

РОЛЬ ИММУННЫХ ФАКТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

Бойко М.С., Осиков М.В., Давыдова Е.В., Кайгородцева Н.В., Галеева И.Р., Бычковских В.А.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) – относятся к хронической воспалительной патологии толстого кишечника, в патогенезе которого важная роль отводится развитию аутоиммунного воспаления с наличием выраженной плазматической инфильтрации и преобладанием Th-2 поляризации иммунного ответа в стенке толстого кишечника. Дискутабельной является роль факторов иммунной системы в формировании аутоиммунного профиля язвенного колита. В то же время возникновение ряда тяжелых побочных эффектов лечения диктует необходимость глубокого изучения иммунопатогенетических аспектов патогенеза с применением экспериментальных моделей. На экспериментальной оксазолоновой модели язвенного колита на 6-е сутки эксперимента значение индекса активности болезни (DAI) отражало максимальную экспрессию воспалительных изменений в толстой кишке крыс. Показатели красной и белой крови, уровень С-реактивного протеина отражали формирование системного воспалительного ответа уже на 2-е сутки эксперимента. Увеличение популяции лимфоцитов происходило преимущественно за счет Т-лимфоцитов (CD3⁺) и числа наивных Т- и В-лимфоцитов (CD45RA⁺ позитивных). Маркерами активации иммунных клеток на пике воспалительного ответа служили повышенные уровни провоспалительных цитокинов и хемокинов IL-6 и IL-8 в периферической крови крыс.

Ключевые слова: оксазолон-индуцированный язвенный колит, клетки крови, Т-лимфоциты, цитокины.

ROLE OF IMMUNE FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF EXPERIMENTAL ULCER COLITIS

Boyko M.S., Osikov M.V., Davydova E.V., Kaygorodtseva N.V., Galeeva I.R., Bychkovsky V.A.

«South Ural State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Inflammatory bowel disease (IBD) – Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are chronic inflammatory pathologies of the large intestine, in the pathogenesis of which an important role is played by the development of autoimmune inflammation with the presence of severe plasma infiltration and the predominance of Th-2 polarization of the immune response in the wall large intestine. The role of factors of the immune system in the formation of the autoimmune profile of ulcerative colitis is debatable, at the same time the emergence of a number of serious side effects of treatment, necessitates a thorough study of the immunopathogenetic aspects of pathogenesis using experimental models. In the experimental oxazolone model of ulcerative colitis on the 6th day of the experiment, the value of the disease activity index (DAI) reflected the maximum expression of inflammatory changes in the large intestine of rats. Indicators of red and white blood, the level of C-reactive protein reflected the formation of a systemic inflammatory response on the 2nd day of the experiment. The increase in the lymphocyte population occurred mainly due to T-lymphocytes (CD3⁺) and the number of naive T and B-lymphocytes (CD45RA⁺ positive). Markers of immune cell activation at the peak of the inflammatory response were elevated levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines IL-6 and IL-8 in rat peripheral blood.

Keywords: oxazolone-induced ulcerative colitis, blood cells, T-lymphocytes, cytokines.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) – болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК) – хроническая воспалительная патология толстого кишечника, в патогенезе которого важная роль отводится развитию аутоиммунного воспаления с наличием выраженной плазматической инфильтрации и преобладанием Th-2 поляризации иммунного ответа в стенке толстого кишечника. Согласно отчетам, представленным на Европейской

гастронеделе (2016), мировая распространенность язвенного колита фиксируется на уровне 50–70 случаев на 100 тыс. населения, с ежегодным приростом заболеваемости для ЖК 5–20 случаев в год. В Российской Федерации по данным Комитета по социальной политике Совета Федерации за 2016 г. распространенность ЖК составляет 16,6 случая на 100 тыс. населения с ежегодным приростом до 11,29%.

Предметом широкой дискуссии является этиопатогенетическая роль факторов иммунной системы в формировании аутоиммунного профиля ВЗК, а возникновение ряда тяжелых побочных эффектов в ходе традиционных протоколов лечения диктует необходимость глубокого изучения иммунопатогенетических аспектов патогенеза с применением экспериментальных моделей ВЗК [1].

В то же время известно, что ВЗК формируются на фоне изменений кишечного микробиоценоза как одного из факторов, приводящих к снижению толерантности по отношению к собственным антигенам [2]. Постулировано также наличие повышенной проницаемости кишечного барьера с последующей активацией постэпителиальных иммунных механизмов к нормальным внутрипросветным микробным или пищевым антигенам. Возможен приобретенный срыв иммунной толерантности к нормальным кишечным антигенам микробного или пищевого характера. Особая роль отводится генетически обусловленной аномалии локального иммунного ответа на собственные антигены. Стенка толстого кишечника содержит в своем составе кишечечно-ассоциированную лимфоидную ткань, которой отводится особая роль как в реализации реакций иммунного реагирования на чужеродные антигены, так и в реализации механизмов толерантности к собственным антигенным структурам кишечника. Ведущую роль в этом процессе играют паттерн-распознающие рецепторы (PRR), мембранные и эндосомальные Toll-like-рецепторы (TLR), цитоплазматические NOD-like-рецепторы и сенсоры вирусных РНК – RIG-like-рецепторы, посредством которых осуществляется сигнализация с последующим запуском иммунных реакций. Ряд исследователей отмечают при ВЗК наличие дисбаланса различных субпопуляций Т-хелперов типов 1 (Th1), 2 (Th2), клонов аутоиммунной направленности типа 17 (Th17), а также Т-регуляторных субпопуляций лимфоцитов (Treg), основными регуляторами дифференцировки которых являются соответственно транскрипционные факторы T-bet, GATA-3, ROR γ t и Foxp3 [3].

Цель исследования – на примере экспериментальной оксазолоновой модели язвенного колита изучить роль иммунных факторов в патогенезе данного заболевания.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на 37 белых крысах линии Wistar массой 200–220 г в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETSIN 123,

18.03.1986 г.), включая приложение А от 15.06.2006 г., с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010 г. [4]. Животные были разделены случайным образом на 2 группы: 1-я группа (n=7) – интактные животные, 2-я группа (n=30) – животные с ЯК. ЯК моделировали двухэтапным введением 3%-ного оксазолон (Sigma-aldrich, USA), верифицировали клиническими и морфологическими методами [5]. На первом этапе модели проводили накожную сенсбилизацию животного нанесением на предварительно выбритую межлопаточную область 150 мкл 3%-ного раствора оксазолон, предварительно растворенного в 100%-ном этиловом спирте. Второй этап заключался в ректальном введении на глубину 7–8 см 3%-ного раствора оксазолон, предварительно растворенного в 50%-ном этиловом спирте. Верификацию ЯК осуществляли с помощью морфологических и клинических методов. Исследование проводили на 2-е, 4-е и 6-е сутки. Определение гематологических показателей крови, популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов проводили с помощью гематологического анализатора BC-2800Vet (Mindray, Китай) для ветеринарии и проточного цитофлуориметра Navios (BeckmanCoulter, США) с использованием специфических крысиных моноклональных антител (АО «БиоХимМак Диагностика», г. Москва), с фенотипом CD3⁺ и CD45RA⁺, которые являются маркерами наивных преимущественно Т- и в меньшей степени В-лимфоцитов. Определение уровней IL-6, IL-8 и С-реактивного протеина (CRP) проводили с помощью специфических тест-систем для крыс фирмы ELISA Kit (Китай) на автоматическом иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия). Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (U – Манна–Уитни, WW – Вальда–Вольфовитца, K – Краскела–Уоллиса). Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Для верификации используемой нами экспериментальной модели БК применяли методы оценки выраженности клинических симптомов и морфологической картины в очаге повреждения в стенке толстого кишечника. Клинический статус оценивали по модифицированной шкале Disease activity index (DAI), адаптированной для БК у крыс, наиболее часто используемой в экспериментальных исследованиях и включающей 3 параметра: масса тела, консистенция стула и наличие крови в кале [1]. Каждый критерий оценивали по 4-балльной шкале от 0 до 4, затем баллы суммировали, минимальное значение индекса – 0, максимальное – 12. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Индекс активности болезни (DAI) при экспериментальном ЯК (Ме (Q₂₅-Q₇₅))

Группы животных	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 БК 2-е сутки (n=10)	Группа 2 БК 4-е сутки (n=10)	Группа 2 БК 6-е сутки (n=10)
Индекс активности болезни (DAI, у.е.)	0	6,5 (3,0–7,0) p<0,01	9,0 (6,0–10,0) p<0,01	10,5 (10,0–11,0) p<0,01

Примечание: p – показатель значимости различий с группой 1.

При экспериментальном ЯК у животных со 2-х суток наблюдения отмечались увеличение частоты дефекаций, изменение консистенции кала, появление крови в каловых массах, на 4-е и 6-е сутки наблюдения к указанным признакам добавились снижение массы тела и увеличение выраженности симптомов, что нашло отражение в статистически значимом увеличении индекса DAI в указанные сроки эксперимента. Потеря веса, обусловленная преимущественно наличием анорексии и диареей, составила от 7 до 10%, при этом также отмечалось снижение двигательной активности животных. Анорексигенный эффект может быть обусловлен наличием цитокинемии [6]. В наших экспериментах смертность животных в течение 6 суток экспериментального ЯК отсутствовала. В динамике ЯК значение DAI на 6-е сутки достоверно превышало значения на 2-е и 4-е сутки (p<0,05), что отражает максимальное развертывание воспалительных изменений в толстой кишке крыс.

Со стороны показателей красной крови в динамике экспериментального язвенного колита выявлены изменения содержания эритроцитов и гемоглобина, абсолютные значения которых значимо снижались на 4-е и 6-е сутки в сравнении с показателями 1-й и 2-й группы (интактными животными и 2-е сутки эксперимента соответственно), что в совокупности отражает развитие анемии на фоне прогрессирования воспалительных изменений в стенке толстого кишечника. Об этом свидетельствует и снижение показателя гематокрита уже на 2-е сутки эксперимента, при этом средний корпускулярный объем эритроцита и среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроците, а также показатель распределения эритроцита по объему не имели значимых различий во всех группах (табл. 2).

Таблица 2

Динамика гематологических показателей при экспериментальном язвенном колите
(Me (Q25-Q75))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЯК 2-е сутки (n=10)	Группа 2 ЯК 4-е сутки (n=10)	Группа 2 ЯК 6-е сутки (n=10)
RBC, 10 ¹² /л	9,35 (9,38–9,91)	8,69 (6,17–9,03)	7,50 (6,01–8,45) *	6,36 (6,01–7,47) *

HGB, г/л	157,0 (150,0– 160,0)	146,0 (137,0– 153,0)	143,0 (140,0– 150,0) *	140,0 (137,0– 148,0) *
HCT, %	56,4 (53,2–56,2)	46,60 (44,4– 47,2) *	42,9 (39,6–44,6) *	41,35 (39,60– 44,0) *
MCV, фл	59,7 (55,0–60,2)	59,80 (55,1– 59,5)	58,50 (55,5– 60,0)	58,90 (55,0– 60,0)
MCH, пг	15,6 (15,8–16,8)	15,4 (15,5–16,5)	15,6 (15,4–16,6)	15,45 (15,3– 15,2)
MCHC, г/л	291,0 (280,0– 287,0)	290,0 (280,0– 283,0)	291,0 (280,0– 282,0)	291,0 (280,0– 282,0)
RDW, %	13,0 (12,9–13,3)	12,6 (12,1–13,6)	13,10 (12,7– 13,6)	13,10 (12,7– 13,3)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой 1; RBC – эритроциты; HGB – гемоглобин; HCT – гематокрит; MCV – средний объем эритроцита; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDW – распределение эритроцитов по объему.

Исследование показателей белой крови (лейкоцитарная формула) показало изменения в виде значимого увеличения общего числа лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, лимфоцитов и моноцитов крови уже на 2-е сутки эксперимента, преимущественно за счет субпопуляций нейтрофилов, что отражает наличие системного острого воспалительного ответа при нарастании изменений в стенке толстого кишечника. Увеличение популяции лимфоцитов в крови, вероятно, свидетельствует об активном вовлечении в патологический процесс клеток иммунной системы и участии острофазовых реакций (табл. 3).

Таблица 3

Динамика показателей лейкоцитарного ростка при экспериментальном язвенном колите
(Me (Q25-Q75))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЯК 2-е сутки (n=10)	Группа 2 ЯК 4-е сутки (n=10)	Группа 2 ЯК 6-е сутки (n=10)
Лейкоциты, • $10^9/л$	4,40 (4,0–5,4)	10,45 (7,10– 12,80) *	6,45 (6,0–11,4) *	8,95 (6,10–14,2) *
ПЯН, • $10^9/л$	0,04 (0,00–0,54)	0,37 (0,21–0,38) *	0 *	0,12 (0,07–0,14) *
СЯН, • $10^9/л$	1,36 (1,33–1,56)	5,41 (2,41–6,14) *	2,43 (2,04–4,78) *	1,99 (1,37–5,39) *
НФ, • $10^9/л$	1,40 (1,33–1,62)	5,87 (2,62–6,52) *	4,43 (2,04–4,78) *	4,16 (2,01–5,39) *
ЭФ, • $10^9/л$	0,02 (0,00–0,04)	0,00 (0,00–0,04)	0,12 (0,04–0,22) *	0,28 (0,28–0,31) *

БФ, • 10 ⁹ /л	0	0	0	0,00 (0,00–0,00) *
ЛФ, • 10 ⁹ /л	2,88 (2,32–3,59)	4,22 (3,15–4,99)	4,57 (3,59–9,23) *	6,11 (3,59–7,52) *
МЦ, • 10 ⁹ /л	0,24 (0,23–0,32)	0,81 (0,54–1,28) *	0,39 (0,14–0,91)	0,75 (0,42–0,85)

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой 1; ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы, НФ – нейтрофилы, ЭФ – эозинофилы, БФ – базофилы, ЛФ – лимфоциты, МЦ – моноциты.

Более детальное изучение субпопуляционного спектра лимфоцитов показало, что на 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК статистически значимо увеличивается абсолютное содержание общего количества Т-лимфоцитов (CD3⁺) и числа наивных Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов и в меньшей степени моноцитов, несущих мембранный маркер CD45RA⁺ лимфоцитов, по сравнению с группой интактных животных. При этом на 2-е сутки прирост количества CD3⁺ составил 66%, количества CD45RA⁺ – 21%, на 4-е сутки – 46% и 39%, на 6-е сутки – 56% и 49% соответственно.

Основой гуморальных межклеточных взаимодействий на этапах развития иммунного ответа являются кооперативные события, опосредованные действием эндогенных интермедиатов. В случае развития воспалительного процесса в дистальных отделах толстого кишечника при оксазолон-индуцированной экспериментальной модели язвенного колита особую роль в реализации реакций иммунного реагирования играют провоспалительные цитокины и некоторые острофазовые протеины. В частности, в ряде исследований в изменении иммунного статуса показана роль регуляторных, провоспалительных цитокинов, хемокинов и белков острой фазы (IL-2, IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α , CRP) [7]. В ходе воспалительного ответа иммунные клетки получают мощные антигенные сигналы, способные запустить биосинтез цитокинов и параллельную экспрессию генов-рецепторов в иммунocyтах в течение 1 суток [8]. Установленное нами значимое повышение числа CD3⁺ – Т-лимфоцитов, а также пула наивных CD45RA⁺ лимфоцитов уже на 2-е и максимально на 4-е и 6-е сутки на фоне роста уровня хемокина – IL-8, максимально на 2-е сутки эксперимента способствует активной миграции иммунocyтов в очаг воспаления, примированию тканеспецифическими антигенами кишечной стенки для дальнейшей дифференцировки в Th1, Th2 и клональной экспансии аутоиммунных клонов Т-лимфоцитов, имеющих фенотип Th17-лимфоцитов. В таблице 4 представлена динамика уровня провоспалительных цитокинов и острофазового CRP протеина при развитии экспериментального язвенного колита. Как видно из таблицы 4, уровень IL-6, индукторами выработки которого могут выступать тканевые антигены, бактериальные продукты, острофазовые протеины и другие факторы, значимо повышается уже на 2-е сутки эксперимента, что вполне закономерно, поскольку известно, что экспрессия мРНК для IL-6 происходит в пределах 1 часа после

активации, а секреция – в течение первых 4–6 часов. На роль мощного индуктора синтеза провоспалительных цитокинов иммунными клетками претендует CRP-протеин, количество которого (табл. 4) многократно возрастает при любом воспалительном ответе, в частности при развитии язвенного колита, как нами показано, уже на 2-е сутки в сравнении с интактными животными, достигая максимума концентрации к 6-м суткам эксперимента.

Таблица 4

Концентрация провоспалительных факторов в сыворотке при экспериментальном язвенном колите (Me(Q25-Q75))

Показатели	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЯК 2-е сутки (n=10)	Группа 2 ЯК 4-е сутки (n=10)	Группа 2 ЯК 6-е сутки (n=10)
IL-8, пг/мл	95,71 (88,51–98,12)	243,47 (222,36–291,08) *	234,91 (217,68–233,41) *	245,74 (225,76–296,36) *
IL-6, пг/мл	15,57 (15,65–18,41)	45,11 (44,18–46,03) *	52,55 (50,63–52,47) *	53,47 (49,71–54,31) *
CRP, пг/мл	82,43(85,17– 93,63)	155,2(127,89–159,31) *	150,8 (121,43–142,51) *	174,68 (167,32– 309,71) *

Примечание: * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой 1;
CRP – С-реактивный протеин

Биологический смысл появления в крови белков острой фазы, в частности CRP, заключается в повышении резистентности клеточных мембран к окислению, в ограничении выраженности тканевой альтерации, в активации неспецифических эффекторных систем организма. Примечательно, что индукторами синтеза данного протеина могут являться также и провоспалительные цитокины, хемокины, например IL-6, TNF- α , IL-8. А сам CRP в свою очередь способен модулировать функции Т-лимфоцитов, фагоцитов, тромбоцитов в зависимости от актуальной ситуации на этапах воспалительного процесса.

Выводы

1. В динамике ЯК на 6-е сутки эксперимента значение индекса DAI было максимально высоким, что отражает пиковую экспрессию оксазолон-индуцированных воспалительных изменений в толстой кишке крыс.

2. Максимальное снижение на 6-е сутки эксперимента абсолютных показателей эритроцитов и гемоглобина на фоне роста на 2-е сутки общего числа лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов, лимфоцитов, моноцитов крови, а также острофазового протеина (CRP) отражает развитие анемии и формирование системного воспалительного ответа при нарастании изменений в стенке толстого кишечника.

3. При экспериментальном оксазолон-индуцированном ЯК на 2-е, 4-е и 6-е сутки ЯК статистически значимо увеличивается абсолютное содержание общего количества Т-лимфоцитов (CD3⁺) и числа наивных Т-лимфоцитов, а также В-лимфоцитов и в меньшей степени моноцитов, несущих мембранный маркер CD45RA⁺ лимфоцитов, по сравнению с группой интактных животных.

4. На 2-е сутки эксперимента в крови показано наличие цитокинемии в виде роста уровня IL-6, IL-8, отражающее активацию Т-лимфоцитов и макрофагов в очаге воспаления.

Список литературы

1. Kopecki Z., Yang G., Treloar S., Mashtoub S., Howarth G.S., Cummins A.G., Cowin A.J. Flightless I exacerbation of inflammatory responses contributes to increased colonic damage in a mouse model of dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis. *Scientific Reports*. 2019. no. 9. P. 12792. DOI: 10.1038/s41598-019-49129-6.
2. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии // *Альманах клинической медицины*. 2018. № 46(5). С.396–425. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425.
3. Ungaro R., Mehandru S., Colombel J-F. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2017. Vol. 389. no. 10080. P. 1756-1770. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2.
4. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007аба8>.
5. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бакеева А.Е., Бойко М.С., Бивалькевич В.А. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника // *Научно-практический журнал «Аспирантский вестник Поволжья»*. 2018. № 1–2. С. 153–160. DOI: 10.17816/2075-2354.2018.18.153-160.
6. Graf D., Jennifer M., Monka L., Wua W., Hannah R. Red lentil supplementation reduces the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis in C57BL/6 male mice. *Journal of Functional Foods*. 2020. Vol. 64. P. 103625.
7. Li Jie Lai, Jun Shen, Zhi Hua Ran. Natural killer T cells and ulcerative colitis. // *Cellular Immunology*. Vol. 335. P. 1-5. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.08.010.
8. Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных

лимфатических узлах и ободочной кишке при экспериментальном хроническом язвенном колите // Иммунология. 2018. № 39(1). С 32-38. DOI: 10.18821/0206-4952-2018-39-1-32-38.