.В. Иммуотропные эффекты куркумина в составе оригинальных ректальных суппозиториев при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, О.И. Огнева // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 483 – 496.

7. Осиков, М.В. Клинико-иммунологическая характеристика экспериментальной болезни Крона в условиях локального применения экстракта корневищ куркумы длинной / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2020. – Т. 17. - №1. – С. 61 – 71.

8. Осиков, М.В. Эффективность локального применения экстракта куркумы при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 178. – № 6. – С. 133 – 140.

9. Афлятунова А.А., Бивалькевич В.А., Бакеева А.Е. Влияние новой лекарственной формы с экстрактом куркумы на количественный состав лейкоцитов и функциональную активность нейтрофилов крови при экспериментальной болезни Крона // XXV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 28 – 29 марта 2019). – Санкт-Петербург, 2019. – С. 25 – 26.

10. Осиков, М.В. Иммуотропные эффекты экстракта *Curcuma longa* в составе ректальных суппозиториях при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29207> (дата обращения: 23.06.2020).

11. Осиков, М.В. Сравнительный анализ влияния куркумина в составе ректальных суппозиториях на концентрацию IgG и IgM в сыворотке при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, А.Е. Бакеева, М.С. Бойко // Рос. иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22). – № 3. – С. 1235 – 1238.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Распространенность болезней органов пищеварения, их повсеместная увеличивающаяся частота встречаемости оценивается в настоящее время как эпидемия и глобальная медико-социальная проблема [99, 150]. И в мире, и в России показатели заболеваемости болезнями органов пищеварения прогрессивно возрастают, удваиваясь каждое десятилетие [8, 9]. Болезнь Крона наряду с язвенным колитом относят к группе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) неизвестной этиологии, которые характеризуется хроническим воспалением в стенке кишечника и отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) различной глубины, площади и локализации. Несмотря на широкую вариабельность эпидемиологических данных рост заболеваемости ВЗК, в том числе среди молодых социально-активных и трудоспособных лиц, констатируют результаты различных исследований [15, 68]. Повсеместно регистрируется увеличение количества больных с ВЗК [1, 4, 34, 41, 280]. Серьезную проблему при ВЗК составляет широкий спектр кишечных и внекишечных осложнений, увеличивающих финансовые затраты на госпитализацию, хирургическое и амбулаторное лечение.

Патогенез ВЗК до конца не ясен, прежде всего, в связи с широким спектром этиологических факторов, инициирующих активацию клеточных и гуморальных компонентов иммунной системы при участии Th1-, Th2-зависимого иммунного ответа, изменении баланса Th17/Treg. Наряду с цитокинами, ферментами, иммуноглобулинами в запуске и поддержании воспалительного процесса в стенке кишечника имеют значение активные формы кислорода (АФК) и азота, генерируемые активированными нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами, эпителиоцитами особенно в условиях дефицита факторов антиокислительной защиты. При ВЗК АФК и азота, продукты их взаимодействия с белками и липидами могут выступать в роли свидетелей и маркеров повреждения тканей кишечника, отражающих тяжесть течения заболевания, эффективность проводимой терапии, а также служить мишенями для разработки

новых терапевтических подходов регуляции редокс-статуса. В этом отношении при ВЗК представляет интерес изучение взаимосвязи между параметрами системного и локального иммунитета, редокс-статуса в очаге повреждения кишечника и тяжестью клинических проявлений.

Несмотря на широкий спектр терапевтических мероприятий при ВЗК, прежде всего фармакотерапии, их эффективность не превышает 50%, а широкий спектр побочных явлений и высокая стоимость требуют интегративного подхода к данной проблеме и разработки новых, обоснованных с патогенетических позиций и безопасных лекарственных средств преимущественно локального действия [105]. В частности, антиоксидантов растительного происхождения в составе ректальных суппозиториях [255].

С клинико-морфологических позиций нами была проведена верификация одной из наиболее часто используемых экспериментальной моделью колита, индуцируемого ректальным введением спиртового раствора тринитробензолсульфоновой кислоты (ТНБС) в условиях *in vivo* на 210 белых половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 240 ± 20 г. Животные были случайным образом разделены на 4 группы: группа 1 (n=21) – интактный контроль, группа 2 (n=63) – животные с индуцированной патологией, группа 3 (n=63) – животные с индуцированной патологией в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы, группа 4 (n=63) – животные с индуцированной патологией в условиях применения ректальных суппозиториях с 5-АСК.

Интегральная оценка клинической симптоматики по шкале DAI на 3, 5 и 7 сутки эксперимента выявила увеличение частоты дефекаций, снижение плотности и появление крови в каловых массах, снижение массы тела крыс. Морфометрическая оценка очага повреждения в толстом кишечнике выявила наличие язвенных дефектов, отека, густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации с примесью эозинофилов, плазмочитов, гистиоцитов, формирование грануляционной ткани, а также др. признаков, интегрированных в индекс повреждения ткани толстого кишечника (TDI).

При экспериментальном колите, на 3, 5 и 7 сутки наблюдения в крови увеличивается количество лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, растет поглотительная способность и кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови. Повышается концентрация в сыворотке IL-23 – провоспалительного цитокина, одного из ключевых маркеров в патогенезе повреждения стенки кишечника при за счет активации нейтрофилов, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, Th1- и Th17-зависимых реакций. На 3, 5 и 7 сутки в стенке толстого кишечника значимо повышается содержание МПО и TNF- α - ключевых маркеров ВЗК, определяющих вероятность и длительность ремиссии, применяемых для оценки эффективности проводимой терапии. Количество в крови CD3⁺ лимфоцитов статистически значимо увеличивается на 5 и 7 сутки эксперимента, CD45RA⁺ - на 7 сутки экспериментального колита, несмотря на увеличение содержания в крови лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток, что свидетельствует о превалировании лимфопоэз-стимулирующих сигналов над сигналами активации гибели лимфоцитов. Подтверждением роли Th2-зависимых реакций в патогенезе экспериментального колита является повышение концентрации в сыворотке иммуноглобулинов IgM и IgG на 3, 5 и 7 сутки эксперимента.

Участие процессов свободно-радикального окисления в повреждении тканей кишечника при экспериментальном колите зафиксировано нами при оценке содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) в гомогенате слизистой оболочки очага повреждения толстого кишечника. На 3, 5 и 7 сутки отмечено накопление продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе и в гептановой фазе липидного экстракта с преимущественным накоплением продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе. На 3, 5 и 7 сутки в очаге повреждения толстой кишки увеличивается суммарное количество карбонильных производных белков – необратимых продуктов окислительного стресса преимущественно за счет накопления КДФГ, то есть вторичных, поздних продуктов ОМБ по большей части основного характера, что наиболее ярко проявилось на 5 и 7 сутки наблюдения. Оценка содержания

продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки очага повреждения толстого кишечника в металл-индуцированном режиме установила изменение резервно-адаптационного потенциала: его повышение на 3 сутки экспериментального колита и снижение на 5 сутки.

Нами при экспериментальном колите проведен корреляционный анализ между количественным параметром клинической симптоматики (индекс активности болезни, DAI), количественным параметром морфологических признаков повреждения толстого кишечника (TDI) с иммунологическими параметрами в крови и в очаге повреждения толстого кишечника, свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника. При исследовании степени тесноты связи между признаками рассчитывали коэффициент корреляции (R) и, как следствие, меру связи между изучаемыми признаками: $R=0$ -корреляция отсутствует, если $0,09 < R < 0,19$ -статистическая взаимосвязь очень слабая; $0,2 < R < 0,49$ -взаимосвязь слабая; $0,5 < R < 0,69$ -взаимосвязь средняя; $0,70 < R < 0,99$ -взаимосвязь сильная. Коэффициент корреляции может быть положительным и отрицательным, характеризуя направленность связи между двумя признаками, измеренными в ранговой шкале (Гланц С. Медико-биологическая статистика. М. : Практика, 1998. 459 с.). Результаты представлены в таблицах 50, 51.

Во все сроки наблюдения нами не выявлена значимая корреляция между DAI и количеством в крови моноцитов, уровнем оснований Шиффа в гептановой фазе, продуктов ОМБ в ультрафиолетовой части спектра в спонтанном и индуцированном режимах, видимой части спектра в индуцированном режиме в гомогенате толстого кишечника. Чаще всего фиксировалась прямая средней силы, реже – прямая связь между DAI и др. исследуемыми параметрами: на 3 сутки экспериментального колита связь обнаружена с 12 параметрами (все связи прямые средней силы), на 5 сутки экспериментального колита – с 16 параметрами (в том числе, 3 связи прямые сильные, а также обратная средней силы связи с резервно-адаптационным потенциалом по уровню продуктов ОМБ в гомогенате

толстого кишечника), на 7 сутки – 18 связей (в том числе, 3 связи прямые слабой силы, 1 связь прямая сильная).

Наибольшее количество связей выявлено на 5 и 7 сутки экспериментального колита. Во все сроки корреляция наблюдалась между DAI и интенсивностью фагоцитоза, концентрацией в сыворотке IL-23 (в том числе, сильная связь на 5 сутки), IgG, содержанием в очаге повреждения МПО (в том числе, сильная связь на 5 сутки), продуктов ОМБ в сумме (в том числе, сильная связь на 5 сутки), а также КДФНГ в спонтанном и индуцированном режимах. При экспериментальном колите иммунологические параметры в крови и в очаге повреждения толстого кишечника, параметры СРО в очаге повреждения толстого кишечника нарастают по мере увеличения индекса активности болезни DAI.

Во все сроки наблюдения не зафиксирована значимая корреляция между TDI и количеством в крови моноцитов, интенсивностью индуцированного НСТ-теста, уровнем оснований Шиффа в гептановой фазе, содержанием продуктов ОМБ в ультрафиолетовой части спектра в спонтанном и индуцированном режимах, видимой части спектра в индуцированном режиме в гомогенате толстого кишечника. Как правило, выявлялась прямая средней силы, реже – прямая связь между TDI и др. параметрами: на 3 сутки связь обнаружена с 12 параметрами (в том числе, 4 связи прямые слабой силы), на 5 сутки – с 18 параметрами (в том числе, 3 связи прямые слабые, 1 связь прямая сильная, а также обратная средней силы связи с резервно-адаптационным потенциалом по уровню продуктов ОМБ в гомогенате толстого кишечника), на 7 сутки – 20 связей (в том числе, 10 связей прямые слабой силы, 1 связь прямая сильная).

Наибольшее количество связей между TDI и параметрами иммунного и редокс-статуса выявлено на 5 и 7 сутки экспериментального колита. Во все сроки корреляция наблюдалась между TDI и количеством в крови нейтрофилов, интенсивностью спонтанного НСТ-теста, концентрацией в сыворотке IL-23, содержанием в очаге повреждения МПО (в том числе, сильная связь на 7 сутки), первичных и вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, продуктов ОМБ в сумме в спонтанном (в том числе, сильная связь на 5 сутки) и

индуцированном режиме, а также КДНФГ в индуцированном режиме. При экспериментальном колите иммунологические параметры в крови и в очаге повреждения толстого кишечника, параметры СРО в очаге повреждения толстого кишечника нарастают по мере увеличения TDI.

Таблица 50 – Корреляция при экспериментальном колите между индексом активности болезни (DAI, у.е.), иммунологическими параметрами и параметрами свободно-радикального окисления

Параметры	ЭК 3 сутки	ЭК 5 сутки	ЭК 7 сутки
Моноциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,17	R=0,28	R=0,23
Нейтрофилы, $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,54	R=0,58	R=0,41
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	R=0,61	R=0,58	R=0,63
НСТ-тест сп., инт-ть, у.е.	R=0,75	R=0,58	R=0,41
НСТ-тест инд., инт-ть, у.е.	R=0,30	R=0,58	R=0,37
IL-23, пг/мл	R=0,61	R=0,78	R=0,73
МПО, ед./мм ²	R=0,75	R=0,88	R=0,73
TNF- α , ед./мм ²	R=0,41	R=0,54	R=0,63
CD3 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,30	R=0,37	R=0,43
CD45RA ⁺ $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,17	R=0,37	R=0,54
IgG, нг/мл	R=0,54	R=0,58	R=0,63
ДК (г), е.и.о.	R=0,15	R=0,28	R=0,43
КДиСТ (г), е.и.о.	R=0,51	R=0,57	R=0,32
ШО (г), е.и.о.	R=0,13	R=0,19	R=0,43
ДК (и), е.и.о.	R=0,27	R=0,57	R=0,51
КДиСТ (и), е.и.о.	R=0,64	R=0,44	R=0,51
ШО (и), е.и.о.	R=0,32	R=0,28	R=0,67
S ОМБ спонт., у.е./мг белка	R=0,69	R=0,78	R=0,83
S АДНФГ спонт., у.е./мг белка	R=0,17	R=0,38	R=0,43
S КДНФГ спонт., у.е./мг белка	R=0,54	R=0,63	R=0,54
S uv спонт., у.е./мг белка	R=0,30	R=0,37	R=0,37
S vs спонт., у.е./мг белка	R=0,19	R=0,49	R=0,63
S ОМБ инд., у.е./мг белка	R=0,41	R=0,51	R=0,63
S АДНФГ инд., у.е./мг белка	R=0,41	R=0,58	R=0,63
S КДНФГ инд., у.е./мг белка	R=0,51	R=0,57	R=0,54
S uv инд., у.е./мг белка	R=0,19	R=0,18	R=0,23
S vs инд., у.е./мг белка	R=0,30	R=0,38	R=0,41
РАП	R=0,63	R= - 0,64	R=0,43

Примечание: Полужирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,05$) связи. ЭК – экспериментальный колит, МПО – миелопероксидаза, ДК – диеновые конъюгаты, КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – основания Шиффа, е.и.о. – единицы индексов окисления, ОМБ – окислительная модификация белка, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, РАП – резервно-адаптационный потенциал.

Таблица 51 – Корреляция при экспериментальном колите между индексом повреждения кишечника (TDI, у.е.), иммунологическими параметрами и параметрами свободно-радикального окисления

Параметры	ЭК 3 сутки	ЭК 5 сутки	ЭК 7 сутки
Моноциты, $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,02	R=0,14	R=0,33
Нейтрофилы, $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,43	R=0,58	R=0,43
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	R=0,30	R=0,48	R=0,43
НСТ-тест сп., инт-ть, у.е.	R=0,43	R=0,61	R=0,43
НСТ-тест инд., инт-ть, у.е.	R=0,17	R=0,04	R=0,27
ИЛ-23, пг/мл	R=0,65	R=0,68	R=0,47
МПО, ед./мм ²	R=0,58	R=0,58	R=0,83
ТНФ-альфа, ед./мм ²	R=0,29	R=0,51	R=0,43
CD3 ⁺ , $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,11	R=0,14	R=0,47
CD45RA ⁺ $\cdot 10^9/\text{л}$	R=0,17	R=0,06	R=0,43
IgG, нг/мл	R=0,27	R=0,48	R=0,43
ДК (г), е.и.о.	R=0,47	R=0,58	R=0,47
КДиСТ (г), е.и.о.	R=0,53	R=0,67	R=0,43
ШО (г), е.и.о.	R=0,13	R=0,01	R=0,13
ДК (и), е.и.о.	R=0,58	R=0,67	R=0,67
КДиСТ (и), е.и.о.	R=0,68	R=0,74	R=0,58
ШО (и), е.и.о.	R=0,11	R=0,33	R=0,51
S ОМБ спонт., у.е./мг белка	R=0,71	R=0,78	R=0,71
S АДНФГ спонт., у.е./мг белка	R=0,30	R=0,33	R=0,47
S КДНФГ спонт., у.е./мг белка	R=0,37	R=0,58	R=0,53
S uv спонт., у.е./мг белка	R=0,15	R=0,11	R=0,27
S vs спонт., у.е./мг белка	R=0,37	R=0,48	R=0,53
S ОМБ инд., у.е./мг белка	R=0,48	R=0,57	R=0,68
S АДНФГ инд., у.е./мг белка	R=0,37	R=0,63	R=0,63
S КДНФГ инд., у.е./мг белка	R=0,58	R=0,68	R=0,63
S uv инд., у.е./мг белка	R=0,27	R=0,27	R=0,31
S vs инд., у.е./мг белка	R=0,41	R=0,43	R=0,41
РАП	R=0,51	R= - 0,53	R=0,37

Примечание: Полужирным шрифтом выделены значимые ($p < 0,05$) связи. ЭК – экспериментальный колит, МПО – миелопероксидаза, ДК – диеновые конъюгаты, КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – основания Шиффа, е.и.о. – единицы индексов окисления, ОМБ – окислительная модификация белка, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, РАП – резервно-адаптационный потенциал.

Комплекс биофлавоноидов в составе корневищ *Curcuma longa* обладает известными, продемонстрированными в клинических и экспериментальных условиях при ревматоидном артрите, увеите, атеросклерозе и др. заболеваниях антиоксидантными, противовоспалительными, цитопротекторными и др.

свойствами, прежде всего, при пероральном применении. В этой связи представляет интерес разработка оригинальных ректальных суппозиториях, содержащих в качестве активного компонента спиртовой экстракт корневищ *Curcuma longa*, и оценка с патогенетических позиций их эффективности на доклиническом этапе в сравнении со средствами базисной терапии при экспериментальном колите. Для этого проведены комплексные исследования по созданию новой лекарственной формы. Определены условия получения спиртового экстракта корневищ *Curcuma longa*, установлено, что максимальное высвобождение куркумина наблюдается при использовании метода дробной мацерации с использованием в качестве растворителя спирта этилового 80%.

Для выбора оптимального состава новой лекарственной формы предварительно в условиях *in vitro* определили дозировку вводимого в суппозиторий экстракта с целью обеспечения антиоксидантного и предотвращения прооксидантного действия. На основании фармацевтико – технологических и биофармацевтических исследований в ходе теста «Растворение» установлено, что максимальное высвобождение куркумина наблюдается из гидрофильных основ, содержащих преимущественно ПЭГи с различной молекулярной массой. При выборе вспомогательных веществ учитывали то, что лекарственная форма должна полностью соответствовать требованиям ОФС «Суппозитории» по фармацевтико – технологическим показателям, обеспечивать максимальное высвобождение куркумина. Из предложенного состава за 45 минут высвобождается более 90% действующего вещества. Была разработана технология, проведена стандартизация лекарственной формы. Для определения подлинности использовали метод ТСХ в системе хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1). Количественное определение проводили методом УФ – спектрофотометрии на основе реакции с борно – щавелевым реактивом. Способ расчета – по удельному показателю поглощения. Методика была полностью валидирована по показателям правильности аналитического метода, приемлемости, прецизионности, включающей в себя показатели

сходимости и воспроизводимости, а также линейности. Установлена стабильность суппозитория при хранении в течение 18 месяцев.

Применение при экспериментальном колите оригинальных ректальных суппозитория с экстрактом куркумы приводит к снижению выраженности клинических симптомов на 3, 5 и 7 сутки, статистически значимому уменьшению DAI на 5 и 7 сутки наблюдения. Морфологическим отражением эффективности применения экстракта куркумы явилось в очаге повреждения толстого кишечника уменьшение инфильтрация нейтрофилами на 3, 5 и 7 сутки, эозинофилами на 3 сутки, лимфоцитами на 5 сутки, гистиоцитами – на 7 сутки, плазмócитами – на 5 и 7 сутки, увеличение представительства плазмócитов, гистиоцитов и фибробластов на 3 сутки, снижение размера язвенного дефекта на 3, 5 и 7 сутки, уменьшение индекса TDI на 5 и 7 сутки наблюдения. Полагаем, что увеличение количества в очаге повреждения на 3 сутки гистиоцитов и фибробластов отражает активацию репаративных процессов после альтерации стенки кишечника.

Применение ректальных суппозитория с экстрактом куркумы приводит в крови к уменьшению до уровня интактных животных общего количества лейкоцитов на 3, 5 и 7 сутки, количества лимфоцитов – на 5 и 7 сутки, моноцитов – на 3 сутки, количества сегментоядерных нейтрофилов на 3 и 5 сутки. Отмечено снижение и частичное восстановление поглотительной активности нейтрофилов крови на 3, 5 и 7 сутки наблюдения, снижение и частичное восстановление НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови в спонтанном режиме на 5 и 7 сутки, в индуцированном – на 3 и 5 сутки наблюдения. Обнаруженные изменения иммунологических параметров в условиях локального применения экстракта куркумы, в том числе, обусловлены снижением концентрации в сыворотке IL-23 на 3, 5 и 7 сутки эксперимента, снижением и частичным восстановлением содержания в очаге повреждения TNF- α на 5 и 7 сутки. Отражением восстановления функции нейтрофилов является снижение и частичное восстановление содержания МПО в очаге повреждения толстого кишечника на 5 и 7 сутки эксперимента.

В условиях применения экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях снижается и полностью восстанавливается представительство в крови $CD3^+$ лимфоцитов. Наряду с этим, парадоксально увеличивается количество лимфоцитов в крови с признаками раннего апоптоза и позднего апоптоза и частично некротических клеток, а также уменьшается количество интактных лимфоцитов, что может отражать феномен негативной селекции в кровотоке аутоагрессивных лимфоцитов. Применение экстракта куркумы приводит к снижению и полному восстановлению концентрации в сыворотке IgM, снижению и частичному восстановлению концентрации в сыворотке IgG.

Предположение о том, что ведущий механизм протекторного действия экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях при колите обусловлен антиоксидантным эффектом комплекса биофлавоноидов подтвердился при оценке содержания продуктов ПОЛ и продуктов ОМБ в спонтанном и индуцированном режимах. В гептановой фазе липидного экстракта гомогената очага повреждения толстого кишечника снижается содержание первичных продуктов ПОЛ на 7 сутки, в изопропанольной фазе - первичных продуктов на 3 и 5 сутки, вторичных и конечных продуктов на 7 сутки. На 3 и 7 сутки при оценке в спонтанном режиме продуктов ОМБ снижается и частично восстанавливается общее содержание, содержание первичных и вторичных, а также основного и нейтрального характера карбонильных производных белков, на 5 сутки снижается и полностью восстанавливается уровень вторичных карбонильных производных белков основного и нейтрального характера. Резервно-адаптационный потенциал, оцениваемый по продуктам ОМБ, снижается и полностью восстанавливается на 3 сутки, увеличивается и полностью восстанавливается на 5 сутки.

Полагаем, что можно выделить несколько ключевых механизмов в протекторном действии экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном колите. Среди них наиболее изученным является локальный антиоксидантный эффект. Во-первых, благодаря своей химической структуре (фенольные О-Н и С-Н группы), куркумин выступает в роли сквенджера свободных радикалов и антиокислительного агента [134]. Во-

вторых, куркумин ингибирует избыточную активность iNOS, поглощает NO [80]. В-третьих, куркумин снижает содержание МПО в тканях при воспалении за счет уменьшения избыточной инфильтрации очага повреждения нейтрофилами, когда защитные эффекты фермента уступают его окислительному деструктивному действию [216]. Наконец, зафиксирована способность куркумина повышать активность СОД и др. факторов антиокислительной защиты, включая связанных с Nrf2 сигнальным путем, гемоксигеназой-1 и др. [274].

Нельзя исключить прямой иммуотропный эффект куркумина. Куркумин способен регулировать сигнальные пути продукции провоспалительных цитокинов, реактантов острой фазы, ЦОГ-2 и др. [7]. Как известно, синтез провоспалительных цитокинов при ТНБС-индуцированном колите опосредован активацией сигнального пути TLR4 / NF-κB / AP-1 [79]. Во-первых, куркумин способен ингибировать активацию TLR4, блокируя MyD88-зависимые и независимые сигнальные механизмы, связываясь с миелоидным белком дифференцировки-2, который является внеклеточным доменом TLR4 [80]. Во-вторых, куркумин блокирует последующие звенья TLR4-зависимого пути, включая фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей (TRAF6) и ингибитор киназы 1, связанной с рецептором интерлейкина-1 (IRAK1) [234]. В-третьих, куркумин снижает активность NF-κB за счет ингибирования IKKβ и предотвращая перемещение субъединицы NF-κB в ядро [228]. В этом отношении куркумин имитирует действие стероидных противовоспалительных средств, блокируя деградацию IκBα в цитоплазме и ингибируя ядерную транслокацию субъединицы p65. Наконец, куркумин блокирует передачу сигнала AP-1, ингибируя прямо или косвенно митоген-активируемую киназу, киназу ERK1/2, терминальные киназы клеточных сочленений (JNK) и p38. Все указанные механизмы приводят к ограничению транскрипции генов провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1β, IL-6 и др.) [268].

При исследовании *ex vivo* с использованием биоптатов ободочной кишки взрослых и детей, страдающих ВЗК, показано, что культивирование в питательной среде с куркумином уменьшает активность p38 митоген-

активируемой киназы, снижает концентрацию IL-1 β , увеличивает – IL-10, дозозависимо снижает активность ММП-3 [118]. Нами продемонстрировано, что в условиях локального применения куркумина при экспериментальном колите в очаге повреждения толстого кишечника снижается содержание TNF- α и МПО.

Ряд исследований демонстрируют прямое участие куркумина в регуляции функциональной активности и количества иммунокомпетентных клеток, обеспечивающих противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. Во-первых, показано влияние куркумина на ДК: угнетение их созревания путем снижения активности индоламиновой 2,3-диоксигеназы, аналогичный эффект наблюдается у кортикостероидов [80, 157]; повышение толерогенного потенциала и угнетение презентации антигенов ДК за счет снижения секреции провоспалительных цитокинов, включая IL-12, снижения экспрессии CD11c, молекул межклеточной адгезии 1 (ICAM-1), что сопряжено с увеличением дифференцировки Treg, снижением активности Th1, Th17 [224]. Во-вторых, угнетение куркумином пролиферации Т-лимфоцитов (преимущественно Th1, Th17) и повышение активности Th2 связано не только с угнетением секреции IL-12 макрофагами и ДК, но и вмешательством в активность ферментов клеточного цикла - рибонуклеотидредуктазы и ДНК-полимеразы; снижение количества Th17 приводит к уменьшению продукции ими провоспалительных цитокинов IL-6, IL-21 и IL-17 [59]. В-третьих, куркумин угнетает чрезмерную миграционную способность, дегрануляцию нейтрофилов при воспалении, модулирует функцию В-лимфоцитов [180]. Показана способность куркумина повышать уровень фекального IgA [225]. Наконец, куркумин при воспалении снижает экспрессию ЦОГ-2 и сопряженный с этим синтез провоспалительных медиаторов за счет блокады внутриклеточной сигнализации путей AP-1 и NF- κ B, снижает экспрессию нейтрофилами и макрофагами ММП-1, ММП-3, ММП-7, ММП-9, участвующих в деградации внеклеточного матрикса [96, 106].

Принимая во внимание роль дисбиоза кишечника в патогенезе ВЗК, еще одним механизмом протекторного действия куркумина может выступать антимикробный эффект в отношении патогенной и условно-патогенной флоры,

способность регулировать состав кишечной микробиоты, увеличивая альфа-разнообразие бактерий [85, 86, 267]. Куркумин благоприятно влияет на жизнедеятельность бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты, которые обеспечивают защиту энтероцитов, ингибируют воспалительный процесс в стенке кишечника и снижают риск колоректального рака [235]. Сообщают о сопряженности эффектов куркумина на модуляцию кишечной микробиоты и индукции активности Treg в кишечнике [224]. Сам куркумин в кишечнике подвергается влиянию ферментов бактериального происхождения (25% куркумина за 24 ч), образуя свыше 20 более активных метаболитов, в том числе 1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропанол, тетрагидрокуркумин и дигидроферуловую кислоту [239, 291]. Так, именно с тетрагидрокуркумином связывают снижение секреции IL-6 и TNF- α [307].

Препараты 5-АСК традиционно рассматривают в качестве первой линии базисных средств для больных ВЗК как в условиях перорального применения, так и в составе средств локальной терапии в виде суппозиторий, суспензии, пены [8]. Механизм действия 5-АСК до конца не ясен. Возможно вмешательство 5-АСК в метаболизм арахидоновой кислоты и синтез простагландинов и лейкотриенов, нейтрализацию АФК, снижение продукции провоспалительных цитокинов, снижение секреции иммуноглобулинов плазматическими клетками [130, 222, 241]. Большинство эффектов 5-АСК обусловлены ингибированием NF κ B и сопряженных с ним путей внутриклеточной сигнализации [292]. Показана способность 5-АСК блокировать продукцию АФК нейтрофилами и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек в очаге повреждения кишечника [165]. Результаты многочисленных исследований показывают роль 5-АСК в профилактике колоректального рака при ВЗК [285]. Эффективность применения различных лекарственных форм 5-АСК при ВЗК доказана.

Нами проведена оценка влияния 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на основе суппозиторий «Салофальк» (МНН: Месалазин, «Doctor Falk Pharma GmbH», Германия) в дозе 50 мг при двукратном применении в сутки в течение 7 дней экспериментального колита на параметры клинической

симптоматики, морфологии и СРО очага повреждения, врожденного и адаптивного иммунитета для сопоставления с эффектами экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев по аналогичной схеме. При экспериментальном колите интегральный параметр клинической симптоматики DAI снижался на 5 и 7 сутки, как и в условиях применения экстракта куркумы, что свидетельствует о сопоставимости эффектов экстракта куркумы и 5-АСК в отношении клинических симптомов.

При сравнительном исследовании морфологии очага повреждения обнаружено, что на фоне применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы в отличие от 5-АСК наблюдались на 3, 5 и 7 сутки менее выраженные признаки воспалительного процесса в виде лейкоцитарной инфильтрации, отека, раньше фиксировались признаки заживления язвенных дефектов, репарации поврежденных тканей кишечника, что нашло отражение в морфометрических параметрах очага повреждения: увеличением количества гистиоцитов, фибробластов, снижением количества эозинофилов, уменьшение размеров язвенных дефектов на 3 сутки. Индекс TDI снижался на 3 и 5 сутки экспериментального колита одинаково как в условиях применения экстракта куркумы, так и применения 5-АСК.

При оценке параметров врожденного иммунитета выявлено, что применение 5-АСК в составе ректальных суппозиториев приводит к снижению количества в крови и полному восстановлению во все сроки наблюдения общего количества лейкоцитов, количества лимфоцитов, частичному восстановлению количества нейтрофилов на 5 сутки, снижению и частичному восстановлению поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови. На фоне применения 5-АСК во все сроки наблюдения снижается концентрация IL-23 в сыворотке и снижается содержание TNF- α и МПО в очаге повреждения толстого кишечника; концентрация в сыворотке IL-23 на 3 сутки, содержание МПО и TNF- α в толстом кишечнике на 5 и 7 сутки частично восстанавливаются. Сравнительный анализ позволил установить, что эффект ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы сопоставим с действием ректальных

суппозиториях с 5-АСК в отношении общего количества лейкоцитов, количества лимфоцитов и нейтрофилов в крови, содержания TNF- α и МПО в очаге повреждения. Эффект ректальных суппозиториях с 5-АСК более выражен в отношении поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов во все сроки наблюдения, в отношении концентрации IL-23 в сыворотке - на 3 сутки.

Таким образом, восстановление исследуемых параметров врожденного иммунитета при экспериментальном колите значимо на фоне применения ректальных суппозиториях с 5-АСК по сравнению с применением ректальных суппозиториях экстрактом куркумы.

Сравнительный анализ применения при экспериментальном колите ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы и ректальных суппозиториях с 5-АСК выявил, что по изменению количества в крови CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов, лимфоцитов с ранними признаками, поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток, концентрации в сыворотке IgM и IgG эффекты экстракта куркумы и 5-АСК сопоставимы.

Анализ параметров свободно-радикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника выявил, что уровень продуктов ПОЛ, продуктов ОМБ в спонтанном и металл-индуцированном режимах при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы и с 5-АСК сопоставим.

Результаты оценки клинических симптомов, морфологии очага повреждения, врожденного и адаптивного иммунитета, СРО в очаге повреждения при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы представлены на интегральной схеме (рисунок 40). Полагаем, что индукция спиртовым раствором ТНБС первичной альтерации в толстом кишечнике приводит к активации факторов врожденного иммунитета, прежде всего, в связи с аккумуляцией и стимуляцией поглотительной функции, кислородзависимого метаболизма с активацией НАДФН-оксидазы, индуцибельной NO-синтазы, содержания МПО и генерацией

АФК и азота, гипохлорита нейтрофилами, эозинофилами и моноцитами/макрофагами.

Наряду с клетками врожденного иммунитета вклад в активацию СРО в очаге повреждения могут вносить эндотелиоциты кровеносных сосудов толстого кишечника, эпителиоциты кишечника, истощение компонентов антиоксидантной защиты. Маркерами окислительного стресса в очаге повреждения кишечника выступают экстрагируемые из гептановой и изопропанольной фазы липидного экстракта продукты ПОЛ, а также продукты ОМБ в спонтанном и металл-индуцируемом режимах. Кроме этого, нами зафиксирована активация факторов адаптивного иммунитета, увеличение количества в крови $CD3^+$, $CD45RA^+$, концентрации IgM, IgG в сыворотке.

Определенный вклад в активацию факторов врожденного и адаптивного иммунитета, свободно-радикального окисления вносит дисрегуляция иммунного ответа при ВЗК, в частности увеличение концентрации в сыворотке IL-23 и содержания в очаге повреждения TNF- α . Нами выявлена активация гибели лимфоцитов крови путем некроза и апоптоза, которая, в том числе, может быть инициирована окислительным стрессом, повреждением клеточных мембран и изменением электролитного гомеостаза, pH внутри клетки, действием проапоптогенных цитокинов, в частности TNF- α . Полагаем, что избыточная гибель лимфоцитов как в кровотоке, так в стенке кишечника неблагоприятно влияет на иммунобиологический гомеостаз кишечника, функционирование секреторного иммунитета, микробиоценоз кишечника. Указанные патогенетические факторы (окислительный стресс, активация компонентов врожденного и адаптивного иммунитета, цитокиновый дисбаланс, гибель лимфоцитов) участвуют в расширении зоны альтерации в толстом кишечнике, эскалации деструктивных процессов, что презентруется клиническими и морфологическими признаками колита, интегрированными в DAI и TDI.



Рисунок 40 – Некоторые аспекты патогенеза экспериментального колита и механизма действия экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториях по результатам проведенного исследования

КЗМ НФ – кислородзависимый метаболизм нейтрофилов, МПО – миелопероксидаза, СРО – свободно-радикальное окисление, ПОЛ – перекисное окисление липидов, ОМБ – окислительная модификация белков, ЛЦ – лимфоциты, ЭФ – эозинофилы, ПЦ – плазмоциты, ГЦ – гистиоциты, ФБ – фибробласты.

Таким образом, применение при экспериментальном колите экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиторий направлено, во-первых, на коррекцию редокс-статуса в стенке толстого кишечника за счет прямого и опосредованного антиоксидантного эффекта и как следствие снижение содержания продуктов ПОЛ и ОМБ. Во-вторых, прямой иммуностропный эффект куркумина за счет вмешательства во внутриклеточные сигнальные пути и функциональную активность иммунокомпетентных клеток, изменение баланса про- и противовоспалительной, про- и антиапоптогенной активности в крови и стенке кишечника зафиксирован нами в виде уменьшения количества и функциональной активности нейтрофилов в крови, CD3⁺ лимфоцитов, снижения концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке, снижения содержания TNF- α , МПО в очаге повреждения толстого кишечника. Некоторые из указанных механизмов позволяют многим авторам говорить об эффектах куркумина, подобных эффектам кортикостероидов [86]. Наконец, нельзя исключить цитопротекторный эффект куркумина в области вторичной альтерации очага повреждения толстого кишечника за счет модуляции состава кишечной микробиоты [85].

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном колите зафиксированы клинические и морфологические признаки заболевания, прогрессирующие от 3 к 7 суткам наблюдения, ассоциированные с изменениями иммунологических параметров: увеличением в крови количества $CD3^+$, $CD45RA^+$ лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, повышением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, увеличением концентрации в сыворотке IL-23, IgM, IgG, повышением содержания в тканях очага повреждения кишечника TNF- α и миелопероксидазы.
2. При экспериментальном колите в тканях очага повреждения толстого кишечника развивается окислительный стресс, о чем свидетельствует накопление на 3, 5 и 7 сутки наблюдения первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов преимущественно в изопропанольной фазе липидного экстракта и преимущественно вторичных продуктов окислительной модификации белков основного характера; клинические и морфологические признаки колита нарастают по мере увеличения содержания в кишечнике продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков.
3. При экспериментальном колите применение каждые 12 часов оригинальных ректальных суппозиториев с 0,075 мг экстракта куркумы приводит с максимальным эффектом на 5 и 7 сутки наблюдения к снижению выраженности клинических и морфологических признаков заболевания, включая размер язвенного дефекта, инфильтрацию нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами, плазмócитами, гистиоцитами, фибробластами.
4. Иммунотропные эффекты применения при экспериментальном колите ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы реализуются в виде

снижения в крови количества сегментоядерных нейтрофилов и CD3⁺ лимфоцитов, увеличения количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижения поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижения концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке и содержания TNF- α , миелопероксидазы в тканях очага повреждения толстого кишечника.

5. Локальный антиоксидантный эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев при экспериментальном колите проявляется в уменьшении содержания в тканях очага повреждения толстого кишечника продуктов перекисного окисления липидов преимущественно в изопропанольной фазе и продуктов окислительной модификации белков с ограничением образования преимущественно вторичных карбонильных производных белков основного и нейтрального характера и частичным восстановлением резервно-адаптационного потенциала.
6. При экспериментальном колите эффекты применения ректальных суппозиториев с 0,075 мг экстракта куркумы на клинические признаки, параметры адаптивного иммунитета в крови, свободно-радикального окисления и содержание миелопероксидазы и TNF- α в тканях очага повреждения сопоставимы с эффектами от применения ректальных суппозиториев с 50 мг 5-аминосалициловой кислоты, менее выражены в отношении параметров врожденного иммунитета в крови и более выражены по ограничению деструктивных явлений и активации репарации в тканях очага повреждения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Модель воспалительных заболеваний кишечника с использованием тринитробензолсульфоновой кислоты в условиях *in vivo* может быть применена при разработке новых патогенетических методов терапии.
2. Предложенный состав суппозиториев с экстрактом корневищ куркумы длинной может быть использован при разработке новых лекарственных препаратов в доклинических и на различных этапах клинических исследований при воспалительных заболеваниях кишечника.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-АСК – 5-аминосалициловая кислота

АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны

АФК – активные формы кислорода

БК – болезнь Крона

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДК – диеновые конъюгаты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КД - кетодиены

КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны

ММП – металлопротеиназы

МОЗМ – международная организация законодательной метрологии

МПО – миелопероксидаза

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НСТ – нитросиний тетразолий
ОМБ – окислительная модификация белков
ОФС – общая фармакопейная статья
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПЭГ – полиэтиленгликоль
РАП – резервно-адаптационный потенциал
РНК – рибонуклеиновая кислота
СОД – супероксиддисмутаза
СРО – свободнорадикальное окисление
СТ – сопряженные триены
СФ – спектрофотометр
ТНБС – тринитробензолсульфоновая кислота
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФ – ультрафиолетовый
ФС – фармакопейная статья
ЦОГ – циклооксигеназа
ШО – основания Шиффа
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭК – экспериментальный колит
ABHD14B – белок 14B, содержащий домен альфа / бета гидролазы
Anti-NKG2D – антитело к интегральному мембранному белку NKG2D
CA2 – карбонагидраза 2
CD – кластер дифференцировки
DAI – индекс активности болезни
ICAM – интрацеллюлярная адгезивная молекула
IFN- γ – интерферон гамма

GATA-3 – транскрипционный фактор, участвующий в пролиферативной активности клеток рака молочной железы люминального типа

Ig – иммуноглобулин

IL – интерлейкин

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота

IRGM – ГТФаза семейства M, связанная с иммунитетом

HNP – человеческий нейтрофильный пептид

Hpa2 – гистонацетилтрансфераза семейства Hpa2

LCP – цитозольный белок лимфоцитов

mAb – моноклональное антитело

MyD88 – ген первичной реакции миелоидной дифференцировки (88)

NF-κB – ядерный фактор «каппа би»

NK – натуральные киллеры

NLRP – семейство цитозольных белков, содержащих пириновый домен

NOD2 – содержащий нуклеотид-связывающий домен олигомеризации белок 2

Nrf2 – нуклеарный ядерный фактор 2

PG – простагландин

PRDX – пероксиредоксин

PRG – протеогликан

PSME – субъединица активатора протеасомы

ROR-γt – орфанный ядерный рецептор гамма, сопряженный с ретиноевой кислотой

TDI – индекс повреждения тканей

TGF-β – трансформирующий ростовой фактор бета

TLR – толл-подобный рецептор

TNF-α – фактор некроза опухоли-α

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова, Е.А. Эпидемиология неспецифических воспалительных заболеваний кишечника / Е.А. Белоусова // Неспецифические воспалительные заболевания кишечника / под ред. Г.И. Воробьева, И.Л. Халифа. – Москва : Миклош, 2008. – С. 8-25.
2. Белоусова, Е.А. Европейский консенсус по лечению болезни Крона: перевод и комментарий / Е.А. Белоусова // Русский медицинский журнал. – 2012. – №15. – С. 741-747.
3. Борисов, М.Ю. Фармакогностическое исследование корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.) : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : дис. канд. фарм. наук / Борисов Михаил Юрьевич. – Самара, 2017. – 166 с.
4. Буторина, Л.И. Воспалительные заболевания кишечника / Л.И. Буторина, А.В. Калинин // Гастроэнтерология и гепатология. Диагностика и лечение / под ред. А. В. Калинина, А. Ф. Логинова, А.И. Хазанова. – 2-е изд., доп. и перераб. – Москва : МУДпресс-информ, 2011. – С. 327-358.
5. Волчегорский, И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов ПОЛ в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, В.Г. Яровинский // Вопросы медицинской химии. – 1989. – Т.35, №1. – С. 127-131.
6. Гаврилин, М.В. Содержание куркуминоидов в корневищах куркумы длинной / М.В. Гаврилин, Т.В. Орловская, С.П. Сенченко // Фармация. – 2010. – №3. – С. 30-32.
7. Гайдарова, А.П. Влияние куркумы и куркумина на углеводный обмен при аллоксан-индуцированном сахарном диабете у крыс / А.П. Гайдарова, Г.А. Корощенко, Р.И. Айзман. – [электр. текст] // Современные проблемы науки и

образования. – 2014. – №5. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14779> (дата обращения: 24.04.2020).

8. Гастроэнтерология : национальное руководство / под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 704 с. – ISBN 978-5-9704-0675-5.

9. Гастроэнтерология и гепатология : диагностика и лечение / под ред. А.В. Калинина, А.И. Хазанова. – Москва : Миклош, 2007. – 602 с. – ISBN 978-5-900518-47-7.

10. Гольдина, И.А. Протекторные свойства экстракта куркумы при этанолиндуцированных нарушениях поведения / И.А. Гольдина, Е.В. Маркова, Б.Г. Гольдин // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2017. – №1. – С. 131-135.

11. Гончарик, И.И. Болезнь Крона / И.И. Гончарик // Военная медицина. – 2013. – №4. – С. 113-117.

12. Государственная фармакопея Российской Федерации. Т.1. – 14 изд. – Москва, 2018. – [электр. текст] // Федеральная электронная медицинская библиотека [сайт]. – URL: http://resource.rucml.ru/feml.pharmacopia/14_1/HTML/index.html (дата обращения: 24.04.2020).

13. Государственная фармакопея Российской Федерации. Т.2. – 14 изд. – Москва, 2018. – [электр. текст] // Федеральная электронная медицинская библиотека [сайт]. – URL: http://resource.rucml.ru/feml/pharmacopia/14_2/HTML/index.html (дата обращения: 24.04.2020).

14. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. – Санкт-Петербург, 2012. – Текст: электронный // Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова [сайт]. – http://www.bio.msu.ru/res/DOC457/Dir_2010_63_Rus-LASA.pdf (дата обращения: 24.04.2020).

15. Долгушина, А.И. Распространенность воспалительных заболеваний кишечника в Челябинской области / А.И. Долгушина // Альманах клинической медицины. – 2019. – Т.47, №6. – С. 511-517.
16. Дуброва, С.Э. Болезнь Крона тонкой кишки / С.Э. Дуброва, Г.А. Сташук, Ю.В. Горбачева // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – №4 (104). – С. 60-62.
17. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. – [электр. текст] – Страсбург, 1986 // Council of Europe [сайт]. – URL: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007аба8> (дата обращения 13.04.20).
18. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства / Н.В. Меньшутина, Ю.В. Мишина, С.В. Алвес, [и др.]. – Москва : БИНОМ, 2013. – Т.2. – 480 с.
19. Капустин, М.А. Взаимодействие куркуминоидов с нативным и модифицированным бета-циклодекстрином в водном растворе / М.А. Капустин, А.С. Чубарова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы Международной науч. конф. и Двенадцатого съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков : в 2 ч. Ч. 1. – Минск : Изд. центр БГУ, 2016. – С. 95-98.
20. Клинические рекомендации по диагностике и лечению взрослых пациентов с болезнью Крона. – Москва, 2013. – [электр. текст] // Ассоциация колопроктологов России [сайт]. – URL: http://www.gnck.ru/rec/recommendation_uk_v16.pdf (дата обращения: 20.07.2020).
21. Краснюк, И.И. Фармацевтическая технология : учебное пособие / И.И. Краснюк, Н.Б. Демина, М.Н. Анурова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2019. – 368 с. – ISBN: 978-5-9704-4216-6.

22. Львовская, Е.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов ПОЛ / Е.И. Львовская, И.А. Волчегорский, С.Е. Шемяков, Р.И. Лифшиц // Вопросы медицинской химии. – 1991. – №4. – С. 92-93.

23. Макарова, В.Д. Разработка метода идентификации сырья куркумы в составе лекарственных препаратов, биологически-активных добавок и пищевых продуктов / В.Д. Макарова, О.В. Нестерова, Д.А. Доброхотов // Здоровье и образование в XXI веке: журнал научных статей. – 2017. – №3. – С. 144-149.

24. Муравлева, Л.Е. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева, В.Б. Молотов-Лучанский, Д.А. Ключев // Фундаментальные исследования. – 2010. – №1. – С. 74-78.

25. Орловская, Т.В. Фармакогностическое исследование некоторых культивируемых растений с целью расширения их использования в фармации : специальность 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» : автореф. дис. ... д-ра фарм. наук / Орловская Татьяна Владиславовна. – Пятигорск, 2011. – 48 с.

26. Патент 2169575 РФ. Препарат для замедления старения организма / О.А. Хоперская, Г.Н. Огудина. Прим. 27.06.2001.

27. Патент 2288735 РФ. Средство, способ получения и способ профилактики и лечения воспалительных заболеваний органов малого таза и заболеваний прямой кишки / Д.Н. Мясников, А. Кашлинский, В.П. Нужный, А.П. Ефремов. Прим. 10.12.2006.

28. Патент 2292902 РФ. Средство "Литохол" и способ поддерживающей терапии при нарушении обмена веществ, вызванном повышенным содержанием холестерина в крови / С.В. Орлова, Л.С. Василевская, Е.А. Никитина, В.И. Циприян, Т.Н. Билко, Н.Е. Зайцева. Прим. 01.04.2005.

29. Патент 2326686 РФ. Средство, обладающее гепатопротекторным, желчегонным и спазмолитическим действием / Л.А. Прокопьева, С.Г. Король. Прим. 20.06.2008.

30. Патент 2684111 РФ. Способ получения лекарственного средства с метионином и экстрактом куркумы в виде гранул с кишечнорастворимым покрытием системного действия / О.А. Гизингер, Е.В. Симонян, А.А. Хисамова. Прим. 07.02.2018.

31. Патогенез изменений гомеостаза и перспективные направления их коррекции при терминальной стадии хронической почечной недостаточности / М.В. Осиков, Л.Ф. Телешева, В.Ю. Ахматов [и др.]; под ред. М.В. Осикова. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 240 с.

32. Плейотропные эффекты и новые лекарственные формы эритропоэтина: монография / под ред. М.В. Осикова. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 208 с.

33. Ровнова, А.В. Роль суппозиторий на фармацевтическом рынке и особенности их реализации / А.В. Ровнова // Актуальные вопросы современной медицины : материалы II Дальневосточного медицинского молодежного форума. – Хабаровск, 2018. – С. 222-225.

34. Рогозина, В.А. Функция внешнего дыхания у пожилых больных язвенным колитом / В.А. Рогозина, З.Ф. Михайлова // Клиническая геронтология. – 2011. – №1. – С. 28-31.

35. Румянцев, В.Г. Язвенный колит : руководство для врачей / В.Г. Румянцев. – Москва : МИА, 2009. – 424 с.

36. Серебрякова, А.Д. Изучение химического состава корневищ куркумы длинной хроматографическими методами / А.Д. Серебрякова, Л.В. Дударева, Е.В. Авдеева [и др.]. – [электр. текст] // Федеральный Центр науки и образования Эвенсис [сайт]. – URL: <http://evansys.com/articles/innovatsionnye-vnedreniya-v->

oblasti-medicine-i-farmakologii-sbornik-nauchnykh-trudov-po-itogam-mezh/sektsiya-52-farmatsevticheskaya-khimiya-farmakognosiya-spetsialnost-14-04-02/izuchenie-khimicheskogo-sostava-kornevishch-kurkumy-dlinnoy-khromatograficheskimi-metodami/ (дата обращения: 24.04.2020).

37. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия : метод. рекомендации / сост.: М.Е. Виксман, А.Н. Маянский. – Казань : [б.и.], 1979. – 14 с.

38. Ставцев, Д.С. Иммуногенетические маркеры болезни Крона у взрослого населения Московского региона / Д.С. Ставцев, Т.А. Астрелина, М.М. Азова // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – №4. – С. 743-749.

39. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава. – Рязань : РИО РязГМУ, 2014. – 60 с. – ISBN: 978-5-8423-0154-6.

40. Циммерман, Я.С. Язвенный колит и болезнь Крона: современные представления. Ч.1: Дефиниция, терминология, распространенность, этиология и патогенез, клиника, осложнения, классификация / Я.С. Циммерман, И.Я. Циммерман, Ю.И. Третьякова // Клиническая медицина. – 2013. – №11. – С. 27-33.

41. Шулутко, Б.И. Стандарты диагностики и лечения внутренних болезней / Б.И. Шулутко, С.В. Макаренко. – 4-е изд., доп. и перераб. – Санкт-Петербург : ЭЛБИ-СПб, 2007. – 704 с. – ISBN 978-5-93979-190-8.

42. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников, В.Э. Цейликман. – Челябинск : Изд-во ЧелГПУ, 2000. – 167 с.

43. Aggeletopoulou, I. Interleukin 12/interleukin 23 pathway: Biological basis and therapeutic effect in patients with Crohn's disease / I. Aggeletopoulou, S.F.

Assimakopoulos, C. Konstantakis, C. Triantos // *World Journal of Gastroenterology*. – 2018. – Vol. 24, №36. – P. 4093-4103.

44. Altwegg, R. blocking therapies and immunomonitoring in patients with inflammatory bowel disease / R. Altwegg, T. Vincent. – [electr. text] // *Mediators of inflammation*. – 2014. – Vol. 2014. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/172821/> (дата обращения: 14.04.2020).

45. Alzoghaibi, M.A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease / M.A. Alzoghaibi // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol.19, №39. – P. 6540-6547.

46. Ananthkrishnan, A.N. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease / A.N. Ananthkrishnan, A. Cagan, V.S. Gainer // *Inflammatory bowel diseases*. – 2013. – Vol.19. – P. 1921-1927.

47. Ananthkrishnan, A.N. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis / A.N. Ananthkrishnan, H. Khalili, G.G. Konijeti // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol.145. – P. 970-977.

48. Ananthkrishnan, A.N. Sleep disturbance and risk of active disease in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis / A.N. Ananthkrishnan, M.D. Long, C.F. Martin // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2013. – Vol.11. – P. 965-971.

49. Andersson, R.E. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease / R.E. Andersson, G. Olaison, C. Tysk, A. Ekbohm // *Gastroenterology*. – 2003. – Vol.124. – P. 40-46.

50. Andrieu, G. Clinical trials for BET inhibitors run ahead of the science / G. Andrieu, A.C. Belkina, G.V. Denis // *Drug discovery today. Technologies*. – 2016. – Vol.19. – P. 45-50.

51. Antoni, L. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease / L. Antoni, S. Nuding, J. Wehkamp // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol.20, №5. – P. 1165-1179.
52. Antoniou, E. The TNBS-induced colitis animal model: An overview / E. Antoniou, G.A. Margonis, A. Angelou // *Annals of medicine and surgery*. – 2016. – Vol.11. – P. 9-15.
53. Argelaguet, R. Multi-Omics Factor Analysis-a framework for unsupervised integration of multi-omics data sets / R. Argelaguet, B. Velten, D. Arnol. – [electr. text] // *Molecular systems biology*. – 2018. – Vol.14. – URL: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/msb.20178124> (дата обращения: 16.04.2020).
54. Ashton, J.J. Personalising medicine in inflammatory bowel disease-current and future perspectives / J.J. Ashton, E. Mossotto, S. Ennis // *Translational pediatrics*. – 2019. – Vol.8, №1. – P. 56-69.
55. Assadsangabi, A. Application of Proteomics to Inflammatory Bowel Disease Research: Current Status and Future Perspectives / A. Assadsangabi, C.A. Evans, B.M. Corfe. – [electr. text] // *Gastroenterology research and practice*. – 2019. – Vol.2019. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/grp/2019/1426954/> (дата обращения: 16.04.2020).
56. Avdagić, N. Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease / N. Avdagić, A. Zaćiragić, N. Babić // *Bosnian journal of basic medical sciences*. – 2013. – Vol.13, №1. – P. 5-9.
57. Bai, A.H. Dysregulated lysine acetyltransferase 2B promotes inflammatory bowel disease pathogenesis through transcriptional repression of interleukin-10 / A.H. Bai, W.K. Wu, L. Xu // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2016. – Vol.10. – P. 726-734.
58. Bailey, J.R. IL-13 promotes collagen accumulation in Crohn's disease fibrosis by down-regulation of fibroblast MMP synthesis: a role for innate lymphoid

cells? / J.R. Bailey, P.W. Bland, J.F. Tarlton. – [electr. text] // PLoS One. – 2012. – Vol.7, №12. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052332> (дата обращения: 16.04.2020).

59. Bakır, B. Effect of curcumin on systemic T helper 17 cell response: Gingival expression of interleukin-17 and retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t and alveolar bone loss in experimental periodontitis / B. Bakır, Ay.Z. Yetkin, H.İ. Büyükbayram // Journal of periodontology. – 2016. – Vol.87. – P. e183-e191.

60. Baliga, M.S. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations / M.S. Baliga, N. Joseph, M.V. Venkataranganna // Food & Function. – 2012. – Vol.3, №11. – P. 1109-1117.

61. Bannaga, A.S. Inflammatory bowel disease and anxiety: links, risks, and challenges faced / A.S. Bannaga, C.P. Selinger // Clinical and experimental gastroenterology. – 2015. – Vol.8. – P. 111-117.

62. Bansal, S.S. Controlled systemic delivery by polymeric implants enhances tissue and plasma curcumin levels compared with oral administration / S.S. Bansal, H. Kausar, M.V. Vadhanam // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2012. – Vol.80. – P. 571-577.

63. Baratchian, M. Distinct activation mechanisms of NF- κ B regulator inhibitor of NF- κ B kinase (IKK) by isoforms of the cell death regulator cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) / M. Baratchian, C.A. Davis, A. Shimizu // The Journal of biological chemistry. – 2016. – Vol.291. – P. 7608-7620.

64. Barbalho, S.M. Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? / Barbalho S.M., Rde A. Goulart, K. Quesada // Annals of Gastroenterology. – 2016. – Vol.29, №1. – P. 37-43.

65. Barnich, N. Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohns disease / N. Barnich, A. Darfeuille-Michaud // Current opinion in gastroenterology. – 2007. – Vol.23, №1. – P. 16-20.
66. Barrett, C.W. Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut / C.W. Barrett, S.P. Short, C.S. Williams // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2016. – Vol.74, №4. – P. 607-616.
67. Baumgart, D.C. Crohn's disease / D.C. Baumgart, W.J. Sandborn // Lancet. – 2012. – Vol.380, №9853. – P. 1590-1605.
68. Bek, S. Systematic review: genetic biomarkers associated with anti-TNF treatment response in inflammatory bowel diseases / S. Bek, J.V. Nielsen, A.B. Bojesen // Alimentary pharmacology & therapeutics. – 2016. – Vol.44, №6. – P. 554-567.
69. Belarif, L. IL-7 receptor influences anti-TNF responsiveness and T cell gut homing in inflammatory bowel disease / L. Belarif, R. Danger, L. Kermarrec // The Journal of clinical investigation. – 2019. – Vol.130. – P. 1910-1925.
70. Beltran, B. Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease / B. Beltran, P. Nos, F. Dasi // Inflammatory Bowel Diseases. – 2010. – Vol.16, №1. – P. 76-86.
71. Benchimol, E.I. Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study / E.I. Benchimol, D.R. Mack, A. Guttman // The American journal of gastroenterology. – 2015. – Vol.110. – P. 553-563.
72. Berkó, S. Formulation of rectal suppositories containing diuretic drugs and their biopharmaceutical studies / S. Berkó. – [electr. text] // SZTE Doktori Repository [site]. – URL: <http://doktori.bibl.u-szeged.hu/125/> (дата обращения: 25.04.2020).
73. Bernardazzi, C. Neuroimmunomodulation in the Gut: Focus on Inflammatory Bowel Disease / C. Bernardazzi, B. Pêgo, H.S. de Souza. – [electr. text] //

Mediators of inflammation. – 2016. – Vol.2016. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/1363818/> (дата обращения: 17.04.2020).

74. Best, W.R. Development of a Crohn's disease activity index / W.R. Best, J.M. Beckett, J.W. Singleton, F.Jr. Kern // National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. – 1976. – Vol.70, №3. – P. 439-444.

75. Bhattacharyya, A. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases / A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay, S. Mitra, S.E. Crowe // *Physiological Reviews*. – 2014. – Vol.94, №2. – P. 329-354.

76. Biasi, F. Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease / F. Biasi, M. Astegiano, M. Maina // *Current Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol.18, №31. – P. 4851-4865.

77. Bo, L. Comprehensive analysis of gene expression profiles provides insight into the pathogenesis of Crohn's disease / L. Bo, H. Fu, J. Yang // *Molecular medicine reports*. – 2018. – Vol.18, №3. – P. 2643-2650.

78. Boehm, F. Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation / F. Boehm, M. Martin, R. Kesselring. – [electr. text] // *BMC gastroenterology*. – 2012. – Vol.12. – URL: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-12-97> (дата обращения: 18.04.2020).

79. Boone, D.L. Connecting the dots from Toll-like receptors to innate immune cells and inflammatory bowel disease / D.L. Boone, A. Ma // *The Journal of clinical investigation*. – 2003. – Vol.111. – P. 1284-1286.

80. Boozari, M. Impact of curcumin on toll-like receptors / M. Boozari, A.E. Butler, A. Sahebkar // *Journal of cellular physiology*. – 2019. – Vol.234, №8. – P. 12471-12482.

81. Borecki, K. Relationship between the IL23R SNPs and Crohn's Disease Susceptibility and Phenotype in the Polish and Bosnian Populations: A Case-Control

Study / K. Borecki, I. Zawada, N. N. Salkić // International journal of environmental research and public health. – 2019. – Vol.16, №9. – P. 1551.

82. Bosca-Watts, M.M. Pathogenesis of Crohn's disease: bug or no bug / M.M. Bosca-Watts, J. Tosca, R. Anton // World journal of gastrointestinal pathophysiology. – 2015. – Vol.6, №1. – P. 1-12.

83. Bramhall, M. Quality of methods reporting in animal models of colitis / M. Bramhall, O. Flórez-Vargas, R. Stevens // Inflammatory bowel diseases. – 2015. – Vol.21, №6. – P. 1248-1259.

84. Buisson, A. Macrophages Versus Escherichia coli: A Decisive Fight in Crohn's Disease / A. Buisson, M.A. Bringer, N. Barnich, E. Vazeille // Inflammatory bowel diseases. – 2016. – Vol.22, №12. – P. 2943-2955.

85. Burapan, S. Curcuminoid demethylation as an alternative metabolism by human intestinal microbiota / S. Burapan, M. Kim, J. Han // Journal of agricultural and food chemistry. – 2017. – Vol.65. – P. 3305-3310.

86. Burge, K. Curcumin and Intestinal Inflammatory Diseases: Molecular Mechanisms of Protection / K. Burge, A. Gunasekaran, J. Eckert, H. Chaaban. – [electr. text] // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol.20, №8. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/8/1912> (дата обращения: 18.04.2020).

87. Burisch, J. The epidemiology of inflammatory bowel disease / J. Burisch, P. Munkholm // Scandinavian journal of gastroenterology. – 2015. – Vol.50, №8. – P. 942-951.

88. Cadwell, K. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells / K. Cadwell, J.Y. Liu, S.L. Brown // Nature. – 2008. – Vol.456. – P. 259-263.

89. Cammarota, G. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy / G. Cammarota, G. Ianiro, R. Cianci // Pharmacology & therapeutics. – 2015. – Vol.149. – P. 191-212.

90. Caza, T. Functional and phenotypic plasticity of CD4⁽⁺⁾ T cell subsets / T. Caza, S. Landas. – [electr. text] // BioMed research international. – 2015. – Vol.2015. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/521957/> (дата обращения: 18.04.2020).
91. Chan, S.N. Delineating inflammatory bowel disease through transcriptomic studies: current review of progress and evidence / S.N. Chan, E.N.D. Low, R.A. Raja Ali, N.M. Mokhtar // Intestinal research. – 2018. – Vol.16, №3. – P. 374-383.
92. Chen, M.L. Cytokine networks and T-cell subsets in inflammatory bowel diseases / M.L. Chen, M.S. Sundrud // Inflammatory Bowel Diseases. – 2016. – Vol.22, №5. – P. 1157-1167.
93. Cheon, G.J. Mechanisms of motility change on trinitrobenzenesulfonic Acid-induced colonic inflammation in mice / G.J. Cheon, Y. Cui, D.S. Yeon // The Korean journal of physiology & pharmacology. – 2012. – Vol.16. – P. 437-446.
94. Chernyavsky, A.I. Anti-inflammatory effects of the nicotineric peptides SLURP-1 and SLURP-2 on human intestinal epithelial cells and immunocytes / A.I. Chernyavsky, V. Galitovskiy, I.B. Shchepotin, S.A. Grand: [electr. text] // BioMed research international. – 2014. – Vol.2014. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/609086/> (дата обращения: 23.04.2020).
95. Clarke, K. Allergic and Immunologic Perspectives of Inflammatory Bowel Disease / K. Clarke, J. Chintanaboina // Clinical reviews in allergy & immunology. – 2018. – Vol.57, №2. – P. 179-193.
96. Clutterbuck, A.L. Curcumin reduces prostaglandin E2, matrix metalloproteinase-3 and proteoglycan release in the secretome of interleukin 1 β -treated articular cartilage / A.L. Clutterbuck, D. Allaway, P. Harris, A. Mobasheri: [electr. text] // F1000Research. – 2013. – Vol.2. – URL: <https://f1000research.com/articles/2-147/v2> (дата обращения: 23.04.2020).

97. Collins, C.B. Flt3 ligand expands CD103⁺ dendritic cells and FoxP3⁺ T regulatory cells, and attenuates Crohn's-like murine ileitis / C.B. Collins, C.M. Aherne, E.N. McNamee // *Gut*. – 2012. – Vol.61. – P. 1154-1162.
98. Cooper, H.S. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis / H.S. Cooper, S.N. Murthy, R.S. Shah, D.J. Sedergran // *Laboratory investigation*. – 1993. – Vol.69, №2. – P. 238-249.
99. Corridoni, D. Inflammatory bowel disease / D. Corridoni, K.O. Arseneau, F. Cominelli // *Immunology Letters*. – 2014. – Vol.161, №2. – P. 231-235.
100. Couch, D.G. The Use of Cannabinoids in Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis / D.G. Couch, H. Maudslay, B. Doleman // *Inflammatory bowel diseases*. – 2018. – Vol.24, №4. – P. 680-697.
101. Cross, R.K. Nitric oxide in inflammatory bowel disease / R.K. Cross, K.T. Wilson // *Inflammatory bowel diseases*. – 2003. – Vol.9. – P. 179-189.
102. Cui, B. Fecal microbiota transplantation through mid-gut for refractory crohn's disease: Safety, feasibility, and efficacy trial results / B. Cui, Q. Feng, H. Wang // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2015. – Vol.30. – P. 51-58.
103. Catana, C.S. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease / C.S. Catana, I. Berindan Neagoe, V. Cozma // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – Vol.21, №19. – P. 5823-5830.
104. Dalle-Donne, I. Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics / I. Dalle-Donne, A. Scaloni, D. Giustarini // *Mass spectrometry reviews*. – 2005. – Vol.24. – P. 55-99.
105. de Souza, H.S. The IBD interactome: An integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy / H.S. de Souza, C. Fiocchi, D. Iliopoulos // *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. – 2017. – Vol.14. – P. 739-749.

106. Desai, S.J. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer / S.J. Desai, B. Prickril, A. Rasooly // Nutrition and cancer. – 2018. – Vol.70, №3. – P. 350-375.
107. Ding, H. Homocysteine promotes intestinal fibrosis in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis / H. Ding, H.Z. Gan, W.J. Fan // Digestive diseases and sciences. – 2015. – Vol.60, №2. – P. 375-381.
108. Dubeau, M.F. Drug-induced inflammatory bowel disease and IBD-like conditions / M.F. Dubeau, M. Iacucci, P.L. Beck // Inflammatory bowel diseases. – 2013. – Vol.19. – P. 445-456.
109. Dudzińska, E. Single Nucleotide Polymorphisms in Selected Genes in Inflammatory Bowel Disease / E. Dudzińska, M. Gryzinska, J. Kocki: [electr. text] // BioMed research international. – 2018. – Vol. 2018. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/6914346/> (дата обращения: 23.04.2020).
110. Dudzińska, E. Imbalance of Controlled Death in Peripheral Blood Lymphocytes in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis / E. Dudzińska, K. Szymona, P. Gil-Kulik: [electr. text] // Medicina (Kaunas). – 2019. – Vol.55, №6. – URL: <https://www.mdpi.com/1010-660X/55/6/231> (дата обращения: 23.02.2020).
111. Duk Hwan Kim. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies / Duk Hwan Kim, Jae Hee Cheon // Immune network. – 2017. – Vol.17, №1. – P. 25-40.
112. Dulai, P.S. Next-Generation Therapeutics for Inflammatory Bowel Disease / P.S. Dulai, W.J. Sandborn // Current gastroenterology reports. – 2016. – Vol.18. – P. 51-57.
113. Echarri, P. P408 Differences in biologic efficacy and dose-escalation among anti-TNF agents in Crohn's disease and ulcerative colitis / P. Echarri // Journal of Crohn's & colitis. – 2015. – Vol.9, suppl.1. – P. S283.

114. Eder, P. Disturbances in apoptosis of lamina propria lymphocytes in Crohn's disease / P. Eder, L. Łykowska-Szuber, I. Krela-Kaźmierczak // Archives of Medical Science. – 2015. – Vol.11, №6. – P. 1279-1285.
115. El Mouzan, M.I. Incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Saudi Arabia: a multicenter national study / M.I. El Mouzan, O. Saadah, K. Al-Saleem // Inflammatory bowel diseases. – 2014. – Vol.20. – P. 1085-1090.
116. El-Hodhod, M.A. Enhanced blood lymphocytes apoptosis in children with inflammatory bowel disease / M.A. El-Hodhod, R.H. Aly, S.R. Youssef, S.I. Mohamed: [electr. text] // ISRN Gastroenterology. – 2013. – Vol.2013. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/415417/> (дата обращения: 23.04.2020).
117. Elson, C.O. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota / C.O. Elson, Y. Cong, V.J. McCracken // Immunological reviews. – 2005. – Vol.206. – P. 260-276.
118. Epstein, J. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies / J. Epstein, I.R. Sanderson, T.T. Macdonald // The British Journal of Nutrition. – 2010. – Vol.103, №11. – P. 1545-1557.
119. Ermann, J. Nod/Ripk2 signaling in dendritic cells activates IL-17A-secreting innate lymphoid cells and drives colitis in T-bet^{-/-}Rag2^{-/-} (TRUC) mice / J. Ermann, T. Staton, J.N. Glickman // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – Vol.111. – P. E2559-E2566.
120. Eustace, G.J. Therapy for Crohn's Disease: A Review of Recent Developments / G.J. Eustace, G.Y. Melmed: [electr. text] // Current gastroenterology reports. – 2018. – Vol.2019. – URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11894-018-0625-x> (дата обращения: 23.04.2020).

121. FDA approves STELARA® (Ustekinumab) for treatment of moderate to severe Crohn's disease: [electr. text] // Crohn's & Colitis Foundation [site]. – URL: <http://www.ccfa.org/news/Stelara.html> (дата обращения: 24.04.2020).

122. Feagan, B.G. Efficacy and safety of induction therapy with the selective IL-23 inhibitor BI 655066, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study / B.G. Feagan, W. Sandborn, J. Panés // *Gastroenterology*. – 2016. – Vol.150, №4, suppl. 1. – P. S1266.

123. Frosali, S. How the intricate interaction between toll-like receptors, microbiota, and intestinal immunity can influence gastrointestinal pathology / S. Frosali, D. Pagliari, G. Gambassi: [electr. text] // *Journal of immunology research*. – 2015. – Vol.2015. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2015/489821/> (дата обращения: 24.04.2020).

124. Gálvez, J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD / J. Gálvez: [electr. text] // *ISRN inflammation*. – 2014. – Vol.2014. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/928461/> (дата обращения: 24.04.2020).

125. Ganji-Arjenaki, M. Phytotherapies in inflammatory bowel disease / M. Ganji-Arjenaki, M. Rafieian-Kopaei: [electr. text] // *Journal of research in medical sciences*. – 2019. – Vol. 24. – URL: <http://www.jmsjournal.net/article.asp?issn=1735-1995;year=2019;volume=24;issue=1;spage=42;epage=42;aualast=Ganji%2DArjenaki>

126. Geem, D. Harnessing regulatory T cells for the treatment of inflammatory bowel disease / D. Geem, A. Harusato, K. Flannigan, T.L. Denning // *Inflammatory bowel diseases*. – 2015. – Vol.21. – P. 1409-1418.

127. Geremia, A. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease / A. Geremia, C.V. Arancibia-Cárcamo, M.P. Fleming // *The Journal of experimental medicine*. – 2011. – Vol.208. – P. 1127-1133.

128. Giuffrida, P. Controlling Gut Inflammation by Restoring Anti-Inflammatory Pathways in Inflammatory Bowel Disease / P. Giuffrida, S. Cococcia, M.

Delliponti: [electr. text] // Cells. – 2019. – Vol.8, №5. – URL: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/397> (дата обращения: 24.04.2020).

129. Gladiator, A. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection / A. Gladiator, N. Wangler, K. Trautwein-Weidner, S. Leibund Gut-Landmann // The Journal of immunology. – 2013. – Vol.190. – P. 521-525.

130. Greenfield, S.M. Review article: the mode of action of the aminosaliclates in inflammatory bowel disease / S.M. Greenfield, N.A. Punchard, J.P. Teare, R.P. Thompson // Alimentary pharmacology & therapeutics. – 1993. – Vol.7. – P. 369-383.

131. Greuter, T. Alicaforsen, an antisense inhibitor of ICAM-1, as treatment for chronic refractory pouchitis after proctocolectomy: A case series / T. Greuter, L. Biedermann, G. Rogler // United European gastroenterology journal. – 2016. – Vol.4. – P. 97-104.

132. Guo Y. Antioxidant pathways and chemical mechanism of curcumin / Y. Guo, X. Li, C. Kuang: [electr. text] // Advanced Materials Research. – 2011. – Vol.236-238. – URL: <https://sci-hub.im/10.4028/www.scientific.net/AMR.236-238.2311> (дата обращения: 24.04.2020).

133. Gupta, S.C. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials / S.C. Gupta, S. Patchva, B.B. Aggarwal // The AAPS journal. – 2013. – Vol.15, №1. – P. 195-218.

134. Gupta, S.C. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols / S.C. Gupta, A.K. Tyagi, P. Deshmukh-Taskar // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2014. – Vol.559. – P. 91-99.

135. Haberman, Y. Long ncRNA landscape in the ileum of treatment-naive early-onset Crohn Disease / Y. Haberman, M. BenShoshan, A. Di Segni // Inflammatory bowel diseases. – 2018. – Vol.24. – P. 346-360.

136. Hartmann M.R. Boswellia serrata has beneficial anti-inflammatory and antioxidant properties in a model of experimental colitis / H.S. Filmann, M.I. Martins, L. Meurer, N.P. Marroni // *Phytotherapy Research*. – 2014. – Vol. 28, №9. – P.1392-1398.
137. He, C. Characteristics of mucosa-associated gut microbiota during treatment in Crohn's disease / C. He, H. Wang, W.D. Liao // *World Journal of Gastroenterology*. – 2019. – Vol.25, №18. – P. 2204-2216.
138. He, Y. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? / Y. He, Y. Yue, X. Zheng // *Molecules*. – 2015. – Vol.20, №5. – P. 9183-9213.
139. Hecker, L. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance / L. Hecker, N.J. Logsdon, D. Kurundkar: [electr. text] // *Science translational medicine*. – 2014. – Vol.6, №231. – URL: <https://stm.sciencemag.org/content/6/231/231ra47.long> (дата обращения: 24.04.2020)
140. Herrlinger, K.R. Efficacy, safety and tolerability of vidofludimus in patients with inflammatory bowel disease: the ENTRANCE study / K.R. Herrlinger, M. Diculescu, K. Fellermann // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2013. – Vol.7. – P. 636-643.
141. Higuchi, L.M. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women / L.M. Higuchi, H. Khalili, A.T. Chan // *The American journal of gastroenterology*. – 2012. – Vol.107. – P. 1399-1406.
142. Hiller, F. GPx2 induction is mediated through STAT transcription factors during acute colitis / F. Hiller, K. Besselt, S. Deubel // *Inflammatory Bowel Diseases*. – 2015. – Vol.21, №9. – P. 2078-2089.
143. Holleran, G. The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease / G. Holleran, L. Lopetuso, V. Petito: [electr. text] // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – Vol.18, №10. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/10/2020> (дата обращения: 24.04.2020).

144. Hong, S.N. RNA-seq reveals transcriptomic differences in inflamed and noninflamed intestinal mucosa of Crohn's disease patients compared with normal mucosa of healthy controls / S.N. Hong, J.G. Joung, J.S. Bae // *Inflammatory bowel diseases*. – 2017. – Vol.23. – P. 1098-1108.

145. Hotta, Y. Mo1765 the role of NADPH oxidase (NOX) 4 expressed in pericryptal myofibroblasts for intestinal fibrosis / Y. Hotta, T. Takagi, M. Tanaka: [electr. text] // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol.148, №4. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016508515323957?via%3Dihub> (дата обращения: 24.04.2020).

146. Hou, J.K. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature / J.K. Hou, B. Abraham, H. El-Serag // *The American journal of gastroenterology*. – 2011. – Vol.106. – P. 563-573.

147. Hueber, W. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial / W. Hueber, B.E. Sands, S. Lewitzky // *Gut*. – 2012. – Vol.61. – P. 1693-1700.

148. Hughes, A. A simplified benzidine test with an evaluation of some faecal occult blood tests / A. Hughes // *British medical journal*. – 1952. – Vol.2, №4791. – P. 970-975.

149. Hung, A. Complementary and alternative medicine use is prevalent among patients with gastrointestinal diseases / A. Hung, N. Kang, A. Bollom // *Digestive diseases and sciences*. – 2015. – Vol.60. – P. 1883-1888.

150. Huttenhower, C. Inflammatory bowel disease as a model for translating the microbiome / C. Huttenhower, A.D. Kostic, R.J. Xavier // *Immunity*. – 2014. – Vol.40, №6. – P. 843-854.

151. Ikeda, M. Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazalone-induced colitis / M. Ikeda, F. Takeshima, H. Isomoto // *Digestive diseases and sciences*. – 2008. – Vol.53. – P. 1869-1875.
152. Iliev, I.D. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis / I.D. Iliev, V.A. Funari, K.D. Taylor // *Science*. – 2012. – Vol.336. – P. 1314-1317.
153. Jakobsen, C. Environmental factors and risk of developing paediatric inflammatory bowel disease - a population-based study 2007-2009 / C. Jakobsen, A. Paerregaard, P. Munkholm, V. Wewer // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2013. – Vol.7. – P. 79-88.
154. Jauregui-Amezaga, A. Intraperitoneal administration of autologous tolerogenic dendritic cells for refractory Crohn's disease: a Phase I study / A. Jauregui-Amezaga, R. Cabezón, A. Ramírez-Morros // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2015. – Vol.9, №12. – P. 1071-1078.
155. Jauregui-Amezaga, A. Improving safety of autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with Crohn's disease / A. Jauregui-Amezaga, M. Rovira, P. Marín // *Gut*. – 2016. – Vol.9. – P. 1456-1462.
156. Jiang, W. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease / W. Jiang, J. Su, X. Zhang // *Inflammation research*. – 2014. – Vol.63. – P. 943-950.
157. Kahkhaie, K.R. Curcumin: a modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system / K.R. Kahkhaie, A. Mirhosseini, A. Aliabadi // *Inflammopharmacology*. – 2019. – Vol.27, №5. – P. 885-900.
158. Kappelman, M.D. Recent trends in the prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in a commercially insured US population / M.D. Kappelman, K.R. Moore, J.K. Allen, S.F. Cook // *Digestive diseases and sciences*. – 2013. – Vol.58, №2. – P. 519-525.

159. Kasperczyk, S. Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers / S. Kasperczyk, M. Dobrakowski, A. Kasperczyk // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 37, №2. – P. 638-647.

160. Kaulmann, A. Bioactivity of polyphenols: preventive and adjuvant strategies toward reducing inflammatory bowel diseases-promises, perspectives, and pitfalls / A. Kaulmann, T. Bohn: [electr. text] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9346470/> (дата обращения: 25.04.2020).

161. Kawaguchi, T. Food antigen-induced immune responses in Crohn's disease patients and experimental colitis mice / T. Kawaguchi, M. Mori, K. Saito // *Journal of Gastroenterol.* – 2014. – Vol.50, №4. – P. 394-405.

162. Khan, H. Polyphenols in the treatment of autoimmune diseases / H. Khan, A. Sureda, T. Belwal, S. Çetinkaya // *Autoimmunity reviews*. – 2019. – Vol.18, №7. – P. 647-657.

163. Kiernan, M.G. Systemic molecular mediators of inflammation differentiate between Crohn's disease and ulcerative colitis, implicating threshold levels of IL-10 and relative ratios of pro-inflammatory cytokines in therapy / M.G. Kiernan, J.C. Coffey, S.M. Sahebally // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2020. – Vol. 14, № 1. – P. 118-119.

164. Kim, J.J. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD / J.J. Kim, M.S. Shajib, M.M. Manocha, W.I. Khan: [electr. text] // *Journal of visualized experiments*. – 2012. – №60. – URL: <https://www.jove.com/video/3678/investigating-intestinal-inflammation-in-dss-induced-model-of-ibd> (дата обращения: 24.04.2020).

165. Kim, J. K. Grim19 attenuates DSS induced colitis in an animal model / J.K. Kim, S.H. Lee, S.Y. Lee: [electr. text] // *PLoS One*. – 2016. – Vol.11, №6. – URL:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0155853>

(дата

обращения: 25.04.2020).

166. Kirchner, T. Flavonoids and 5-Aminosalicylic Acid Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps / T. Kirchner, E. Hermann, S. Möller: [electr. text] // Mediators of inflammation. – 2013. – Vol. 2013. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2013/710239/> (дата обращения: 24.04.2020).

167. Klement, E. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis / E. Klement, R.V. Cohen, J. Boxman // The American journal of clinical nutrition. – 2004. – Vol.80, №5. – P. 1342-1352.

168. Klose, C.S. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages / C.S. Klose, M. Flach, L. Möhle // Cell. – 2014. – Vol.157, №2. – P. 340-356.

169. Knutson, C.G. Chemical and cytokine features of innate immunity characterize serum and tissue profiles in inflammatory bowel disease / C.G. Knutson, A. Mangerich, Y. Zeng // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – Vol. 110, №26. – P. 2332-2341.

170. Knyazev, O.V. Cell therapy of refractory Crohn's disease / O.V. Knyazev, A.I. Parfenov, P.L. Shcherbakov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2013. – Vol.156, №1. – P. 139-145.

171. Ko, Y. Inflammatory Bowel Disease Environmental Risk Factors: A Population-Based Case-Control Study of Middle Eastern Migration to Australia / Y. Ko, V. Kariyawasam, M. Karnib // Clinical gastroenterology and hepatology. – 2015. – Vol.13, №8. – P. 1453-1463.

172. Kochhar, G. Utility of Biomarkers in the Management of Inflammatory Bowel Disease / G. Kochhar, B. Lashner // Current treatment options in gastroenterology. – 2017. – Vol.15, №1. – P. 105-115.

173. Koeberle, A. Multi-target approach for natural products in inflammation / A. Koeberle, O. Werz // *Drug Discovery Today*. – 2014. – Vol.19, №12. – P. 1871-1882.
174. Kolios, G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle / G. Kolios, V. Valatas, S. G. Ward // *Immunology*. – 2004. – Vol.113, №4. – P. 427-437.
175. Korolkova, O.Y. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides / O.Y. Korolkova, J. N. Myers, S.T. Pellom // *Clinical medicine insights. Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 8. – P. 29-44.
176. Kreuter, R. The role of obesity in inflammatory bowel disease / R. Kreuter, M. Wankell, G. Ahlenstiel, L. Hebbard // *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. – 2019. – Vol. 1865, №1. – P. 63-72.
177. Kucharzik, T. Apoptosis of T cells and monocytes in anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease / T. Kucharzik, G. Rogler, H. Herfarth, T. Hibi // *Frontiers of Gastrointestinal Research*. – 2015. – Vol.34. – P. 73-82.
178. Lallès, J.P. Intestinal alkaline phosphatase: Novel functions and protective effects / J. P. Lallès // *Nutrition reviews*. – 2014. – Vol.72, №2. – P. 82-94.
179. Langhorst, J. Systematic review of complementary and alternative medicine treatments in inflammatory bowel diseases / J. Langhorst, H. Wulfert, R. Lauche // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2015. – Vol. 9, №1. – P. 86-106.
180. Larmonier, C.B. Modulation of neutrophil motility by curcumin: Implications for inflammatory bowel disease / C.B. Larmonier, M.T. Midura-Kiela, R. Ramalingam // *Inflammatory bowel diseases*. – 2011. – Vol.17, №2. – P. 503-515.
181. Larmonier, C.B. T Lymphocyte Dynamics in Inflammatory Bowel Diseases: Role of the Microbiome / C.B. Larmonier, K.W. Shehab, F.K. Ghishan, P.R.

Kiela: [electr. text] // BioMed research international. – 2015. – Vol.2015. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/504638/> (дата обращения: 24.04.2020).

182. Lee, J.C. Genome-wide association studies and Crohn's disease / J.C. Lee, M. Parkes // Briefings in functional genomics. – 2011. – Vol.10, №2. – P. 71-76.

183. Lee, S.H. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease / S.H. Lee, J.E. Kwon, M.L. Cho // Intestinal research. – 2018. – Vol.16, №1. – P. 26-42.

184. Legaki, E. Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases / E. Legaki, M. Gazouli // World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics. – 2016. – Vol.7, №1. – P. 112-125.

185. Leong, R.W. Hygiene Hypothesis: Is the Evidence the Same All Over the World? / R.W. Leong, N. Mitrev, Y. Ko // Digestive diseases. – 2016. – Vol.34. – P. 35-42.

186. Levita, J. Andrographolide: A review of its anti-inflammatory activity via inhibition of NF-kappaB activation from computational chemistry aspects / J. Levita, A.A. Nawawi, A. Mutalib, S. Ibrahim // International Journal of Pharmacology. – 2010. – Vol.6. – P. 569-576.

187. Li, J. Innate Lymphoid Cells in Inflammatory Bowel Disease / J. Li, S.C. Glover // Archivum immunologiae et therapeutiae experimentalis. – 2018. – Vol.66, №6. – P. 415-421.

188. Limketkai, B.N. Lower regional and temporal ultraviolet exposure is associated with increased rates and severity of inflammatory bowel disease hospitalization / B.N. Limketkai, T.M. Bayless, S.R. Brant, S.M. Hutfless // Alimentary pharmacology & therapeutics. – 2014. – Vol.40. – P. 508-517.

189. Lin, R. Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease / R. Lin, H. Chen, W. Shu: [electr. text] // Journal of translational medicine. – 2018. – Vol.16, №1.

– URL: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-018-1723-0> (дата обращения: 24.04.2020).

190. Liu, J.Z. Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future / J.Z. Liu, C.A. Anderson // *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. – 2014. – Vol.28, №3. – P. 373-386.

191. Liu, J.Z. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations / J.Z. Liu, S. Van Sommeren, H. Huang // *Nature genetics*. – 2015. – Vol.47, №9. – P. 979-986.

192. Liu, H.P. TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression / H.P. Liu, A.T. Cao, T. Feng // *European journal of immunology*. – 2015. – Vol.45. – P. 1010-1018.

193. Liu, L. Curcumin ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis by blocking STAT3 signaling pathway / L. Liu, Yu Lan Liu, Gong Xiang Liu // *International immunopharmacology*. – 2013. – Vol.17, №2. – P. 314-320.

194. Liu, R.-M. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: a perverse cycle for fibrosis / R.-M. Liu, L.P. Desai // *Redox biology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 565-577.

195. Liu, Y. Epithelial EZH2 serves as an epigenetic determinant in experimental colitis by inhibiting TNF α -mediated inflammation and apoptosis / Y. Liu, J. Peng, T. Sun // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – Vol.114. – P. E3796-E3805.

196. Liu, Z. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 plays a critical role in specific regulation of Th17 cell differentiation / Z. Liu, W. Cao, L. Xu // *Journal of molecular cell biology*. – 2015. – Vol.7. – P. 505-516.

197. Loddo, I. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis / I. Loddo, C. Romano: [electr. text] // *Frontiers in immunology*. – 2015. –

Vol.6. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00551/full> (дата обращения: 25.04.2020).

198. Longman, R.S. CX3CR1+ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22 / R.S. Longman, G.E. Diehl, D.A. Victorio // *The Journal of experimental medicine*. – 2014. – Vol.211. – P. 1571-1583.

199. Lu, Y. Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease / Y. Lu, X. Li, S. Liu: [electr. text] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol.9. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00072/full> (дата обращения: 25.04.2020).

200. Ma, C. IL12/23 or selective IL23 inhibition for the management of moderate-to-severe Crohn's disease? / C. Ma, R. Panaccione, R. Khanna: [electr. text] // *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. – 2019. – Vol.38-39. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S152169181930006X?via%3Dihub>

201. Maconi, G. Pre-illness changes in dietary habits and diet as a risk factor for inflammatory bowel disease: a case-control study / G. Maconi, S. Ardizzone, C. Cucino // *World Journal of Gastroenterology*. – 2010. – Vol.16. – P. 4297-4304.

202. Maddocks, O.D. An Escherichia coli effector protein promotes host mutation via depletion of DNA mismatch repair proteins / O.D. Maddocks, K.M. Scanlon, M.S. Donnenberg: [electr. text] // *MBio*. – 2013. – Vol.4, №3. – URL: <https://mbio.asm.org/content/4/3/e00152-13.long> (дата обращения: 25.04.2020).

203. Magri, G. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells / G. Magri, M. Miyajima, S. Bascones // *Nature immunology*. – 2014. – Vol.15. – P. 354-364.

204. Maheshwari, R.A. Protective effect of simvastatin and rosuvastatin on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats / R.A. Maheshwari, R. Balaraman, G.U. Sailor, D.B. Sen // *Indian Journal of Pharmacology*. – 2015. – Vol.47, №1. – P. 17-21.

205. Makrygiannakis D., Catrina A. I. Apoptosis as a mechanism of action of tumor necrosis factor antagonists in rheumatoid arthritis // *The Journal of Rheumatology*. – 2012. – Vol.39, №4. – P. 679–685.
206. Medina, C. Transforming growth factor-beta type 1 receptor (ALK5) and Smad proteins mediate TIMP-1 and collagen synthesis in experimental intestinal fibrosis / C. Medina, M.J. Santos-Martinez, A. Santana // *The Journal of pathology*. – 2011. – Vol.224, №4. – P. 461-472.
207. Mehta, H. Cigarette smoking and innate immunity / H. Mehta, K. Nazzal, R.T. Sadikot // *Inflammation Research*. – 2008. – Vol.57, №11. – P. 497-503.
208. Michelsen K.S. HMPL-004 (*Andrographis paniculata* extract) prevents development of murine colitis by inhibiting T-cell proliferation and TH1/ TH17 responses / M.H. Wong, L.S. Thomas, S.R. Targan // *Inflammatory Bowel Diseases*. - №19. – P.51–64.
209. Mitsuyama, K. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease / K. Mitsuyama, M. Niwa, H. Takedatsu // *World Journal of Gastroenterology*. – 2016. – Vol.22. – P. 1304-1310.
210. Molodecky, N.A. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review / N.A. Molodecky, I.S. Soon, D.M. Rabi // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol.142, №1. – P. 46-54.
211. Moorthi, C. Curcumin–Piperine/Curcumin–Quercetin/Curcumin–Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug-resistant cancers / C. Moorthi, K. Kathiresan // *Iranian Journal of Medical Hypotheses and Ideas*. – 2013. – Vol.7. – P. 15-20.
212. Morris, G.P. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon / G.P. Morris, P.L. Beck, M.S. Herridge // *Gastroenterology*. – 1989. – Vol.96. – P. 795-803.

213. Mortha, A. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis / A. Mortha, A. Chudnovskiy, D. Hashimoto: [electr. text] // Science. – 2014. – Vol.343. – URL: <https://science.sciencemag.org/content/343/6178/1249288.long> (дата обращения: 25.04.2020).

214. Moschen, A.R. IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting / A.R. Moschen, H. Tilg, T. Raine // Nature reviews. Gastroenterology & hepatology. – 2019. – Vol.16, №3. – P. 185-196.

215. Motilva, V. New paradigms in chronic intestinal inflammation and colon cancer: role of melatonin / V. Motilva, S. Garcia-Maurino, E. Talero, M. Illanes // Journal of Pineal Research. – 2011. – Vol.51, №1. – P. 44-60.

216. Mouzaoui, S. Aminoguanidine and curcumin attenuated tumor necrosis factor (TNF)-alpha induced oxidative stress, colitis and hepatotoxicity in mice / S. Mouzaoui, I. Rahim, B. Djerdjouri // International immunopharmacology. – 2012. – Vol.12. – P. 302-311.

217. Naftali, T. Cannabis for inflammatory bowel disease / T. Naftali, R. Mechulam, L.B. Lev, F.M. Konikoff // Digestive diseases. – 2014. – Vol. 32, №4. – P. 468-474.

218. Naksuriya, O. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment / O. Naksuriya, S. Okonogi, R.M. Schiffelers, W.E. Hennink // Biomaterials. – 2014. – Vol. 35. – P. 3365-3383.

219. Nazareth, N. Prevalence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Escherichia coli in blood samples from patients with inflammatory bowel disease / N. Nazareth, F. Magro, E. Machado // Medical microbiology and immunology. – 2015. – Vol.204, №6. – P. 681-692.

220. Neubauer, K. Peripheral Lymphocytes of Patients with Inflammatory Bowel Disease Have Altered Concentrations of Key Apoptosis Players: Preliminary Results / K. Neubauer, B. Woźniak-Stolarska, M. Krzystek-Korpacka: [electr. text] // *BioMed research international*. – 2018. – Vol. 2018. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/4961753/> (дата обращения: 25.04.2020).
221. Neurath, M.F. IL-23 in inflammatory bowel diseases and colon cancer / M.F. Neurath // *Cytokine Growth Factor Reviews*. – 2019. – Vol.45. – P. 1-8.
222. Nikolaus, S. Immunopharmacology of 5-aminosalicylic acid and of glucocorticoids in the therapy of inflammatory bowel disease / S. Nikolaus, U. Fölsch, S. Schreiber // *Hepatogastroenterology*. – 2000. – Vol.47, №31. – P. 71-82.
223. Novak, E.A. Mitochondrial dysfunction in inflammatory bowel disease / E.A. Novak, K.P. Mollen. – Text: electronic // *Frontiers in Cell and Development Biology*. – 2015. – Vol.3. – URL: [https:// www.frontiersin.org/articles /10.3389/fcell.2015.00062/full](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2015.00062/full) (дата обращения: 24.04.2020).
224. Ohno, M. Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells / M. Ohno, A. Nishida, Y. Sugitani: [electr. text] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12, № 10. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185999> (дата обращения: 24.04.2020).
225. Okazaki, Y. Consumption of curcumin elevates fecal immunoglobulin A, an index of intestinal immune function, in rats fed a high-fat diet / Y. Okazaki, Y. Han, M. Kayahara // *Journal of nutritional science and vitaminology*. – 2010. – Vol.56, №1. – P. 68-71.
226. Omenetti, S. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome / S. Omenetti, T. T. Pizarro // *Frontiers in immunology*. – 2015. – Vol.6. – P. 639.

227. Palmieri, O. Functional implications of microRNAs in Crohn's disease revealed by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling / O. Palmieri, T.M. Creanza, F. Bossa // International journal of molecular sciences. – 2017. – Vol.18, №7. – P. 1580.

228. Pan, M.H. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NFkappaB activation in macrophages / M.H. Pan, S.Y. Lin-Shiau, J.K. Lin // Biochemical pharmacology. – 2000. – Vol.60, №11. – P. 1665-1676.

229. Panés, J. Tofacitinib for induction and maintenance therapy of Crohn's disease: Results of two phase IIb randomised placebo-controlled trials / J. Panés, W.J. Sandborn, S. Schreiber // Gut. – 2017. – Vol.66, №6. – P. 1049-1059.

230. Papamichael, K. *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: is there a link? / K. Papamichael, P. Konstantopoulos, G.J. Mantzaris // World Journal of Gastroenterology. – 2014. – Vol.20, №21. – P. 6374-6385.

231. Paramsothy, S. Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis / S. Paramsothy, R. Paramsothy, D.T. Rubin // Journal of Crohn's & colitis. – 2017. – Vol.11, №10. – P. 1180-1199.

232. Park, H.J. Identification of OCTN2 variants and their association with phenotypes of Crohn's disease in a Korean population / H.J. Park, E.S. Jung, K.A. Kong: [electr. text] // Scientific reports. – 2016. – Vol.6. – URL: <https://www.nature.com/articles/srep22887> (дата обращения: 24.04.2020).

233. Parkes, G.C. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect / G.C. Parkes, K. Whelan, J.O. Lindsay // Journal of Crohn's & colitis. – 2014. – Vol. 8, № 8. – P. 717-725.

234. Peng, L. Effects of curcumin on mRNA expression of cytokines related to toll-like receptor 4 signaling in THP-1 cells / L. Peng, X. Li, S. Song // Chinese Journal of Dermatology – 2010. – Vol.43. – P. 493-496.

235. Peterson, C.T. Effects of turmeric and curcumin dietary supplementation on human gut microbiota: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study / C.T. Peterson, A.R. Vaughn, V. Sharma // *Journal of evidence-based integrative medicine*. – 2018. – Vol.23. – P. 1-8.

236. Philpott, H.L. Drug-induced gastrointestinal disorders / H.L. Philpott, S. Nandurkar, J. Lubel, P.R. Gibson // *Postgrad Med J*. – 2014. – Vol.90. – P. 411-419.

237. Pillai, N. A systematic review of cost-effectiveness studies comparing conventional, biological and surgical interventions for inflammatory bowel disease / N. Pillai, M. Dusheiko, B. Burnand, V. Pittet: [electr. text] // *PLoS One*. – 2017. – 12(10). – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185500> (дата обращения: 25.04.2020).

238. Plavec, T.V. Engineered *Lactococcus lactis* Secreting IL-23 Receptor-Targeted REX Protein Blockers for Modulation of IL-23/Th17-Mediated Inflammation / T.V. Plavec, M. Kuchař, A. Benko: [electr. text] // *Microorganisms*. – 2019. – Vol.7, №5. – URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/5/152> (дата обращения: 25.04.2020).

239. Pluta, R. Mutual Two-Way Interactions of Curcumin and Gut Microbiota / R. Pluta, S. Januszewski, M. Ułamek-Kozioł: [electr. text] // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol.21, №3. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/3/1055> (дата обращения: 25.04.2020).

240. Prosberg, M. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: A systematic review and meta-analysis / M. Prosberg, F. Bendtsen, I. Vind // *Scandinavian journal of gastroenterology*. – 2016. – Vol.51. – P. 1407-1415.

241. Panchard, N.A. Mechanism of action of 5-aminosalicylic acid / N.A. Panchard, S.M. Greenfield, R.P.H. Thompson // *Mediators of inflammation*. – 1992. – Vol.1, №3. – P. 151-165.

242. Quezada, S.M. Adverse events in IBD therapy: the 2018 update / S.M. Quezada, L.P. McLean, R.K. Cross // Expert review of gastroenterology & hepatology. – 2018. – Vol.12, №12. – P. 1183-1191.

243. Randhawa, P.K. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents / P.K. Randhawa, K. Singh, N. Singh, A.S. Jaggi // The Korean journal of physiology & pharmacology. – 2014. – Vol.18, №4. – P. 279-288.

244. Ray, G. Epigenetics, DNA Organization, and Inflammatory Bowel Disease / G. Ray, M.S. Longworth // Inflammatory bowel diseases. – 2019. – Vol.25, №2. – P. 235-247.

245. Recio, M.C. Anti-inflammatory agents from plants: Progress and potential / M.C. Recio, I. Andujar, J.L. Rios // Current medicinal chemistry. – 2012. – Vol.19. – P. 2088-2103.

246. Rehman, H. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ attenuates liver fibrosis in mice / H. Rehman, Q. Liu, Y. Krishnasamy // International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology. – 2016. – Vol.8, №1. – P. 14-27.

247. Rice, K.M. Environmental mercury and its toxic effects / K.M. Rice, E.M. Walker, M. Wu // Journal of preventive medicine and public health. – 2014. – Vol.47. – P. 74-83.

248. Richter, K. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison / K. Richter, T. Kietzmann // Cell and tissue research. – 2016. – Vol.365, №3. – P. 591-605.

249. Ringheim, G.E. Teriflunomide attenuates immunopathological changes in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis / G.E. Ringheim, L. Lee, L. Laws-Ricker // Frontiers in neurology. – 2013. – Vol. 4. – P. 169.

250. Rodrigues de Carvalho, L. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats / L. Rodrigues de Carvalho, T.V. de Brito, J.

Simião da C Júnior // *Biomedicine & pharmacotherapy*. – 2018. – Vol.102. – P. 278-285.

251. Salim, S.Y. Air pollution effects on the gut microbiota: a link between exposure and inflammatory disease / S.Y. Salim, G.G. Kaplan, K.L. Madsen // *Gut Microbes*. – 2014. – Vol.5. – P. 215-219.

252. Saruta, M. Lymphocyte homing antagonists in the treatment of inflammatory bowel diseases / M. Saruta, K.A. Papadakis // *Gastroenterology clinics of North America*. – 2014. – Vol.43, №3. – P. 581-601.

253. Saxena, A. Dietary Agents and Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Experimental Ulcerative Colitis / A. Saxena, K. Kaur, S. Hegde // *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. – 2014. – №4. – P. 203-217.

254. Sazuka, S. Fibrocytes are involved in inflammation as well as fibrosis in the pathogenesis of Crohn's disease / S. Sazuka, T. Katsuno, T. Nakagawa // *Digestive diseases and sciences*. – 2014. – Vol.59, №4. – P. 760-768.

255. Scarozza P. Oligonucleotides — A Novel Promising Therapeutic Option for IBD / P. Scarozza, H. Schmitt, G. Monteleone, M. F. Neurath, R. Atrey: [electr. text] // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – Vol.10. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00314/full?report=reader> (дата обращения 24.04.2020)

256. Scarpa, M. Epigenetics: concepts and relevance to IBD pathogenesis / M. Scarpa, E. Stylianou // *Inflammatory bowel diseases*. – 2012. – Vol.18. – P. 1982-1996.

257. Schulman, J. P435 Maintenance of remission with partial enteral nutrition therapy in pediatric Crohn's disease: a retrospective study / J. Schulman, R. Shaoul: [electr. text] // *Journal of Crohn's & colitis*. – 2014. – Vol.8, suppl. 2. – URL: https://academic.oup.com/ecco-jcc/article/8/Supplement_2/S434/339871 (дата обращения: 25.04.2020).

258. Scott, K.P. The influence of diet on the gut microbiota / K.P. Scott, S.W. Gratz, P.O. Sheridan // *Pharmacological research*. – 2013. – Vol.69, №1. – P. 52-60.
259. Scribano, M.L. Use of antibiotics in the treatment of Crohn's disease / M.L. Scribano, C. Prantera // *World Journal of Gastroenterology*. – 2013. – Vol.19, №5. – P. 648-653.
260. Sebastián, V.P. Heme Oxygenase-1 as a Modulator of Intestinal Inflammation Development and Progression / V.P. Sebastián, G.A. Salazar, I. Coronado-Arrázola: [electr. text] // *Frontiers in immunology*. – 2018. – Vol.9. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01956/full> (дата обращения: 25.04.2020).
261. Segal, A.W. Studies on patients establish Crohn's disease as a manifestation of impaired innate immunity / A.W. Segal // *Journal of internal medicine*. – 2019. – Vol.286, №4. – P. 373-388.
262. Sehgal, A. Combined effects of curcumin and piperine in ameliorating benzo (a) pyrene induced DNA damage / A. Sehgal, M. Kumar, M. Jain, D.K. Dhawan // *Food and chemical toxicology*. – 2011. – Vol.49. – P. 3002-3006.
263. Senhaji, N. The contribution of CD40/CD40L axis in inflammatory bowel disease: an update / N. Senhaji, K. Kojok, Y. Darif: [electr. text] // *Frontiers in Immunology*. – 2015. – Vol.6. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00529/full> (дата обращения: 23.04.2020).
264. Shah, S. Immunoglobulin therapy for refractory Crohn's disease / S. Shah, J. Terdiman, K. Gundling, U. Mahadevan // *Therapeutic advances in gastroenterology*. – 2014. – Vol.7, №2. – P. 99-102.
265. Shaw, S.Y. Association between spring season of birth and Crohn's disease / S.Y. Shaw, Z. Nugent, L.E. Targownik // *Clinical gastroenterology and hepatology*. – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 277-282.

266. Shehzad, A. Curcumin in cancer chemoprevention: Molecular targets, pharmacokinetics, bioavailability, and clinical trials / A. Shehzad, F. Wahid, Y.S. Lee // *Archiv der Pharmazie*. – 2010. – Vol. 343. – P. 489-499.

267. Shen, L. Regulative effects of curcumin spice administration on gut microbiota and its pharmacological implications / L. Shen, L. Liu, H.F. Ji: [electr. text] // *Food & nutrition research*. – 2017. – Vol.61, №1. – URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/16546628.2017.1361780> (дата обращения: 24.04.2020).

268. Shishodia, S. Modulation of transcription factors by curcumin / S. Shishodia, T. Singh, M.M. Chaturvedi // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2007. – Vol. 595. – P.127-148.

269. Shmuel-Galia, L. Neutralization of pro-inflammatory monocytes by targeting TLR2 dimerization ameliorates colitis / L. Shmuel-Galia, T. Aychek, A. Fink // *The EMBO journal*. – 2016. – Vol.35, №6. – P. 685-698.

270. Shouval, D.S. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans / D.S. Shouval, J. Ouahed, A. Biswas // *Advances in immunology*. – 2014. – Vol. 122. – P. 177-210.

271. Singh, U.P. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients / U.P. Singh, N.P. Singh, E.A. Murphy // *Cytokine*. – 2016. – Vol. 77. – P. 44-49.

272. Socca, E.A. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha and cyclooxygenase-2 by Isatin: a molecular mechanism of protection against TNBS-induced colitis in rats / E.A. Socca, A. Luiz-Ferreira, F.M. de Faria // *Chemico-Biological Interactions*. – 2014. – Vol. 209. – P. 48-55.

273. Song, L. Polymeric micelles for parenteral delivery of curcumin: Preparation, characterization and in vitro evaluation / L. Song, Y.Y. Shen, J.W. Hou //

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2011. – Vol 390, №1-3. – P. 25-32.

274. Song, W.B. Curcumin protects intestinal mucosal barrier function of rat enteritis via activation of MKP-1 and attenuation of p38 and NF- κ B activation / W.B. Song, Y.Y. Wang, F.S. Meng: [electr. text] // PLoS ONE. – 2010. – Vol.5, №9. – URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012969> (дата обращения: 24.04.2020).

275. Soubieres, A.A. Emerging role of novel biomarkers in the diagnosis of inflammatory bowel disease / A.A. Soubieres, A. Poullis // World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics. – 2016. – Vol.7, №1. – P. 41-50.

276. Steidler, L. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10 / L. Steidler, W. Hans, L. Schotte // Science. – 2000. – Vol. 289. – P. 1352-1355.

277. Stenke, E. Crohn's Strictures-Moving Away from the Knife / E. Stenke, B. Bourke, U. Knaus // Frontiers in pediatrics. – 2017. – Vol.16, №5. – P. 141.

278. Strober, W. The fundamental basis of inflammatory bowel disease / W. Strober, I. Fuss, P. Mannon // The Journal of clinical investigation. – 2007. – Vol. 117. – P. 514-521.

279. Stylianou, E. Recent Advances in the Etiopathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: The Role of Omics / E. Stylianou // Molecular diagnosis and therapy. – 2018. – Vol.22, №1. – P. 11-23.

280. Su, H.J. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates / H.J. Su, Y.T. Chiu, C.T. Chiu // Journal of the Formosan Medical Association. – 2019. – Vol.118, №7. – P.1083-1092.

281. Subramanian, S. Recent advances in clinical practice: a systematic review of isolated colonic Crohn's disease: the third IBD? / S. Subramanian, A. Ekbom, J.M. Rhodes // Gut. – 2017. – Vol. 66, № 2. – P. 362-381.

282. Sun, J. Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability / J. Sun, C. Bi, H.M. Chan // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces.* – 2013. – Vol.111. – P. 367-375.

283. Suskind, D.L. Tolerability of curcumin in pediatric inflammatory bowel disease: a forced-dose titration study / D.L. Suskind, G. Wahbeh, T. Burpee // *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.* – 2013. – Vol.56, №3. – P. 277-279.

284. Taghipour, N. Potential treatment of inflammatory bowel disease: a review of helminths therapy / N. Taghipour, H.A. Aghdai, A. Haghghi // *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* – 2014. – Vol.7, №1. – P. 9-16.

285. Tang, J. Mesalamine protects against colorectal cancer in inflammatory bowel disease. / J. Tang, O. Sharif, C. Pai, A.L. Silverman // *Digestive diseases and sciences.* – 2010. – Vol.55, №6. – P. 1696-1703.

286. Tang, J. P436 Intravenous cyclophosphamide combined with thalidomide has a promising effect in refractory Crohn's disease / J. Tang, X. Gao, M. Zhi // *Journal of Crohn's & colitis.* – 2014. – Vol. 8, suppl.1. – P. S247-S248.

287. Te Velde, A.A. Glutathione peroxidase 2 and aquaporin 8 as new markers for colonic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases: an important role for H₂O₂? / A.A. Te Velde, I. Pronk, F. de Kort, P.C. Stokkers // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* – 2008. – Vol.20, №6. – P. 555-560.

288. Tian, T. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies / T. Tian, Z. Wang, J. Zhang: [electr. text] // *Oxidative medicine and cellular longevity.* – 2017. – Vol. 2017. – URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/4535194/> (дата обращения: 24.04.2020).

289. Titz, B. Proteomics and Lipidomics in Inflammatory Bowel Disease Research: From Mechanistic Insights to Biomarker Identification / B. Titz, R.M. Gadaleta, G. Lo Sasso: [electr. text] International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol.19, №9. – URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2775> (дата обращения: 24.04.2020).

290. Tomlinson, M.L. Flavonoids from Engineered Tomatoes Inhibit Gut Barrier Pro-Inflammatory Cytokines and Chemokines, via SAPK/JNK and p38 MAPK Pathways / M.L. Tomlinson, E. Butelli, C. Martin, S.R. Carding: [electr. text] // Frontiers in nutrition. – 2017. – Vol.4. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2017.00061/full> (дата обращения: 25.04.2020).

291. Tsuda, T. Curcumin as a functional food-derived factor: Degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives / T. Tsuda // Food & function. – 2018. – Vol.9, №2. – P. 705-714.

292. van Bodegraven, A.A. Indications for 5-aminosalicylate in inflammatory bowel disease: is the body of evidence complete? / A.A. van Bodegraven, C.J. Mulder // World Journal of Gastroenterology. – 2006. – Vol.12, №38. – P. 6115-6123.

293. van der Heide, F. Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis / F. van der Heide, A. Dijkstra, R.K. Weersma // Inflammatory bowel diseases. – 2009. – Vol.15. – P. 1199-1207.

294. Van Dussen, K.L. Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease / K.L. Van Dussen, T.C. Liu, D. Li // Gastroenterology. – 2014. – Vol. 146, №1. – P. 200-209.

295. Vanhove, W. Therapeutic innovations in inflammatory bowel diseases / W. Vanhove, K. Nys, S. Vermeire // Clinical pharmacology and therapeutics. – 2016. – Vol.99, №1. – P. 49-58.

296. Vavricka, S.R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease / S.R. Vavricka, A. Schoepfer, M. Scharl // *Inflammatory Bowel Diseases*. – 2015. – Vol.21, №8. – P. 1982-1992.

297. Venkateswaran, S. Neutrophil GM-CSF signaling in inflammatory bowel disease patients is influenced by non-coding genetic variants / S. Venkateswaran, L.A. Denson, I. Jurickova: [electr. text] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol.9, №1. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-45701-2> (дата обращения: 24.04.2020).

298. Ventham, N.T. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics / N.T. Ventham, N.A. Kennedy, E.R. Nimmo, G. Satsangi // *Gastroenterology*. – 2013. – Vol. 145. – P. 293-308.

299. Verstockt, B. Genome-wide association studies in Crohn's disease: Past, present and future / B. Verstockt, K. Gc. Smith, J.C. Lee: [electr. text] // *Clinical & translational immunology*. – 2018. – Vol.7, №1. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5822399/> (дата обращения: 18.04.2020).

300. Vilahur, G. Antiplatelet properties of natural products / G. Vilahur, L. Badimon // *Vascular Pharmacology*. – 2013. – Vol.59. – P. 67-75.

301. Wallace, C. Understanding real-world biologic maintenance dosing patterns among pediatric ulcerative colitis and Crohn's disease patients / C. Wallace, R. Coletti, W. Komocsar, C. Liu // *Inflammatory bowel disease*. – 2021. – Vol.27, №1. – P. 23.

302. Wang, M.C. PRISMA – efficacy and safety of vedolizumab for inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / M.C. Wang, L.Y. Zhang, W. Han: [electr. text] // *Medicine (Baltimore)*. – 2014. – Vol.93, №28. – URL: <https://journals.lww.com/md->

journal/Fulltext/2014/12030/PRISMA_Efficacy_and_Safety_of_Vedolizumab_for.60.aspx (дата обращения: 24.04.2020).

303. Wang, X. Protective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-d-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* thunb, on experimental colitis in mice / X. Wang, L. Zhao, T. Han // *European journal of pharmacology*. – 2008. – Vol. 578. – P. 339-348.

304. Wedeby Schmidt, E.G. TH17 cell induction and effects of IL-17A and IL-17F blockade in experimental colitis / E.G. Wedeby Schmidt, H.L. Larsen, N.N. Kristensen // *Inflammatory bowel diseases*. – 2013. – Vol.19. – P. 1567-1576.

305. Weisshof, R. Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Disease / R. Weisshof, K. El Jurdi, N. Zmeter // *Advances in therapy*. – 2018. – Vol.35, №11. – P. 1746-1762.

306. Wöbke, T.K. Vitamin D in inflammatory diseases / T.K. Wöbke, B.L. Sorg, D. Steinhilber: [electr. text] // *Frontiers in physiology*. – 2014. – Vol.5. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2014.00244/full> (дата обращения: 24.04.2020).

307. Wu, J.C. Chemopreventative effects of tetrahydrocurcumin on human diseases / J.C. Wu, M.L. Tsai, C.S. Lai // *Food and function*. – 2014. – №1. – P. 12-17.

308. Yao, J. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR- γ /NFAT / J. Yao, Y. Lu, M. Zhi // *Molecular medicine reports*. – 2017. – Vol.16, №6. – P. 8315-8322.

309. Yao, J.Y. Inhibition of the interleukin-23/interleukin-17 pathway by anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced Crohn's disease in rats / J.Y. Yao, Y. Lu, M. Zhi // *Molecular medicine reports*. – 2014. – Vol.10. – P. 2105-2110.

310. Yarani, R. The emerging role of lncRNAs in inflammatory bowel disease / R. Yarani, A.H. Mirza, S. Kaur, F. Pociot // *Experimental & molecular medicine*. – 2018. – Vol.50, №12. – P. 161.
311. Zhao, M. Dietary Fiber Intake is Associated with Increased Colonic Mucosal GPR43+ Polymorphonuclear Infiltration in Active Crohn's Disease / M. Zhao, W. Zhu, J. Gong // *Nutrients*. – 2015. – Vol.7, №7. – P. 5327-5346.
312. Zhen, Y. NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease / Y. Zhen, H. Zhang: [electr. text] // *Frontiers in immunology*. – 2019. – Vol. 10. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.00276/full> (дата обращения: 24.04.2020).
313. Zheng, Y. miR-155 Regulates IL-10-Producing CD24^{hi}CD27⁺ B Cells and Impairs Their Function in Patients with Crohn's Disease / Y. Zheng, W. Ge, Y. Ma: [electr. text] // *Frontiers in immunology*. – 2017. – Vol. 8. – URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00914/full> (дата обращения: 24.04.2020).
314. Zhou, G.X. Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease / G.X. Zhou, Z.J. Liu // *Journal of digestive diseases*. – 2017. – Vol.18, №9. – P. 495-503.
315. Zhou, M. Atomic structure of the apoptosome: Mechanism of cytochrome c- and dATP-mediated activation of Apaf-1 / M. Zhou, Y. Li, Q. Hu // *Genes & Development*. – 2015. – Vol.29, №22. – P. 2349-2361.
316. Zhu, T. Vitamin D/VDR signaling pathway ameliorates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by inhibiting intestinal epithelial apoptosis / T. Zhu, T.J. Liu, Y.Y. Shi, Q. Zhao // *International journal of molecular medicine*. – 2015. – Vol. 35. – P. 1213-1218.