

*На правах рукописи*

Кайгородцева Наталья Васильевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОЗОНА  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ**

3.3.3 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Челябинск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре патологической физиологии.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Осиков

Михаил Владимирович

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор РАН, главный научный сотрудник лаборатории восстановительного лечения, директор Владивостокского филиала ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток

Гвозденко

Татьяна Александровна

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела общей патологии ЦНИЛ, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург

Базарный

Владимир Викторович

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «20» декабря 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.048.03 на базе ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (644099, Россия, г. Омск, ул. Ленина, д. 12).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России и на сайте <http://omsk-osma.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д.м.н., доцент



Корпачева Ольга Валентиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.**

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) включают язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК) и представляют медико-социальную проблему в связи с преимущественным поражением лиц молодого возраста, затяжным течением, высокой частотой осложнений, инвалидизацией пациентов, что особенно значимо для развитых индустриальных стран (Zhao M., Gönczi L. et al., 2021; Chen Y. et al., 2022). Заболеваемость ВЗК увеличивается в странах с исходно низкой распространенностью – Азии и Среднего Востока (Ng S. C. et al., 2018). Распространенность ВЗК в РФ составляет для ЯК 19,3–29,8 случая на 100 тыс., для БК – 3,0–4,5 на 100 тыс. (Князев О. В. и др., 2020), заболеваемость для ЯК составляет 2,1–4,1 случая на 100 тыс., для БК 0,8–1,0 случая на 100 тыс. с ежегодным приростом от 5 до 20 случаев на 100 тыс. (Биннатли Ш. А. и др., 2019).

Полагают, что ВЗК возникают в генетически предрасположенном организме в ответ на действие широкого спектра триггерных факторов окружающей среды, таких как инфекционные агенты, характер питания и контакт с пищевыми аллергенами, изменение состава кишечной микробиоты, курение, употребление алкоголя и др. (Yue B. et al., 2020; Aldars-garcía L. et al., 2021; Caioni G. et al., 2021; Parrish A. et al., 2022). Патогенез ВЗК включает нарушение защитных механизмов интестинального барьера, дисрегуляцию иммунного ответа, активацию свободнорадикального окисления и другие механизмы. Особую роль в реализации иммуновоспалительного компонента патогенеза играют активация клеточных и гуморальных механизмов иммунного ответа, дисбаланс Th17/Treg, увеличение синтеза провоспалительных цитокинов и медиаторов и другие факторы (Annese V. et al., 2020; Ross J. P. et al., 2020; Sun R. et al., 2020; Gonzalez A. et al., 2021). Немаловажными в патогенезе ВЗК являются активация процессов свободнорадикального окисления (СРО) в очаге повреждения толстой кишки, образование активных форм кислорода и азота в условиях дисбаланса системы прооксиданты – антиокислительная защита и эскалации оксидативного стресса с деструкцией липидов и белков (Dziąbowska-Grabias K. et al., 2021). Нарушение защитных механизмов интестинального барьера приводит к повышению его проницаемости, инициирует и поддерживает воспалительный процесс (Ливзан М.А. и др., 2021, 2022; Carbonero F. et al., 2017). Активные метаболиты триптофана, образуемые под влиянием кишечной микробиоты, повышают экспрессию белков плотных контактов и снижают проницаемость кишечного барьера (Generoso A. et al., 2021). Комплексная оценка изменений гомеостаза при экспериментальном колите, включая клинические признаки, исследование показателей острофазового ответа и иммунного статуса, морфологии и редокс-статуса в очаге повреждения, позволит дополнить имеющиеся представления о механизме развития ВЗК, обозначить ведущие звенья патогенеза в качестве цели патогенетической терапии, определить диагностические и прогностические маркеры при ВЗК.

Терапевтические подходы при ВЗК включают применение производных 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикостероидов, иммуносупрессоров, генно-инженерных биологических препаратов, что сопровождается возникновением побочных эффектов, включая системную иммуносупрессию, индивидуальную непереносимость и рефрактерность не менее чем у 30 % пациентов, поэтому по-прежнему актуальны разработка и внедрение в лечебную практику новых эффективных и обоснованных с патогенетических позиций стратегий по лечению ВЗК (Weisshof R. et

al., 2018; Ryan F. J. et al., 2020). Перспективным считается применение новых генно-инженерных биологических препаратов (анти-IL-12/23, антиинтегрины и др.), ингибиторов янус-киназ, про-, пре-, метабиотиков, трансплантация фекальной микробиоты, использование аутологичных толерогенных дендритных и мезенхимальных стромальных клеток, антиоксидантов, методов эфферентной терапии (Gu G. et al., 2021; Wang R. et al., 2021).

Объектом пристального внимания при ВЗК являются биогенные регуляторы гомеостаза в составе оригинальных ректальных лекарственных форм, в частности, куркумин, витамин D<sub>3</sub>, эритропоэтин и др. (Осиков М. В. и др., 2020; Осиков М.В. и др., 2021; Осиков М.В. и др., 2022; Gu G. et al., 2021; Serré J. et al., 2022; Wang R. et al., 2022). На роль неспецифического лечебного фактора при ВЗК может претендовать системное и/или локальное применение медицинского озона. Благодаря широкому диапазону биологических эффектов, включающих микробоцидное, регуляцию редокс-статуса, воспалительного процесса и иммунного статуса, репарации, хорошей совместимости с другими видами терапии применение медицинского озона может занять достойное место в комплексном лечении ВЗК. Озонотерапия эффективно применяется в лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, в акушерско-гинекологической практике, в дерматокосметологии, в гастроэнтерологии при лечении острых и хронических вирусных гепатитов, панкреатитов, гастритов и другой патологии (Микитин И. Л. и др., 2017; Багдасарян Л. А. и др., 2019; Eustace G. J. et al., 2018; Zeng J. et al., 2018; Sen S. et al., 2020; Masan J. et al., 2021; Rappazzo K. M. et al., 2021).

**Цель исследования.** С патогенетических позиций обосновать эффективность применения озона при экспериментальном колите.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать в динамике экспериментального колита клиническую картину, морфологические изменения, содержание CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, IL-17, продуктов окислительной деструкции липидов и белков в очаге повреждения толстой кишки, содержание кальпротектина в кале, количественный состав лейкоцитов, функциональную активность нейтрофилов в крови, концентрацию в сыворотке С-РБ, показатели периферического отдела эритрона.

2. Выявить характер связи между клиническими, морфологическими признаками и показателями иммунного статуса, свободнорадикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника при экспериментальном колите.

3. Изучить в динамике экспериментального колита влияние озона при ректальном и внутрибрюшинном применении на клинические, морфологические, иммунологические, гематологические параметры, показатели свободнорадикального окисления в крови и в очаге повреждения толстой кишки.

4. Провести в динамике экспериментального колита сравнительный анализ эффективности применения озона ректально или внутрибрюшинно и применения ректальных суппозиторий с 5-АСК в отношении клинических, морфологических, иммунологических, гематологических параметров, показателей свободнорадикального окисления в крови и в очаге повреждения толстой кишки.

**Научная новизна исследования.** Проведена комплексная оценка изменений клинических и морфологических параметров, показателей иммунного статуса и редокс-статуса в крови и в очаге повреждения толстой кишки при оксазолон-индуцированном экспериментальном колите. Продемонстрировано, что клинико-

морфологическая картина оксазолон-индуцированного колита соответствует воспалительным заболеваниям кишечника у человека и ассоциирована в крови с увеличением количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, повышением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, концентрации С-РБ в сыворотке, с увеличением содержания кальпротектина в кале, в очаге повреждения – с повышением количества  $CD4^+$ , концентрации IL-17, первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе, первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе липидного экстракта, ранних и поздних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера в спонтанном и металл-индуцированном режиме детекции, с уменьшением количества  $CD4^+FOXP3^+$  лимфоцитов.

Впервые при оксазолон-индуцированном колите продемонстрирован положительный эффект и проведен сравнительный анализ ректального и внутрибрюшинного применения озона (заявка на изобретение № 2021123148/14(048302) – принято положительное решение о выдаче патента от 14.09.2022 г., заявка на патент РФ № 2022112056/17(025343)). Впервые выявлено, что озон при ректальном и внутрибрюшинном применении снижает выраженность клинических и морфологических признаков в очаге повреждения толстой кишки: уменьшает размер язвенного дефекта, содержание нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, увеличивает количество гистиоцитов, фибробластов, площадь сосудистого русла. Установлено, что механизм протекторного действия озона включает в очаге повреждения толстой кишки снижение содержания  $CD4^+$ , увеличение –  $CD4^+FOXP3^+$ , снижение концентрации IL-17, снижение содержания первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, ранних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера; снижение содержания кальпротектина в кале; снижение в крови количества моноцитов, лимфоцитов, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, концентрации С-РБ.

Впервые в динамике оксазолон-индуцированного колита показано, что эффект ректального применения озона более выражен, чем эффект от внутрибрюшинного применения озона, и направлен на редукцию язвенного дефекта, восстановление индекса TDI, содержания лимфоцитов, в том числе  $CD4^+$ ,  $CD4^+FOXP3^+$ , нейтрофилов, эозинофилов, IL-17, продуктов ПОЛ в очаге повреждения толстой кишки, содержания кальпротектина в кале, количества в крови нейтрофилов, лимфоцитов, эритроцитов, гематокрита, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов. Установлено, что эффект от ректального применения озона при экспериментальном колите в большей мере, чем эффект от внутрибрюшинного применения озона, сопоставим и приближается к эффектам от применения ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В ходе проведенного исследования в экспериментальных условиях получены новые фундаментальные знания о закономерностях изменений иммунологических параметров в крови и в очаге повреждения, редокс-статуса и морфологии очага повреждения при оксазолон-индуцированном колите, что расширяет современное представление о механизмах развития воспалительных заболеваний кишечника. Показано, что клинические и морфологические признаки при оксазолон-индуцированном колите соответствуют таковым при воспалительных заболеваниях кишечника у человека, а патогенез

включает активацию ответа острой фазы, врожденного и адаптивного иммунитета наряду с признаками окислительного стресса в очаге повреждения толстой кишки. Полученные результаты комплексной оценки изменений гомеостаза при оксазолон-индуцированном колите могут быть использованы для патогенетического обоснования и разработки новых диагностических маркеров и терапевтических подходов при воспалительных заболеваниях кишечника.

Показано, что эффекты озона при ректальных и внутрибрюшинных инсуффляциях снижают выраженность клинико-морфологических признаков при оксазолон-индуцированном колите, что схоже с эффектом ректальных суппозиториев с 5-АСК. Выявлено, что протекторное действие озона реализуется за счет прямого и опосредованного влияния на редокс-статус, репаративного, противовоспалительного и иммуномодулирующего эффектов в крови и очаге повреждения толстой кишки. Полученные в работе экспериментальные результаты являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований по изучению механизма действия озона при воспалительных заболеваниях кишечника с последующим внедрением нового лекарственного препарата в клиническую практику.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с целью и задачами исследования. Организация исследования одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 22.05.2020, протокол № 4 от 15.04.2022).

Экспериментальные исследования выполнены на 236 крысах-самцах линии Wistar массой  $(240 \pm 10)$  г в экспериментально-биологической клинике (виварии) 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 18.06.2007, Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Методы исследования включали экспериментальное моделирование, клинические, гематологические, биохимические, иммунологические, иммуноферментного анализа, морфологические и иммуногистохимические с использованием специфических тест-систем для крыс и статистического анализа.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Клинические симптомы, морфологические признаки в динамике экспериментального колита ассоциированы с параметрами иммунного статуса, острофазового ответа, свободнорадикального окисления в крови и в очаге повреждения толстой кишки.

2. Применение при экспериментальном колите озона путем ректальных или внутрибрюшинных инсуффляций снижает выраженность клинических признаков, ограничивает деструктивные явления, активирует репаративные процессы в очаге повреждения толстой кишки; эффект ректального применения озона более выражен и сопоставим с эффектом от применения ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой, чем эффект от внутрибрюшинного применения озона.

3. Механизмы протекторного действия озона при экспериментальном колите включают эффекты, ограничивающие окислительную деструкцию липидов и белков

в очаге повреждения, полное или частичное восстановление иммунологических параметров в очаге повреждения и в крови, показателей периферического отдела эритронов в крови.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов работы, правомочность основных положений и выводов основаны на достаточном числе наблюдений 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 Всероссийской научно-практической конференции «Типовые патологические процессы: современные тренды в науке» (Томск, 2020); на XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2021); XXVIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2022).

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, научную работу научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области; поданы 2 заявки на патент РФ о применении озона при экспериментальном моделировании ВЗК (заявка на изобретение № 2021123148/14(048302) – принято положительное решение о выдаче патента от 14.09.2022 г., заявка на изобретение № 2022112056/17(025343)).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 212 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 60 отечественных и 228 зарубежных источников литературы. Работа содержит 49 таблиц и 39 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы исследования.** Проведены экспериментальные исследования *in vivo* на 236 белых крысах-самцах линии Wistar массой ( $240 \pm 10$ ) г. Для общей анестезии внутримышечно вводили препарат «Золетил» (МНН: тилетамин гидрохлорид, Virbac Sante Animale, Франция) в дозе 20 мг/кг. Животные были разделены методом простой рандомизации на 5 групп (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика экспериментальных групп

Группы	Экспериментальная терапия	Сроки	Кол-во крыс
1. Интактные	–	–	20
2. ОИК	–	2, 4, 6-е сутки	42
3. ОИК в условиях ректального применения озона	0,1 мг/кг через 12 часов / 6 суток	2, 4, 6-е сутки	66
4. ОИК в условиях внутри-брюшинного применения озона	0,05 мг/кг через 12 часов / 6 суток	2, 4, 6-е сутки	66
5. ОИК в условиях применения ректальных суппозиторий с 5-АСК	50 мг через 12 часов / 6 суток	2, 4, 6-е сутки	42
Примечание – ОИК – оксазолон-индуцированный колит; 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота.			

**Оксазолон-индуцированный колит (ОИК)** моделировали с помощью двухэтапного применения раствора оксазолона (4-этоксиметил-2-фенил-2-оксазолин-5-он) (Sigma-Aldrich, США) (рисунок 1) (Fuss I. J. et al., 2004; Hoving J. C. et al., 2017; Hoving J. C. et al., 2020). Первоначально проводили сенсibilизацию путем нанесения спиртового (96 % этанол) раствора оксазолона в дозе 675 мкл/кг на предварительно выбритый и очищенный участок кожи межлопаточной области. На 7-е сутки в прямую кишку на глубину 8 см вводили оксазолон в дозе 675 мкл/кг, предварительно растворенный в 50 % этаноле.

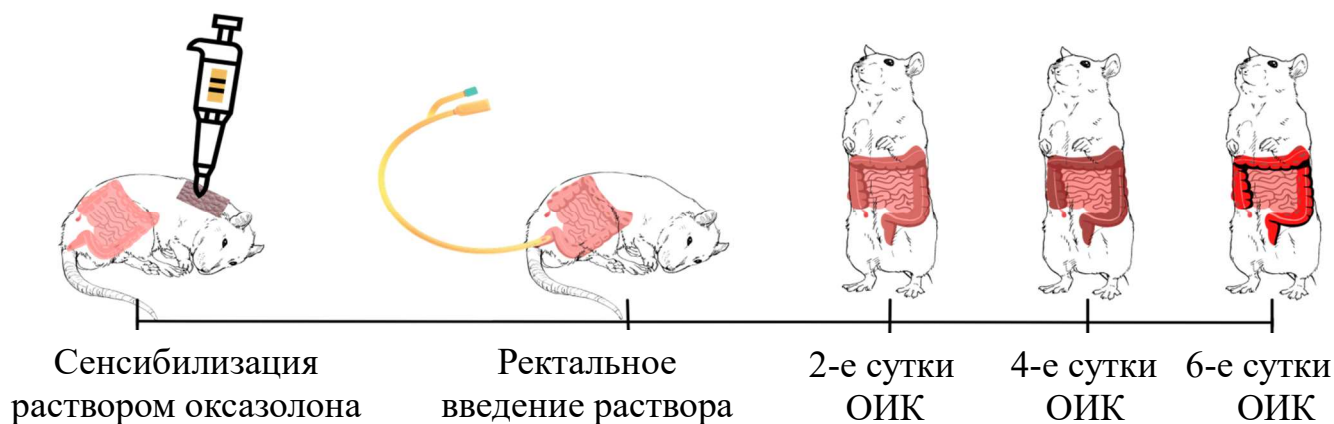


Рисунок 1 – Моделирование ОИК

Озоно-кислородную смесь получали на озонотерапевтической автоматической установке с деструктором озона «УОТА-60-01 «Медозон» (ООО «Медозон», Москва, Россия; регистрационное удостоверение № 292/0699/96-5-27) на базе отделения медицинской реабилитации ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница» при участии зав. отделением д-ра мед. наук, доцента Е. В. Давыдовой, за что автор выражает ей искреннюю благодарность.

**Индекс активности болезни (disease activity index, DAI)** рассчитывали в соответствии со шкалой, адаптированной для крыс (Kim J. J. et al., 2012). Каждый параметр (потеря веса, консистенция стула и ректальное кровотечение) оценивали от



0 до 4 баллов, баллы суммировали. Скрытую кровь в каловых массах определяли с помощью бензидиновой реакции.

**Гематологические и иммунологические методы.** На гематологическом анализаторе для ветеринарии BC-2800 Vet (Mindray, Китай) определяли количество в крови лейкоцитов, количество эритроцитов (RBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний объем эритроцита (MCV), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC), индекс распределения эритроцитов (RDW). Лейкоцитарную формулу определяли в мазках крови, окрашенных азуром II и эозином («Гемстандарт-Р», Россия). Чистую фракцию нейтрофилов из крови выделяли на градиенте плотности стерильных растворов фиколла (Pharmacia, Швеция) и верографина (Srofa, Чехия). Поглонительную способность нейтрофилов крови исследовали с частицами монодисперсного полистирольного латекса, учитывали активность (процент клеток), интенсивность фагоцитоза (у. е.) и фагоцитарное число (у. е.). Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов крови исследовали в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте с расчетом активности (процент клеток), интенсивности (у. е.) и функционального резерва клеток (Маянский М. Е. и др., 1988). На иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия) с помощью специфичных для крыс тест-систем фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай) определяли концентрацию в сыворотке С-реактивного белка (С-РБ) (пг/мл).

Для приготовления 10 % гомогената слизистой оболочки толстой кишки (в группах 2–5 очага повреждения толстой кишки) из брюшной полости извлекали проксимальную часть ободочной кишки и помещали в охлажденный 0,3 М раствор фосфатного буфера (рН 7,4), после чего 300 мг ткани гомогенизировали в соотношении 1 : 10 в течение 3 минут при 4 °С с получением 3 мл гомогената. На иммуноферментном анализаторе Personal LAB (Италия) определяли в гомогенате концентрацию IL-17 (пг/г) с помощью тест-системы Cloud-Clone Corp. (Китай); в супернатанте кала определяли содержание кальпротектина (нг/мл) с помощью тест-системы Calprotectin alpro (Cloud-Clone Corp., Китай).

**Биохимические методы.** Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате очага повреждения толстой кишки определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом на СФ-56 («ЛОМО-Спектр», Санкт-Петербург, Россия) (Львовская Е. И. и др., 1991; Волчегорский И. А. и др., 2000). В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оптическую плотность при длинах волн 220 нм (содержание изолированных двойных связей), 232 нм (содержание диеновых конъюгатов – ДК), 278 нм (содержание кетодиенов и сопряженных триенов – КД и СТ), 400 нм (основания Шиффа – ШО). Относительное содержание продуктов ПОЛ выражали в единицах индексов окисления (е. и. о.):  $E_{232}/E_{220}$  (ДК),  $E_{278}/E_{220}$  (КД и СТ) и  $E_{400}/E_{220}$  (ШО). Продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в гомогенате определяли по реакции карбонильных производных белков с 2,4-динитрофенилгидразином в спонтанном и металл-зависимом по реакции Фентона режимах с последующей регистрацией на спектрофотометре альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ) в ультрафиолетовой части спектра и области видимого света (Фомина М. А. и др., 2014). Результат выражали в единицах оптической плотности на мг белка (у.е./мг).

**Морфологические и иммуногистохимические методы.** Данный фрагмент выполнен в ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава

Челябинской области при участии руководителя отдела поисковых исследований канд. мед. наук Л. В. Астаховой, за что автор выражает ей искреннюю благодарность.

Проксимальную часть ободочной кишки фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Подсчитывали на микроскопе Leica DMRXA (Германия) на 1 мм<sup>2</sup> количество нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, гистиоцитов, плазматических клеток, фибробластов, площадь распределения сосудов (мкм<sup>2</sup>), диаметр язвенного дефекта (мкм) при увеличении  $\times 50$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$  и  $\times 400$  в 10 случайно отобранных полях зрения. Морфометрические исследования проводили с помощью программы Image Scope M (Россия). Для интегральной оценки повреждения толстого кишечника использовали индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI) (Yao J. et al., 2017). Иммуногистохимическим методом в патологически измененных тканях толстой кишки проводили оценку популяции Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и Т-регуляторных клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> с использованием специфических крысиных моноклональных антител производства Cloud-Clone Corp. (Китай) в автоматическом иммуногистостейнере BenchMarkXT (Ventana, США) с использованием универсальной системы Ultra VIEW Universal DAB (Ventana, США) для визуализации в срезах тканей, связанных с антигеном иммуноглобулинов кролика и мыши.

**Статистические методы.** Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>). Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскела – Уоллиса, Манна – Уитни, Вальда – Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

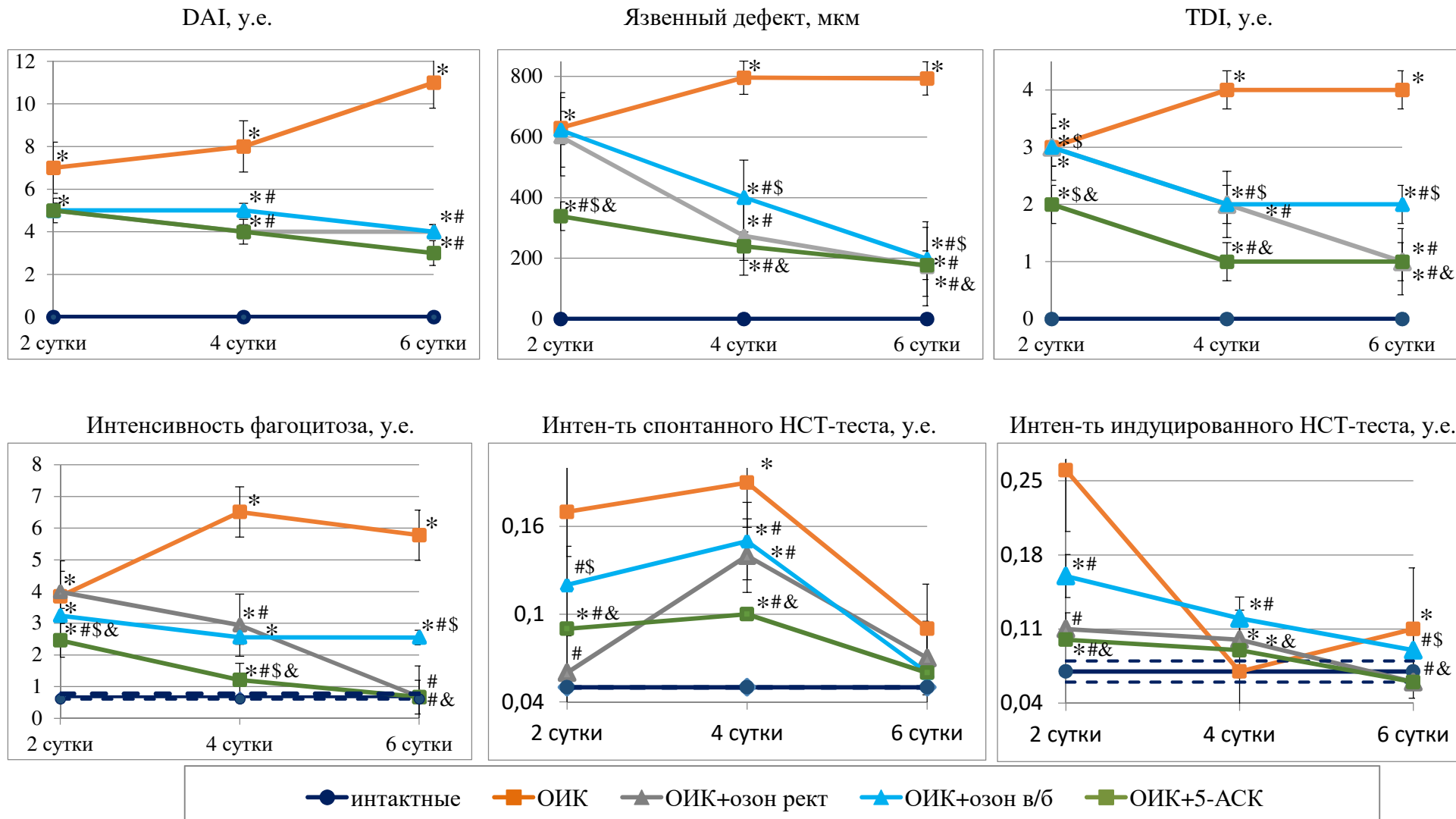
При ОИК на 2-е, 4-е и 6-е сутки наблюдения зафиксированы клинические признаки поражения толстой кишки, увеличение индекса DAI; в очаге повреждения толстой кишки зафиксированы язвенный дефект, увеличение количества лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов, гистиоцитов, плазмоцитов, фибробластов, площади распределения сосудов и как следствие – увеличение индекса TDI (рисунок 2). На 2-е, 4-е и 6-е сутки в крови зафиксировано увеличение количества лейкоцитов за счет нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов и моноцитов. В эти же сроки увеличивается поглотительная и НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови, в сыворотке увеличивается концентрация С-РБ, в кале – содержание кальпротектина (рисунки 2, 3). В очаге повреждения толстой кишки увеличивается концентрация IL-17, количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и снижается количество CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> лимфоцитов (таблица 2). При ОИК на 2-е, 4-е и 6-е сутки в крови снижаются количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, средняя концентрация гемоглобина в эритроците и индекс распределения эритроцитов.

При ОИК на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента в очаге повреждения толстой кишки увеличивается содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта; увеличивается суммарное содержание продуктов ОМБ за счет ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера в спонтанном режиме детекции на 2-е, 4-е и 6-е сутки, в металл-индуцированном режиме детекции – на 4-е и 6-е сутки (таблица 2).

Проведен корреляционный анализ между индексом клинической активности (DAI), индексом повреждения тканей в очаге повреждения толстой кишки (TDI) и иммунологическими параметрами и показателями свободнорадикального окисления в крови и в очаге повреждения толстой кишки. Результаты представлены на рисунке 4. Как для DAI, так и для TDI выявлены ассоциации с показателями иммунного статуса: общим количеством в крови лейкоцитов, количеством нейтрофилов и лимфоцитов, интенсивностью фагоцитоза нейтрофилов, интенсивностью спонтанного НСТ-теста нейтрофилов, концентрацией кальпротектина в кале, концентрацией С-РБ в сыворотке, концентрацией IL-17, количеством CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> лимфоцитов в очаге повреждения. Как DAI, так и TDI продемонстрированы ассоциации с показателями редокс-статуса в очаге повреждения: вторичными продуктами ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах, суммарным содержанием продуктов ОМБ, в том числе поздними продуктами, в спонтанном режиме, суммарным содержанием продуктов ОМБ, в том числе ранними и поздними продуктами, в металл-индуцированном режиме. Для TDI установлены ассоциации, которые не были установлены для DAI, по показателям редокс-статуса в очаге повреждения: с первичными продуктами ПОЛ в гептановой фазе, первичными и конечными продуктами ПОЛ в изопропанольной фазе.

Итак, при ОИК зафиксированы клинические признаки в виде снижения массы тела, диареи с примесью крови и морфологические признаки в очаге повреждения толстой кишки: язвенный дефект с диффузной нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрацией, уменьшением бокаловидных клеток, крипт-абсцессы, характерные в большей мере для ЯК, чем для БК (Zhang L. et al., 2020). Клинические и морфологические признаки ОИК ассоциированы с показателями иммунного статуса в крови и в очаге повреждения и редокс-статуса в очаге повреждения.

Оксазолон является гаптенем, который при первичном контакте с организмом (сенсбилизация) с помощью TLR- и NLR-зависимых путей распознается дендритными клетками, в условиях присутствия IL-4, активации TCR, экспрессии OX-40L (CD252) обеспечивает поляризацию иммунного ответа в направлении Th2 (Yang W. W. et al., 2019). У пациентов с ЯК в слизистой оболочке толстой кишки накапливаются НКТ-клетки II типа, которые продуцируют IL-13 в условиях высокой экспрессии CD1d, что способствует дифференцировке Th0 в Th2 (Liao S. M. et al., 2013). В ходе Th2-зависимого иммунного ответа увеличивается секреция IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IgG и IgM, количество Т-хелперов и снижается количество Т-регуляторных клеток. Кроме этого, оксазолон сам повреждает стенку кишки, образуется зона первичной альтерации, в которую мигрируют нейтрофилы, моноциты. Секреция IL-6 и IL-8 запускает ответ острой фазы, увеличивается синтез С-РБ, в кале повышается содержание кальпротектина, увеличивается поглотительная и НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов. Эскалация оксидативного стресса, инициируемого продукцией АФК и азота активированными нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиоцитами в очаге повреждения в условиях дефицита активности и/или количества ферментов антиоксидантной защиты, приводит к дополнительному повреждению, дисфункции и гибели колоноцитов, расширению зоны вторичной альтерации и, как следствие, утяжелению симптомов.



Примечание – \* –  $p < 0,01$  с группой интактных; # –  $p < 0,01$  с группой 2 (ОИК); \$ –  $p < 0,01$  с группой 3 (ОИК + озон ректально); & –  $p < 0,01$  с группой 4 (ОИК + озон внутрибрюшинно).

Рисунок 2 – Влияние озона и ректальных суппозиториях с 5-АСК на некоторые исследуемые показатели при ОИК.

Таблица 2 – Влияние озона или ректальных суппозиторий с 5-АСК на исследуемые показатели при ОИК

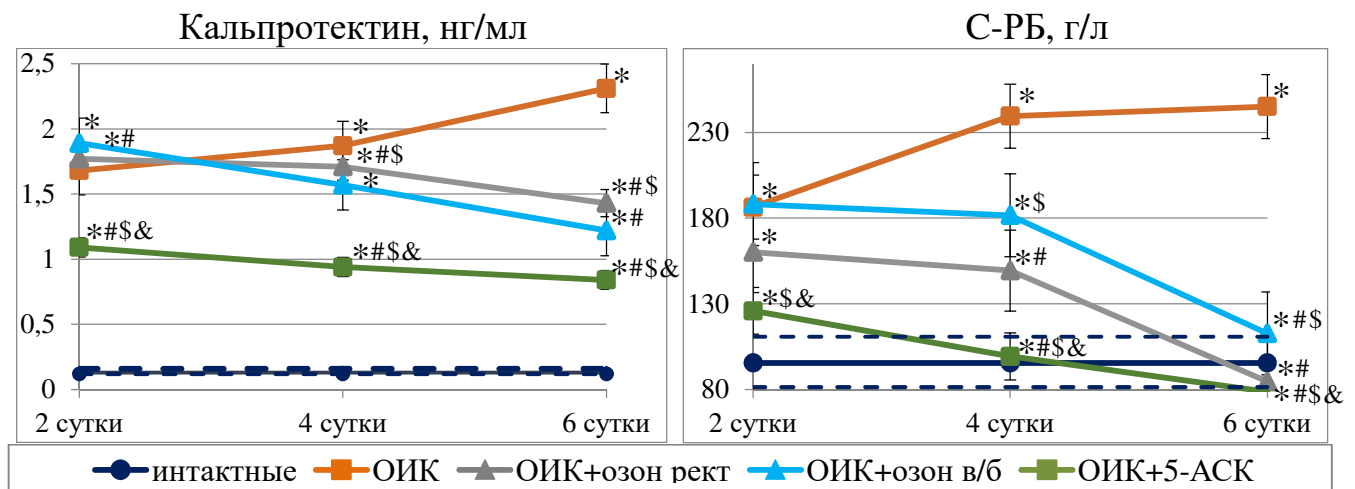
Показатели (Me (Q <sub>1</sub> ; Q <sub>3</sub> ))	Группа 1 Интакт. (n = 9)	Группа 2 (ОИК)			Группа 3 (ОИК + озон рект.)			Группа 4 (ОИК + озон в/б)			Группа 5 (ОИК + 5-АСК)		
		2-е сутки (n = 10)	4-е сутки (n = 10)	6-е сутки (n = 10)	2-е сутки (n = 10)	4-е сутки (n = 10)	6-е сутки (n = 10)	2-е сутки (n = 10)	4-е сутки (n = 10)	6-е сутки (n = 10)	2-е сутки (n = 10)	4-е сутки (n = 10)	6-е сутки (n = 10)
IL-17, пг/г	6,43 (5,84; 7,26)	12,25 (11,93; 12,43) *	18,64 (17,59; 18,97) *	28,64 (21,04; 33,05) *	12,18 (12,16; 12,27) *	11,19 (11,12; 11,68) * #	9,17 (9,05; 9,94) * #	13,19 (12,94; 13,21) * \$	12,16 (12,01; 13,14) * # \$	10,16 (10,07; 11,15) * # \$	10,19 (9,16; 11,97) * # \$ &	7,14 (6,12; 9,06) * # \$ &	6,11 (5,16; 6,61) # \$ &
CD4 <sup>+</sup> , ед./мм <sup>2</sup>	3,86 (3,35; 4,61)	6,67 (5,41; 6,92) *	10,95 (9,15; 11,66) *	12,21 (11,11; 14,77) *	5,25 (4,97; 6,32) *	4,04 (3,42; 4,07) #	3,81 (3,16; 4,47) #	6,36 (5,92; 6,63) *	6,44 (4,93; 10,01) * \$	5,92 (5,01; 6,41) * # \$	5,29 (3,52; 5,78) &	3,71 (3,06; 4,38) # &	3,54 (2,42; 4,07) # &
CD4 <sup>+</sup> FOXP3 <sup>+</sup> , ед./мм <sup>2</sup>	5,05 (5,01; 5,21)	2,81 (2,22; 2,86) *	2,06 (1,86; 2,15) *	1,81 (1,24; 1,92) *	3,05 (2,29; 3,85) *	5,76 (5,16; 7,24) * #	6,73 (6,48; 8,09) * #	3,11 (2,75; 3,31) *	3,67 (2,01; 3,92) * \$	3,16 (2,16; 4,54) * # \$	4,71 (3,96; 5,19) # \$ &	5,65 (3,03; 6,65) # &	5,41 (4,97; 7,01) # &
ИФ ДК	0,34 (0,32; 0,36)	0,52 (0,38; 0,55) *	0,70 (0,62; 1,02) *	0,69 (0,53; 0,95) *	0,60 (0,50; 0,71) * #	0,87 (0,83; 1,21) * #	0,63 (0,62; 0,79) *	0,52 (0,49; 0,54) *	0,53 (0,52; 0,56) * \$	0,47 (0,44; 0,49) * # \$	0,47 (0,41; 0,48) * \$ &	0,50 (0,48; 0,51) * # \$ &	0,49 (0,40; 0,49) * # \$
ИФ КД и СТ	0,31 (0,29; 0,32)	0,64 (0,47; 0,90) *	0,48 (0,38; 0,57) *	0,52 (0,47; 0,53) *	0,65 (0,54; 0,70) *	0,78 (0,70; 1,47) * #	0,31 (0,30; 0,33) #	0,72 (0,54; 0,81) *	0,42 (0,41; 0,43) # \$	0,35 (0,34; 0,41) # \$	0,50 (0,47; 0,52) * \$ &	0,39 (0,37; 0,39) * # \$ &	0,30 (0,30; 0,31) * # &
ИФ ШО	0,01 (0,01; 0,02)	0,08 (0,06; 0,09) *	0,18 (0,11; 0,30) *	0,12 (0,10; 0,18) *	0,06 (0,02; 0,07) *	0,01 (0,01; 0,02) #	0,01 (0,01; 0,02) #	0,08 (0,07; 0,09) * \$	0,03 (0,03; 0,05) # \$	0,11 (0,09; 0,11) * \$	0,06 (0,04; 0,06) * # &	0,01 (0,01; 0,02) # &	0,01 (0,01; 0,02) # &
S АДНФГ спонт., е. и. о.	192,68 (186,25; 193,58)	260,64 (248,94; 269,52) *	289,21 (282,84; 293,81) *	305,23 (293,81; 320,18) *	289,82 (280,18; 293,81) * #	288,21 (288,84; 294,81) *	210,51 (208,94; 229,52) * #	282,93 (239,98; 286,89) *	290,93 (279,98; 301,84) * €	257,98 (249,98; 260,98) * # \$	157,72 (133,14; 167,27) * # \$ &	156,64 (131,07; 164,81) * # \$ &	180,01 (160,22; 191,01) * # \$ &
S КДНФГ спонт., е. и. о.	17,94 (12,23; 18,94)	24,49 (21,07; 25,51) *	28,7 (28,41; 29,25) *	28,64 (27,67; 29,78) *	30,09 (28,86; 30,46) * #	27,54 (25,78; 28,86) *	20,86 (20,51; 21,07) * #	27,48 (22,97; 27,98) * \$	29,64 (27,98; 30,46) *	28,42 (26,98; 29,89) * \$	14,87 (12,22; 17,34) # \$ &	18,81 (18,21; 19,48) # \$ &	16,82 (16,15; 17,39) # \$ &

Примечание – \* – статистически значимые (p < 0,05) различия с группой 1; # – с группой 2; \$ – с группой 3; & – с группой 4. ИФ – изопропанольная фаза, ДК – диеновые конъюгаты, КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – Шиффовы основания, S – суммарное содержание, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны.

Общеизвестным является наличие анемии при ВЗК, механизм развития которой включает явное или скрытое кровотечение при повреждении стенки кишки, снижение эффектов эритропоэтина на костный мозг вследствие избыточного синтеза TNF- $\alpha$ , внутрисосудистый гемолиз в условиях окислительного стресса в крови, а также дефицит железа при развитии синдрома мальабсорбции (Харитонов Е. Р. и др., 2020) и др. механизмы. Роль изменений клеточного состава, иммунного статуса, свободнорадикального окисления в крови и в очаге повреждения в патогенезе оксазолон-индуцированного колита представлена на интегральной схеме (рисунок 5).

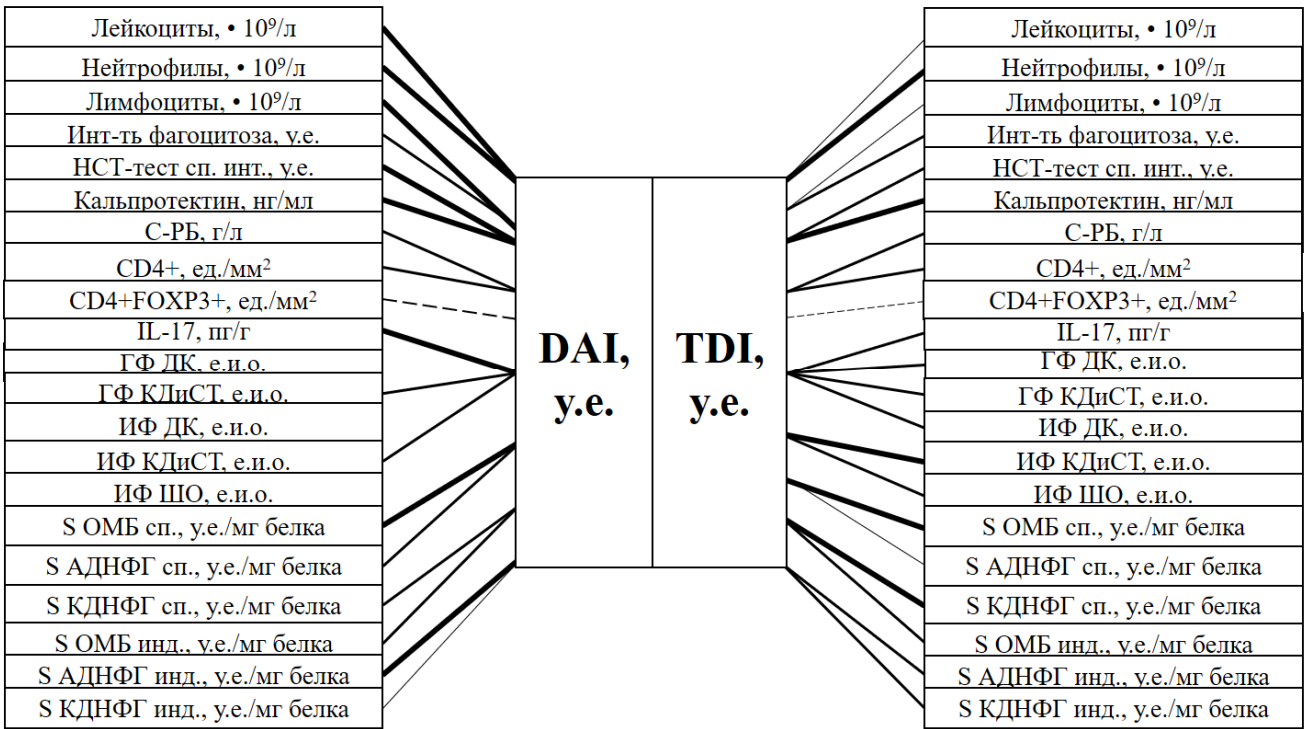
При ОИК в условиях ректального применения озона на 4-е и 6-е сутки отмечено улучшение клинической картины (уменьшение индекса DAI) и изменение морфологической картины очага повреждения: на 4-е и 6-е сутки уменьшилась инфильтрация лимфоцитами, нейтрофилами и эозинофилами, диаметр язвенного дефекта, индекс TDI, на 4-е сутки увеличилась инфильтрация лимфоцитами и площадь распределения сосудов, на 4-е и 6-е сутки увеличилось количество фибробластов, на 2-е, 4-е и 6-е сутки – гистиоцитов (таблица 2).

Ректальное применение озона при ОИК приводит к снижению в крови количества лейкоцитов на 2-е сутки за счет снижения количества лимфоцитов и палочкоядерных нейтрофилов, на 4-е сутки – за счет снижения количества лимфоцитов и эозинофилов, на 6-е сутки – за счет снижения количества лимфоцитов и моноцитов. Снижается поглотительная способность нейтрофилов на 4-е и 6-е сутки, НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов в спонтанном режиме – на 2-е и 4-е сутки, в индуцированном режиме – на 2-е и 6-е сутки; снижаются содержание кальпротектина в кале и концентрация С-РБ в сыворотке на 4-е и 6-е сутки (таблица 2, рисунок 3). В очаге повреждения толстой кишки на 4-е и 6-е сутки снижается содержание IL-17, CD4<sup>+</sup>, увеличивается – CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> лимфоцитов (таблица 2). В крови на 4-е и 6-е сутки увеличиваются количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, на 2-е, 4-е и 6-е сутки уменьшается ширина распределения эритроцитов, на 6-е сутки – средний объем эритроцита.



Примечание – \* –  $p < 0,01$  с группой интактных; # –  $p < 0,01$  с группой 2 (ОИК); \$ –  $p < 0,01$  с группой 3 (ОИК + озон ректально); & –  $p < 0,01$  с группой 4 (ОИК + озон внутривенно).

Рисунок 3 – Влияние озона или ректальных суппозиторий с 5-АСК на содержание кальпротектина в кале и концентрацию С-РБ в сыворотке при ОИК.



Примечание – Сплошные линии означают прямые связи, пунктирные – обратные связи, тонкие линии (0,25 пт) – умеренные связи, средней жирности (1,5 пт) – заметные связи, жирные (3 пт) – высокие связи.

Рисунок 4 – Корреляция при ОИК между DAI, TDI и показателями иммунного статуса, свободнорадикального окисления.



Рисунок 5 – Роль изменений клеточного состава, иммунного статуса, свободнорадикального окисления в крови и в очаге повреждения в патогенезе оксазолон-индуцированного колита. Предполагаемые механизмы обозначены пунктирной линией.

При ректальном применении озона при ОИК в очаге повреждения толстой кишки в гептановой фазе липидного экстракта содержание первичных продуктов ПОЛ уменьшается на 6-е сутки, вторичных продуктов – на 2-е сутки увеличивается, а на 4-е и 6-е сутки – уменьшается; в изопропанольной фазе липидного экстракта содержание первичных продуктов ПОЛ увеличивается на 2-е и 4-е сутки, вторичных продуктов на 4-е сутки – увеличивается, а на 6-е сутки – снижается, конечных продуктов на 4-е и 6-е сутки – снижается. В спонтанном режиме детекции на 2-е сутки увеличивается, а на 6-е сутки снижается суммарное содержание продуктов ОМБ за счет ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера; в металл-индуцированном режиме детекции на 2-е и 4-е сутки увеличивается суммарное содержание продуктов ОМБ за счет ранних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера, на 6-е сутки снижается суммарное содержание продуктов ОМБ за счет ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера (таблица 2).

Внутрибрюшинное применение озона на 4-е и 6-е сутки уменьшает клинические признаки активности болезни (по индексу DAI), изменяет морфологическую картину очага повреждения толстой кишки: увеличивает инфильтрацию гистиоцитами и фибробластами, уменьшает диаметр язвенного дефекта, снижает индекс TDI; на 4-е сутки увеличивается площадь распределения сосудов, на 6-е сутки уменьшается инфильтрация лимфоцитами, нейтрофилами и эозинофилами (рисунок 2).

При внутрибрюшинном применении озона при ОИК установлено, что на 6-е сутки в крови снижается количество лейкоцитов за счет нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов, на 4-е и 6-е сутки снижается поглотительная способность нейтрофилов, на 2-е и 4-е сутки – НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов в спонтанном режиме, на 2-е, 4-е и 6-е сутки – в индуцированном режиме (рисунок 2). На 6-е сутки в кале снижается содержание кальпротектина; на 4-е и 6-е сутки в сыворотке снижается концентрация С-РБ, в очаге повреждения толстой кишки снижается содержание IL-17; на 6-е сутки в очаге повреждения снижается количество CD4<sup>+</sup> лимфоцитов и увеличивается количество CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> лимфоцитов (таблица 2, рисунок 3). В крови на 4-е и 6-е сутки увеличиваются количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит и снижается ширина распределения эритроцитов, на 6-е сутки уменьшается средний объем эритроцитов.

При ОИК в условиях внутрибрюшинного применения озона в очаге повреждения толстой кишки в гептановой фазе липидного экстракта содержание вторичных продуктов ПОЛ снижается на 4-е и 6-е сутки, конечных продуктов ПОЛ – на 6-е сутки; в изопропанольной фазе содержание первичных продуктов ПОЛ снижается на 6-е сутки, вторичных продуктов – на 4-е и 6-е сутки, конечных продуктов – на 4-е сутки. В спонтанном и металл-индуцированном режимах детекции снижается суммарное содержание продуктов ОМБ за счет ранних продуктов нейтрального и основного характера (таблица 2).

Таким образом, эффект внутрибрюшинного и ректального применения озона по следующим показателям не имеет значимых различий на 2-е, 4-е и 6-е сутки ОИК: индексу DAI, количеству гистиоцитов в очаге повреждения, количеству в крови эозинофилов и моноцитов, активности спонтанного НСТ-теста нейтрофилов крови, функциональному резерву нейтрофилов крови, концентрации С-РБ в сыворотке,



содержанию конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта очага повреждения толстой кишки.

Исследуемые показатели при ректальном применении озона при сравнении с внутрибрюшинным отличаются и частично или полностью восстанавливаются в очаге повреждения в отношении количества лимфоцитов, нейтрофилов и эозинофилов на 4-е и 6-е сутки, фибробластов – на 6-е сутки, диаметра язвенного дефекта – на 4-е и 6-е сутки, индекса TDI – на 2-е, 4-е и 6-е сутки (рисунок 2). В крови в отношении общего количества лейкоцитов – на 4-е и 6-е сутки, количества нейтрофилов – на 2-е и 6-е сутки, лимфоцитов – на 2-е, 4-е и 6-е сутки, активности фагоцитоза нейтрофилов крови – на 2-е, 4-е и 6-е сутки, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа – на 6-е сутки, интенсивности спонтанного и активности индуцированного НСТ-теста – на 2-е сутки, интенсивности индуцированного НСТ-теста – на 6-е сутки; в отношении количества эритроцитов – на 2-е, 4-е и 6-е сутки, концентрации гемоглобина – на 2-е и 6-е сутки, гематокрита – на 4-е и 6-е сутки (рисунок 2). Отличия при ректальном применении озона при сравнении с внутрибрюшинным установлены для концентрации в кале кальпротектина на 4-е и 6-е сутки (рисунок 3).

При оценке показателей в очаге повреждения толстой кишки при ректальном применении озона в отличие от внутрибрюшинного установлено, что эффект более выражен в отношении концентрации IL-17 на 2-е, 4-е и 6-е сутки, количества CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> лимфоцитов – на 4-е и 6-е сутки; в гептановой фазе липидного экстракта в отношении содержания первичных продуктов ПОЛ – на 6-е сутки, вторичных продуктов ПОЛ – на 4-е и 6-е сутки, в изопропанольной фазе липидного экстракта в отношении вторичных продуктов ПОЛ – на 6-е сутки, конечных продуктов ПОЛ – на 2-е, 4-е и 6-е сутки; в спонтанном режиме детекции в отношении суммарного содержания продуктов ОМБ, в том числе ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера, – на 6-е сутки, в металл-индуцированном режиме детекции в отношении суммарного содержания продуктов ОМБ, в том числе поздних продуктов нейтрального и основного характера, – на 6-е сутки (таблица 2). Эффект ректального применения озона в отличие от внутрибрюшинного в очаге повреждения толстой кишки в изопропанольной фазе менее выражен в отношении первичных продуктов ПОЛ на 4-е и 6-е сутки, вторичных продуктов ПОЛ – на 4-е сутки. Таким образом, по большинству исследуемых показателей при ОИК эффект ректального применения озона по сравнению с внутрибрюшинным более выражен и направлен на полное или частичное восстановление показателей (таблица 2).

Полагаем, что зафиксированное нами улучшение клинико-морфологической картины при ОИК в условиях внутрибрюшинного или ректального применения озона реализуется за счет нескольких механизмов (рисунок 6). Во-первых, это противовоспалительный и иммунорегуляторный эффекты озона: в очаге повреждения отмечается уменьшение инфильтрации нейтрофилами, эозинофилами, содержания CD4<sup>+</sup>, увеличение содержания CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, снижение содержания IL-17, снижение содержания в кале кальпротектина, в сыворотке – С-РБ. Данные эффекты реализуются за счет способности молекулы озона и продуктов его метаболизма (пероксид озона, 4-HNE) проникать в цитоплазму иммунокомпетентных клеток и модулировать действие транскрипционных факторов Nrf2, NF-κβ и др.

(Bocci V. et al., 2015; Orakdogen M. et al., 2016). Озон и продукты озонлиза подавляют активность NF- $\kappa$ B и продукцию провоспалительных цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23 (Martínez-Sánchez G. et al., 2020). Снижение синтеза IL-8 ограничивает накопление в стенке толстой кишки нейтрофилов, которые инициируют и поддерживают процессы СРО; снижение синтеза IL-6 ограничивает выраженность ответа острой фазы, концентрацию С-РБ в сыворотке и кальпротектина в кале (Li L. Y. et al., 2017). Как следствие, уменьшается рекрутинг активированных нейтрофилов, моноцитов в очаг, уменьшается активация эндотелиоцитов, снижается выработка данными клетками АФК, соответственно, уменьшается площадь вторичной альтерации (Barbarisi L. et al., 2018). Снижение интенсивности альтеративных и сосудисто-экссудативных реакций в очаге повреждения приводит к восстановлению численности Treg, что ограничивает аутоиммунные реакции (Barko M. et al., 2018).

Во-вторых, озон и его производные могут выступать регуляторами редокс-статуса напрямую и опосредованно. Озон реагирует с изолированными двойными связями полиненасыщенных жирных кислот и образует пероксид озона, который является активным окислителем, как следствие, увеличивается содержание продуктов ПОЛ и ОМБ в очаге повреждения. Связанные с мембраной пероксиды озона могут действовать как вторичные мессенджеры через остатки цистеина либо восстановление посредством глутатиона и инициируют передачу сигнала через комплекс Keap1/Nrf2 с последующей модификацией белка KEAP и транслокацией Nrf2 в ядро (Togi S. et al., 2021). Nrf2 активирует синтез ферментов антиокислительной защиты хинооксидоредуктазы-1, гемоксигеназы-1, СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, гемоксигеназы (Viebahn-Haensler R. et al., 2021). За счет данного механизма в очаге повреждения толстой кишки снижается содержание продуктов ПОЛ и ОМБ.

В-третьих, озон и его метаболиты обладают антианемическим эффектом, нами показано при ОИК увеличение исходно сниженных количества в крови эритроцитов, концентрации гемоглобина и гематокрита. Как отмечено выше, под действием озона может снижаться синтез TNF- $\alpha$ , который является антагонистом эритропоэтина, что приводит к восстановлению регуляции эритропоэза.

Пероксид озона влияет на внутриклеточный эритроцитарный метаболизм и способствует образованию «сверходаренных эритроцитов», повышая уровень в них 2,3-дифосфоглицерата при озонлизе полиненасыщенных жирных кислот, что облегчает отдачу кислорода в недостаточно кровоснабжаемых тканях очага повреждения и поддерживает адекватный репаративный ответ (Rowen R. J. et al., 2019). Под действием озона мембрана эритроцита становится более эластичной и деформируемой, что улучшает гемореологию (Schwartz A., Sánchez G. et al., 2019).

В-четвертых, озон обладает репаративным эффектом, в частности, за счет увеличения экстравазации тромбоцитов, фибронектина в очаг повреждения, где тромбоциты синтезируют ростовой фактор TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  и др., которые активируют фибробласты через сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR (dos Santos J. V. N. et al., 2017). Кроме этого, ограничение под влиянием озона окислительной деструкции в очаге повреждения, коррекции гипоксии и микроциркуляторных нарушений, ликвидация

энергодифицита в клетках оказывают позитивное влияние на процессы репарации ткани толстой кишки.

Еще одним механизмом действия озона при ОИК может выступать коррекция микробиоты кишечника. Продемонстрирована чувствительность к озону стафилококка, синегнойной и кишечной палочки и показано, что их гибель имеет обратную корреляцию с концентрацией озона и временем экспозиции (Маллаева А. П. и др., 2018). Положительный эффект озона в отношении микробиоты ротовой полости выявлен в стоматологической практике при заболеваниях пародонта, кариесе, поражениях слизистых (Sen S. et al., 2020). Установленные в ходе проведенного исследования и предполагаемые механизмы протекторного действия озона при ОИК представлены на интегральной схеме (рисунок 6).

5-АСК – препарат первой линии в терапии ВЗК, это объясняет его выбор в качестве препарата сравнения для оценки эффективности применения озона при ОИК. При сравнении эффектов ректальных суппозиторий с 5-АСК и ректального применения озона при ОИК различия обнаружены для следующих показателей: в очаге повреждения для количества лимфоцитов, эозинофилов, гистиоцитов, плазмоцитов, фибробластов; в крови для общего количества лейкоцитов, количества нейтрофилов, в том числе сегментоядерных, интенсивности фагоцитоза и фагоцитарного числа; в сыворотке для концентрации С-РБ; в крови для количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, среднего объема эритроцита и ширины распределения эритроцитов; в кале для содержания кальпротектина; в очаге повреждения для концентрации IL-17, содержания в изопропанольной фазе первичных и вторичных продуктов ПОЛ, в спонтанном режиме детекции суммарного содержания продуктов ОМБ, в том числе ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера, в металл-индуцированном режиме детекции для суммарного содержания продуктов ОМБ, в том числе ранних продуктов нейтрального и основного характера (таблица 2, рисунки 2, 3).

При сравнении эффектов ректальных суппозиторий с 5-АСК и внутрибрюшинного применения озона различия обнаружены для следующих показателей: в очаге повреждения для количества лимфоцитов, нейтрофилов, гистиоцитов, эозинофилов, плазмоцитов, фибробластов, диаметра язвенного дефекта и индекса TDI; в крови для количества лейкоцитов, нейтрофилов (в том числе сегментоядерных), лимфоцитов, моноцитов, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов; для концентрации кальпротектина в кале; в сыворотке для концентрации С-РБ; в очаге повреждения для количества CD4<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> лимфоцитов, концентрации IL-17; в крови для количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцитов, ширины распределения эритроцитов; в очаге повреждения для содержания в гептановой фазе первичных и вторичных продуктов ПОЛ, в изопропанольной фазе первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ, в спонтанном режиме детекции для суммарного содержания продуктов ОМБ, в том числе ранних и поздних продуктов нейтрального и основного характера, в металл-индуцированном режиме детекции для суммарного содержания продуктов ОМБ, в том числе ранних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера (таблица 2, рисунки 2, 3).

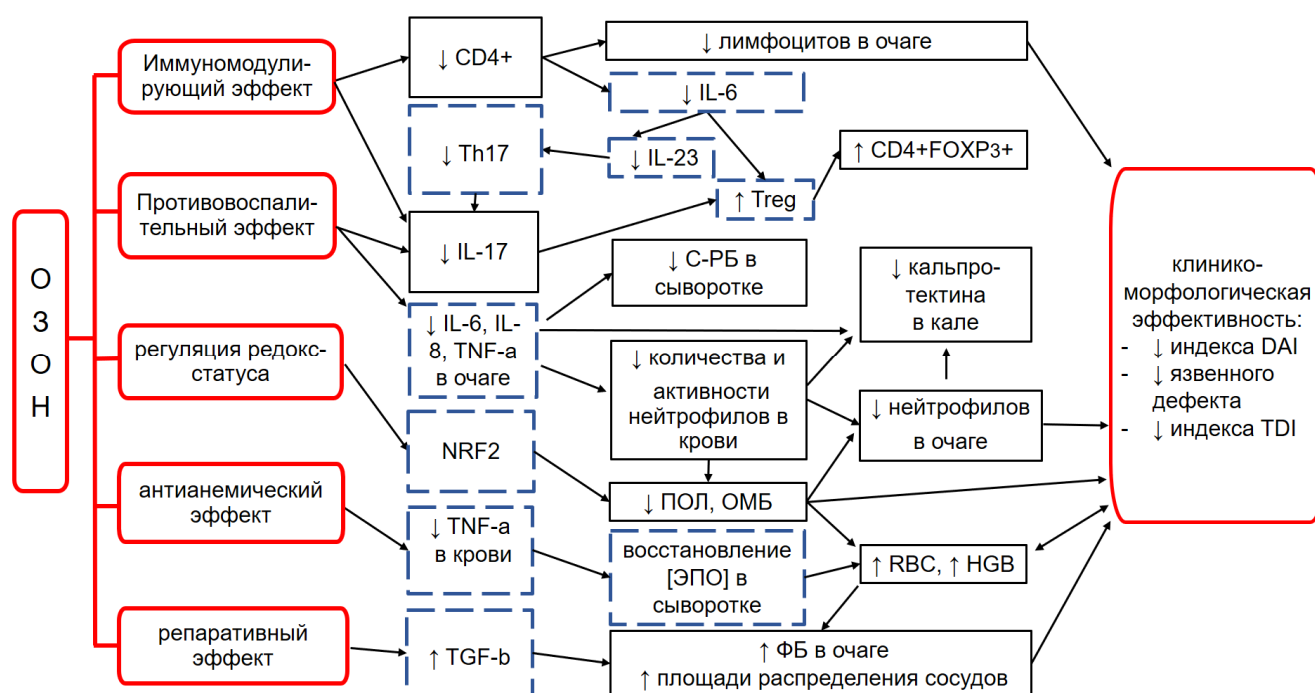


Рисунок 6 – Установленные и предполагаемые (выделены пунктиром) механизмы протекторного действия озона при оксазолон-индуцированном колите.

В целом при ОИК ректальное применение озона по сравнению с внутрибрюшинным оказалось более эффективным в отношении частичного или полного восстановления исследуемых показателей. Выявлено, что ректальное применение озона ближе по своим эффектам к 5-АСК. Данные факты связаны с тем, что ректальное применение приводит к непосредственному воздействию озона на очаг повреждения толстой кишки. Ректальное введение озона все чаще применяют в клинической практике, что дает основание рассматривать его как альтернативу внутривенному введению озонасыщенного физиологического раствора и даже большой аутогеомоозонотерапии.

Внутрибрюшинное применение озона в определенной мере является аналогом внутривенного применения, когда озон, поступая в кровь, вступает в химические реакции с образованием различных пероксидов. Последние напрямую влияют на функциональную активность нейтрофилов, моноцитов/макрофагов в крови, ограничивают их миграцию в очаг воспаления. Данный метод применения озона оказывает отсроченный положительный эффект.

## ВЫВОДЫ

1. При оксазолон-индуцированном колите на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента клинические проявления и морфологические признаки в очаге повреждения толстой кишки ассоциированы с концентрацией кальпротектина в кале, содержанием  $CD4^+$ ,  $CD4^+FOXP3^+$ , IL-17, продуктов ПОЛ и ОМБ в очаге повреждения толстой кишки, показателями ответа острой фазы в крови: содержанием нейтрофилов, моноцитов, функциональной активностью нейтрофилов, концентрацией С-РБ.

2. Применение ежедневно при экспериментальном колите озono-кислородной смеси ректально в дозе озона 0,1 мг/кг преимущественно на 4-е и 6-е сутки снижает выраженность клинических признаков поражения толстой кишки; снижает

содержание в очаге повреждения толстой кишки нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, уменьшает размер язвенного дефекта, индекс TDI; увеличивает количество гистиоцитов, фибробластов, площадь сосудистого русла.

3. Иммуотропный эффект ректального применения озона при экспериментальном колите проявился преимущественно на 4-е и 6-е сутки в очаге повреждения толстой кишки в снижении содержания  $CD4^+$ , увеличении –  $CD4^+FOXP3^+$ , снижении концентрации IL-17; снижении содержания кальпротектина в кале; в снижении в крови количества эозинофилов, моноцитов, лимфоцитов, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, концентрации С-РБ.

4. Применение при экспериментальном колите озона ректально приводит в очаге повреждения толстой кишки к увеличению на 2-е сутки и снижению на 4-е и 6-е сутки содержания продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, ранних и поздних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера; в крови к увеличению количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, гематокрита на 4-е и 6-е сутки.

5. Применение ежедневно при экспериментальном колите озono-кислородной смеси внутривнутрибрюшинно в дозе озона 0,05 мг/кг на 4-е и 6-е сутки снижает индексы DAI и TDI; в очаге повреждения толстой кишки на 4-е и 6-е сутки увеличивает содержание гистиоцитов, фибробластов, уменьшает размер язвенного дефекта, на 6-е сутки снижает содержание нейтрофилов, эозинофилов.

6. Внутривнутрибрюшинное применение озона при экспериментальном колите приводит преимущественно на 6-е сутки к увеличению содержания в очаге повреждения толстой кишки  $CD4^+FOXP3^+$ , снижению –  $CD4^+$ , IL-17, продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта, ранних продуктов ОМБ нейтрального и основного характера, содержания кальпротектина в кале; снижению в крови количества лимфоцитов, моноцитов, количества и функциональной активности нейтрофилов, концентрации С-РБ, увеличению количества эритроцитов, концентрации гемоглобина, гематокрита.

7. Эффект при экспериментальном колите от ректального применения озона по сравнению с внутривнутрибрюшинным более выражен и направлен на восстановление индекса TDI, содержания лимфоцитов, нейтрофилов, эозинофилов,  $CD4^+$ ,  $CD4^+FOXP3^+$ , IL-17, продуктов ПОЛ в очаге повреждения толстой кишки, содержания кальпротектина в кале, количества в крови нейтрофилов, лимфоцитов, эритроцитов, гематокрита, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов в крови.

8. Эффект от ректального применения озона при экспериментальном колите в большей мере, чем эффект от внутривнутрибрюшинного применения озона, сопоставим с эффектом от применения ректальных суппозиторий с 5-АСК, что проявилось в отношении индекса TDI, количества в очаге повреждения нейтрофилов, эозинофилов, диаметра язвенного дефекта, количества в крови лимфоцитов, моноцитов, НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, содержания в очаге повреждения  $CD4^+$ ,  $CD4^+FOXP3^+$ , первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой и конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазах липидного экстракта.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Осиков, М. В. 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 Российского государственного медицинского университета.** – 2020. – № 3. – С. 63–70. [ИФ РИНЦ – 0, IF Web of Science – 0, SJR Scopus – 0,132].
2. Осиков, М. В. Влияние ректального применения озона на интенсивность свободнорадикальной деструкции липидов и белков кишечника в динамике экспериментального колита / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, Н. В. Кайгородцева, А. А. Федосов, М. А. Ильиных, К. С. Савчук, Л. В. Воргова // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2022. – Т. 173, № 1. – С. 33–37. [ИФ РИНЦ 0,319, IF Web of Science – 0,737, SJR Scopus – 0,236].
3. Осиков, М. В. Влияние локальной озонотерапии на маркеры активности воспалительного процесса при экспериментальном язвенном колите / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, Н. В. Кайгородцева // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 47–53. [ИФ РИНЦ – 0,758, IF Web of Science – 0, SJR Scopus – 0,124].
4. Давыдова, Е. В. Динамика иммунных изменений в очаге повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите на фоне озонотерапии / Е. В. Давыдова, М. В. Осиков, Н. В. Кайгородцева // **Медицинская иммунология.** – 2022. – Т. 24, № 2. – С. 379–388. [ИФ РИНЦ – 0,827, SJR Scopus – 0,130].
5. Бойко, М. С. Роль иммунных факторов в патогенезе экспериментального язвенного колита / М. С. Бойко, М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, Н. В. Кайгородцева, И. Р. Галеева, В. А. Бычковских // **Современные проблемы науки и образования.** – 2020. – № 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29659>. [ИФ РИНЦ – 0,519].
6. Осиков, М. В. Аутоиммунный профиль крови крыс при экспериментальном язвенном колите / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, Н. В. Кайгородцева, А. Е. Бакеева // **Российский иммунологический журнал.** – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 181–188. [ИФ РИНЦ – 0,138].
7. Осиков, М. В. Сравнительный анализ локального противовоспалительного действия озона и 5-АСК при экспериментальном оксазолон-индуцированном колите / М. В. Осиков, Н. В. Кайгородцева // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия.** – 2022. – Т. 66, № 3. – С. 91–100. [ИФ РИНЦ – 0,435].
8. Осиков, М. В. Сравнительный анализ влияния озона и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите на показатели врожденного иммунитета / М. В. Осиков, М. С. Бойко, Н. В. Кайгородцева, А. А. Федосов // **Российский иммунологический журнал.** – 2022. – Т. 25. – № 2. – С. 313–320. [ИФ РИНЦ – 0,138].
9. Осиков, М. В. Противовоспалительный эффект внутрибрюшинного применения озона при экспериментальном колите / М. В. Осиков, Н. В. Кайгородцева, М. С. Бойко // **Современные проблемы науки и образования.** – 2022. – № 4. URL: <https://science-education.ru/article/view?id=31936>. [ИФ РИНЦ – 0,519].
10. Способ внутрибрюшинного применения медицинского озона для лечения язвенного колита / Осиков М.В., Давыдова Е.В., Кайгородцева Н.В., Бакеева А.Е. //

Заявка на изобретение № 2021123148/14(048302) от 30.07.2021. Получено положительное решение о выдаче патента от 14.09.2022.

11. Осиков, М. В. Острофазовый ответ при оксазолон-индуцированном язвенном колите / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, Н. В. Кайгородцева // Типовые патологические процессы: современные тренды в науке: сборник трудов, посвященный 130-летию кафедры патофизиологии Императорского (государственного) томского университета – Томского медицинского института – Сибирского государственного медицинского университета / под ред. члена-корреспондента РАН О. И. Уразовой. – Томск : Изд-во «Печатная мануфактура», 2020. – С. 61–62.

12. Осиков, М. В. Влияние озона на окислительную деструкцию белков в стенке кишки при экспериментальном колите / М. В. Осиков, Е. В. Давыдова, А. Е. Бакеева, Н. В. Кайгородцева // Южно-Уральский медицинский журнал. – 2021. – № 3. – С. 100–109. [ИФ РИНЦ – 0,164].

13. Кайгородцева, Н. В. Сравнительный анализ эффективности локального и системного применения озона при экспериментальном колите / Н. В. Кайгородцева, А. А. Афлятунова // Материалы XXVIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022». – Санкт-Петербург, 2022. – С. 72–73.

#### **Список сокращений и условных обозначений**

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ЯК – язвенный колит

БК – болезнь Крона

5-АСК – 5-аминосалициловая кислота

ОИК – оксазолон-индуцированный колит

DAI – индекс активности болезни (disease activity index)

С-РБ – С-реактивный белок

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ДК – диеновые конъюгаты

КД и СТ – кетодиены и сопряженные триены

ШО – основания Шиффа

ОМБ – окислительная модификация белков

АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны

КДНФГ – кетондинитрофенилгидразоны

TDI – индекс повреждения тканей (tissue damage index)

Кайгородцева Наталья Васильевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОЗОНА  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОЛИТЕ**

3.3.3 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Челябинск – 2022

Подписано в печать \_\_.10.2022.  
Формат 60 × 84 <sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Усл. печ. л. 1,93.  
Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman суг.  
Печать лазерная. Тираж 100 экз. Заказ №

Отпечатано в