

## ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТА CURCUMA LONGA В СОСТАВЕ РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ КРОНА

Осиков М.В.<sup>1</sup>, Симонян Е.В.<sup>1</sup>, Бакеева А.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Челябинск, e-mail: a.kurenkova01@yandex.ru

Актуальными задачами современной гастроэнтерологии являются разработка состава, патогенетическое обоснование применения, доклиническая и клиническая апробация новых лекарственных средств для терапии болезни Крона (БК) с минимальным спектром побочных эффектов и хорошей переносимостью. Цель работы – изучить влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях оригинального состава на концентрацию в сыворотке крыс IgG, IgM и IL-23 при экспериментальной БК. Работа выполнена на 49 крысах линии Wistar, БК моделировали однократным ректальным введением 30 мг 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты. Ректальные суппозитории с экстрактом куркумы оригинального состава готовили на основе полиэтиленгликоля и применяли каждые 12 часов от индукции БК. Концентрацию в сыворотке IL-23, IgG и IgM определяли с помощью специфических для крыс тест-систем на иммуноферментном анализаторе на 3-и, 5-е и 7-е сутки эксперимента. Установлено, что при экспериментальной БК на 3-и, 5-е и 7-е сутки наблюдения в сыворотке увеличивается концентрация IgG, IgM и IL-23, максимальный уровень в сыворотке IgG, IgM регистрируется на 5-е сутки, а IL-23 – на 3-и сутки наблюдения. Применение при экспериментальной БК экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториях оригинального состава с интервалом в 12 часов приводит к снижению концентрации в сыворотке IgM, IgG и IL-23 на 3-и, 5-е и 7-е сутки эксперимента, при этом уровень IgG и IL-23 восстанавливался частично, а IgM – полностью во все сроки наблюдения, что свидетельствует о системных иммунотропных эффектах экстракта куркумы после локального применения и является предпосылкой для проведения дальнейших доклинических исследований по изучению эффективности локального применения куркумина при БК.

Ключевые слова: Болезнь Крона, IgG, IgM, IL-23, куркума, ректальные суппозитории

## IMMUNE EFFECTS OF CURCUMA LONGA EXTRACTUM AS A PART OF RECTAL SUPPOSITORIES IN EXPERIMENTAL CROHN'S DISEASE

Osikov M.V.<sup>1</sup>, Simonyan E.V.<sup>1</sup>, Bakeeva A.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> South Ural State Medical University, Ministry of health of the Russian Federation, Chelyabinsk, e-mail: a.kurenkova01@yandex.ru

One of the most important tasks of modern gastroenterology is the development of the composition, pathogenetic rationale, preclinical and clinical approbation of new drugs for the treatment of Crohn's disease (CD) with a minimal range of side effects and good tolerability. The aim of work is to study the effect of turmeric extract in the composition of rectal suppositories of the original composition on the serum concentration of IgG, IgM and IL-23 in experimental CD. The work was performed on 49 Wistar rats; CD was induced by a single rectal injection of 30 mg of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. Rectal suppositories with turmeric extract of the original composition were developed on the basis of polyethylene glycol and used every 12 hours from induction of CD. Serum concentrations of IL-23, IgG and IgM were determined using rat-specific test systems on an immunoassay analyzer on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of the experiment. It was established that with experimental CD, the concentration of IgG, IgM and IL-23 in serum on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days increases, the maximum level in serum IgG, IgM is observed on day 5, and IL-23 - on day 3. The use of an extract of turmeric in the composition of rectal suppositories of an original composition with an interval of 12 hours leads to a decrease in serum IgM, IgG and IL-23 on the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> days of the experiment, while the level of IgG and IL-23 was partially restored, and IgM - was restored completely during all periods of observation, that fact indicates the systemic immune effects of turmeric extract after local use and could be a prerequisite for the further preclinical studies on the effectiveness of local curcumin use in CD.

Keywords: Crohn's disease, Ig G, Ig M, IL-23, curcumin, rectal suppositories

Болезнь Крона (БК) является хронической патологией, характеризующейся трансмуральным гранулематозным воспалением, так называемым сегментарным поражением

различных отделов желудочно-кишечного тракта, с преимущественной локализацией процесса в терминальном отделе подвздошной и проксимальной части ободочной кишки [1]. На сегодняшний день БК представляет собой актуальную проблему современной гастроэнтерологии в связи с продолжающимся ростом ее частоты и распространенности, прогрессирующим течением, тяжестью осложнений, а также сложностями терапии. Согласно данным Российской ассоциации колопроктологов и ассоциации гастроэнтерологов по диагностике и лечению БК, заболеваемость БК в Российской Федерации составляет от 0,3 до 20,2 на 100 тыс., в то время как распространенность достигает 322 на 100 тыс. Кроме того, распространенность БК выше в северных широтах и западной части Российской Федерации, но ниже в азиатской части страны. При этом отмечено, что в последние годы эта грань стирается [2]. Используемые в настоящее время базисные методы лечения БК направлены на индукцию и поддержание ремиссии и представляют собой применение производных 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), кортикостероидов, иммуносупрессантов, использование биологической терапии, в частности применение моноклональных антител против ТНФ-альфа, а также включают хирургические подходы. При этом известно, что на сегодняшний день примерно треть пациентов, страдающих БК, нечувствительны к традиционной терапии, у многих из них в ходе лечения развиваются непереносимость, диспепсия, анемия, гиперчувствительность и прочие побочные эффекты. Таким образом, выбор стратегии альтернативного лечения является чрезвычайно сложной задачей по причине того, что ни один из используемых в настоящее время терапевтических подходов не может обеспечить однозначного положительного эффекта, а именно предотвращения рецидивов и осложнений, длительной ремиссии и отсутствия побочных эффектов [3]. Поэтому разработка новых терапевтических подходов, так же как и поиск терапевтически эффективных лекарственных препаратов с минимальным количеством побочных эффектов, при БК является актуальной задачей. В данном отношении особый интерес представляет куркума длинная (лат. *Curcuma longa*), которая используется в медицине и фармации в виде корневищ. Основными действующими веществами корневищ куркумы является так называемый куркуминоидный комплекс, одним из компонентов которого служит куркумин, обладающий антиоксидантными, цитопротекторными, а также противовоспалительными свойствами. По данным результатов исследований, проведенных в течение последних пятидесяти лет, **куркумин продемонстрировал особенности его фармакокинетики** в совокупности с эффективностью и безопасностью в отношении ряда воспалительных заболеваний человека, в частности в отношении воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК). Помимо этого, имеются данные о плейотропной активности куркумина, которая обусловлена его способностью модулировать различные сигнальные пути: продукцию провоспалительных цитокинов,

циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), С-реактивного белка (СРБ), простагландина E2, креатинина и пр. [4]. Тем не менее зарегистрированные на территории Российской Федерации лекарственные формы для локального применения куркумина в клинической практике отсутствуют, а сведения о механизме действия куркумина при ВЗК крайне малочисленны и противоречивы. При этом у большей части больных с БК наблюдаются легкие и среднетяжелые формы заболевания, при которых эффективно применение локальной терапии в виде суппозиториев, пены и иных лекарственных форм. В патогенезе поражения слизистой оболочки толстого кишечника при БК имеет значение активация моноцитов/макрофагов при участии ИЛ-23. Кроме этого, в последнее время пересматриваются представления о роли в развитии БК исключительно Th1-зависимых реакций. Полагают, что в патогенезе заболевания не меньшее значение имеют Th2-зависимые реакции с увеличением продукции IgM и IgG [4, 5].

**Цель работы** – изучить влияние экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев оригинального состава на концентрацию в сыворотке крыс IgG, IgM и ИЛ-23 при экспериментальной БК.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на 49 белых крысах линии Wistar массой 240–260 г в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18.06.2007, Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Случайным образом были сформированы 3 группы крыс: I (n=7) – интактный контроль; II (n=21) – животные с БК; III (n=21) – животные с БК в условиях применения ректальных суппозиториев с куркумином. БК моделировали в соответствии с алгоритмом, описанным Morris et al. [6]: 30 мг сухой тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС) («Sigma-aldrich», USA) растворяли в 150 мл 50%-ного этанола, после чего ректально вводили 0,25 мл полученного раствора ТНБС с помощью медицинского полиуретанового катетера с внешним диаметром, равным 2 мм, на глубину 8 см [7]. Животные были лишены корма за 24 часа до начала исследования, для общей анестезии был использован препарат «Золетил-100» («Zoletil», «Virbac SanteAnimale», Франция) в дозе 20 мг/кг. Развитие БК верифицировали по клинической картине и морфологии очага повреждения в толстом кишечнике. Верификацию БК осуществляли по клинической картине и морфологическим изменениям в толстом кишечнике. Ректальные суппозитории для крыс массой 0,3 грамма, содержащие 10%-ный экстракт куркумы длиной **массой** (Curcuma longa L., Диамарт, Индия) оригинального состава **тема охраноспособна, подана заявка на изобретение** готовили на основе смеси полиэтиленгликолей различной молекулярной массы («Sigma aldrich», Германия) с

использованием комплекса фармакотехнологических исследований и применяли каждые 12 часов с момента индукции БК. Исследования проводили на 3-и, 5-е и 7-е сутки с момента индукции исследуемой патологии. Концентрацию в сыворотке IgG, IgM и IL-23 определяли с помощью специфических для крыс тест-систем фирмы «ELISA Kit» (Китай) на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия). Данные обрабатывали с помощью пакета программ «Statistica 10.0 for Windows». Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q<sub>25</sub> – Q<sub>75</sub>)», где Me – медиана, Q<sub>25</sub>, Q<sub>75</sub> – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца). Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования и их обсуждение.** Нами установлено, что при экспериментальной БК изменяются исследуемые показатели иммунного статуса (табл.). Концентрация в сыворотке IgM возрастает на 3-и, 5-е, 7-е сутки наблюдения соответственно на 62%, 91%, 63% по медиане относительно группы интактных животных и достигает максимальных значений на 5-е сутки исследуемой патологии. Концентрация IgG в сыворотке возрастает на 3-и, 5-е и 7-е сутки наблюдения соответственно в 5,7; 9 и 3,6 раза по медиане относительно группы интактных животных и достигает максимальных значений на 5-е сутки БК. Содержание в сыворотке IL-23 при БК увеличивается на 3-и, 5-е и 7-е сутки наблюдения соответственно в 2,34; 2,22 и 1,67 раза по медиане относительно группы интактных животных с максимальным уровнем на 3-и сутки наблюдения.

Применение у крыс с БК ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы оригинального состава приводит к статистически значимому снижению концентрации в сыворотке IgM на 3-и, 5-е и 7-е сутки наблюдения с максимальным эффектом на 7-е сутки (табл.). Отметим, что уровень IgM в сыворотке снижался и достигал значений в группе интактных животных, что позволяет констатировать полное восстановление значений данного показателя в условиях применения куркумы. Концентрация IgG в сыворотке снижается на 3-и, 5-е и 7-е сутки с максимальным эффектом на 7-е сутки эксперимента, однако во все сроки наблюдения уровень IgG в сыворотке значимо отличался от значений в группе интактных животных, что свидетельствует о частичном восстановлении данного показателя. Концентрация IL-23 в сыворотке при БК в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом куркумы снижается на 3-и, 5-и и 7-е сутки эксперимента, показатель восстанавливался частично, так как зафиксированы его значимые различия с группой интактных животных во все сроки наблюдения. Обнаруженные нами изменения иммунного статуса при экспериментальной БК свидетельствуют о роли Th2-зависимых реакций в повреждении стенки кишечника с участием IgM и IgG и соответствуют новым данным о смене устоявшейся парадигмы о преимущественно Th1-иммунном ответе при БК.

Влияние локального применения экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий  
на концентрацию IgG, IgM и IL-23 в сыворотке крыс при экспериментальной БК (Ме (Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub>))

Показатели	Группа I Интактные (n=7)	Группа II БК 3-и сутки (n=7)	Группа II БК 5-е сутки (n=7)	Группа II БК 7-е сутки (n=7)	Группа III БК+ККМ 3-и сутки (n=7)	Группа III БК+ККМ 5-е сутки (n=7)	Группа III БК+ККМ 7-е сутки (n=7)
Ig G, г/л	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) * #
Ig M, г/л	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) #
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<0,01) различия с группой I, # – с группой II.							

Другими исследователями также отмечены повышение концентрации IgG в сыворотке при БК и ее корреляция с концентрацией в плазме С-РБ, СОЭ, эндоскопическими и клиническими индексами активности заболевания [8]. Помимо этого, известен ряд исследований, подтверждающих повышение концентрации IgG, IgM и IL-23 в сыворотке пациентов, страдающих БК, в сравнении со здоровыми добровольцами, полученные значения коррелируют со степенью тяжести заболевания [9]. Известно, что при БК продукты клеточной стенки бактерий кишечного микробиома приводят к активации макрофагов, что влечет за собой специфическую презентацию комплекса антиген-антитело на их поверхности, активации и пролиферации CD4+ лимфоцитов с последующей активацией пролиферации и дифференцировки В-клеток, увеличением числа Ig-продуцирующих плазматических клеток [10].

Увеличение концентрации IL-23 в сыворотке подтверждает данные о формировании цитокинового дисбаланса при БК за счет секреции провоспалительных цитокинов, в том числе и ИЛ-23, а также роли Th1-зависимых реакций иммунного ответа в патогенезе БК (в частности, о значении активации фагоцитирующих клеток и увеличении продукции IL-23 – мощного хемоаттрактанта, стимулятора поглотительной и киллинговой активности нейтрофилов, моноцитов, макрофагов). Известно, что при участии IL-23 происходят дифференциация Th0 в Th17 лимфоциты, а также активация лимфоидных клеток врожденного иммунитета, имеющих значение в патогенезе БК [11]. Установлена роль Th17-зависимого иммунного ответа в патогенезе БК, опосредованная эффектами цитокинов семейства IL-17, IL-21, и IL-22, с последующей активацией NF-κB, MAPK и STAT3-зависимых путей в эпителиоцитах кишечника, эндотелиоцитах, моноцитах/макрофагах, фибробластах, нейтрофилах.

Рядом авторов были зафиксированы иммуотропные эффекты куркумина. Так, например, Golombick T. et al. отметили снижение концентрации IgG вследствие перорального применения куркумы в дозе 6 г/день в течение нескольких месяцев у пациентов с тяжелой тлеющей миеломой [12]. Кроме того, по данным другого исследования применение куркумина в дозе 20 мг/кг у крыс-альбиносов приводит к снижению концентрации IgG в терапии кишечного шистосомоза, вызванного шистосомой Мансона (S. Mansoni) [13]. Помимо этого, в исследовании Таһа N. et. al снижение концентрации IgG и IgM происходило вследствие перорального введения 1% порошка корня куркумы крысам-альбиносам в течение 11 дней при отравлении свинцом [14]. Механизм действия куркумина, приводящий к снижению продукции IgG и IgM, на сегодняшний день точно не ясен. В исследованиях Santazaro M. et al. сообщается о способности куркумина ингибировать продукцию IL-2 и IFN-γ Т-лимфоцитами селезенки, а также IL-12 и фактора некроза опухоли (ФНО-α) – перитонеальными макрофагами брюшной полости. Сообщается о способности куркумина ингибировать миграцию нейтрофилов из сосудистого русла в ткани, что приводит к уменьшению их повреждения [15]. Таким образом, применение куркумина предположительно приводит к ограничению иммунного ответа,

продукции Ig, провоспалительных цитокинов, ферментов и иных факторов, участвующих в расширении зоны альтерации и эскалации воспалительных реакций.

Нами были продемонстрированы иммуностропные эффекты локального применения экстракта корневищ куркумы длинной в составе ректальных суппозиториях оригинального состава в виде снижения концентрации IgM, IgG, а также IL-23 в сыворотке при экспериментальной БК. Полученные данные являются предпосылкой для дальнейшего проведения комплексного исследования по доклиническому изучению эффективности и патогенетическому обоснованию локального применения экстракта корневищ куркумы длинной в составе ректальных суппозиториях при экспериментальной БК.

### **Выводы**

1. Установлено, что при экспериментальной тринитробензосульфоновой кислотой-индуцированной болезни Крона на 3-и, 5-е и 7-е сутки наблюдения в сыворотке увеличивается концентрация IgG, IgM и IL-23, максимальный уровень в сыворотке IgG, IgM регистрируется на 5-е сутки, а IL-23 – на 3-и сутки наблюдения.

2. Применение при экспериментальной болезни Крона экстракта куркумы *Curcuma longa* в составе ректальных суппозиториях оригинального состава с интервалом в 12 часов приводит к снижению концентрации в сыворотке IgM, IgG и IL-23 на 3-и, 5-е и 7-е сутки эксперимента, при этом уровень IgG и IL-23 восстанавливался частично, а IgM – полностью во все сроки наблюдения, что свидетельствует о системных иммуностропных эффектах экстракта куркумы после локального применения.

### **Список литературы**

1. Гончарик И.И. Болезнь Крона // УО “Белорусский государственный медицинский университет”. 2013. №.1. С.113-117.
2. Болезнь Крона у взрослых. Клинические рекомендации ассоциации колопроктологов России и Российской гастроэнтерологической ассоциации. 2016. С. 11-22.
3. Weisshof R., El Jurdi K., Zmeter N. Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Adv Ther.* 2018. no. 35. P. 1746-1762.
4. Gupta S.C., Patchva S., Aggarwal B.B. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2013. no. 15. P. 195-218.
5. Longman R.S., Diehl G.E., Victorio D.A., Huh J.R., Galan C., Miraldi E.R., Swaminath A., Bonneau R., Scherl E.J., Littman D.R. CX3CR1+ mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J. Exp. Med.* 2014. no. 211. P. 1571–1583.

6. Morris G.P., Beck P.L., Herridge M.S., Depew W.T., Szewczuk M.R., Wallace J.L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989. vol. 3. № 96. P. 795–803.
7. Wirtz S., Popp V., Jindermann M., Gerlach K., Weigmann B., Fichtner-Feigl S., Neurath M.F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 2017. vol. 12. № 7. P. 1295 – 1309.
8. Lin R., Chen H., Shu W., Sun M., Fang L., Shi Y., Pang Z., Wu W., Liu Z. Clinical significance of soluble immunoglobulins A and G and their coated bacteria in feces of patients with inflammatory bowel disease. *J. Transl. Med.* 2018. vol. 1. no. 16. P. 359.
9. Wang Z., Zhu M., Luo C., et al. High level of IgG4 as a biomarker for a new subset of inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2018. no. 8. P. 100-118.
10. Rai T., Wu X., Shen B. Frequency and risk factors of low immunoglobulin levels in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Report.* 2015. vol. 3. no. 2. P. 115-121.
11. Gálvez J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflammation.* 2014. vol. 2014, Article ID 928461.
12. Golombick T., Diamond T. H., Manoharan A., Ramakrishna R. Long term use of curcumin in two smoldering multiple myeloma patients. *Journal of Hematological Malignancies.* 2013. vol. 3. no. 1. P. 18–32.
13. Hussein S., Rashed S., El Hayawan I., El-Sayed R., Alo H. Evaluation of the Anti-schistosomal Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) Versus Praziquantel in *Schistosoma mansoni* Infected Mice. *Iran J. Parasitol.* 2017. vol. 12. no. 4. P. 587-596.
14. Taha N., Korshom M., Mandour A., Lebdah M. and Aladham E. Effect of lead toxicity on mineral metabolism and immunological factors in rats. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences.* 2013. no. 39. P. 64-73.
15. Cantazaro M., Corsini E., Rosini M., Racchi M., Lanni C. Immunomodulators unspired by nature: a review on Curcumin and Echinacea. *Molecules.* 2018. no. 23. P. 2778.