

На правах рукописи

Бакеева Алина Евгеньевна

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

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в научно-образовательном центре (НОЦ) «Проблемы фундаментальной медицины» и на кафедре Патологической физиологии

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Осиков Михаил Владимирович

Кандидат фармацевтических наук, доцент

Симонян Елена Владимировна

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор
кафедры нормальной и патологической
физиологии с курсом гигиены ФГБОУ ВО
«Национальный исследовательский
Мордовский государственный
университет им. Н. П. Огарёва» Минздрава
России

**Власова
Татьяна Ивановна**

Доктор биологических наук, профессор
кафедры клинической иммунологии,
аллергологии и лабораторной диагностики
факультет повышения квалификации и
профессиональной переподготовки
специалистов ФГБОУ ВО «Кубанский
государственный медицинский
университет» Минздрава России

**Колесникова
Наталья Владиславовна**

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (Омск)

Защита состоится «16» июня 2021 г. в «12.00» часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 004.027.02, на базе ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106).

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (ул. Софьи Ковалевской, д.20/20) и на сайте ИИФ УрО РАН – <http://iir.uran.ru>, с авторефератом – на сайте ВАК РФ <http://vak2.ed.gov.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 года

Ученый секретарь Совета Д 004.027.02
на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН,
доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

И.А.Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработки. В мире и в России показатели заболеваемости воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) варьируют в широких пределах, но позволяют уверенно говорить о росте. По данным систематических обзоров, заболеваемость язвенным колитом (ЯК) варьирует от 27 до 117 на 100 тыс. населения в различных странах мира. В Европе заболеваемость ЯК возросла с 6,0 на 100 тыс. человеко-лет в 1962 г. до 9,8 на 100 тыс. человеко-лет в 2010 г. (Burisch J. et al., 2015), по другим данным - до 24,3 на 100 тыс. человеко-лет (Ray G., 2019). Особое значение имеет увеличение заболеваемости ВЗК у молодых трудоспособных граждан, а также высокая вероятность развития осложнений при ВЗК (Kappelman M.D. et al., 2013).

Патогенез ВЗК до конца не изучен. Ключевым фактором выступает иммунный ответ в генетически восприимчивом организме на антигены кишечной микрофлоры и измененной слизистой оболочки ЖКТ с поляризацией в сторону Th1- и Th17- зависимых реакций при БК, Th2-зависимых реакций при ЯК (Lin R. et al., 2018), дефицитом Treg, активацией моноцитов/макрофагов, нейтрофилов и др. клеток. Медиаторами повреждения стенки кишечника выступают ферменты, АФК в условиях дисбаланса системы прооксиданты-антиокислительная защита, про- и противовоспалительные цитокины, иммуноглобулины и др. (Lee S.H. et al., 2018; Segal A.W., 2019; Moschen A.R. et al., 2019; Kiernan M.G. et al., 2020). Комплексная оценка изменений гомеостаза при экспериментальном колите, включая клинические признаки, исследование факторов врожденного и адаптивного иммунитета в крови, морфологии и редокс-статуса очага повреждения позволит дополнить имеющиеся представления о механизме развития ВЗК, обозначить ведущие звенья патогенеза в качестве цели патогенетической терапии, диагностических и прогностических маркеров.

Не менее 30% пациентов с ВЗК рефрактерны к базисной терапии, у многих возникает широкий спектр побочных явлений, ограничивающих ее применение (Eustace G.J. et al., 2018; Weisshof R. et al., 2018). В связи с этим, альтернативные терапевтические стратегии при ВЗК являются объектом внимания многих исследовательских групп, могут включать применение пребиотиков, мезенхимальных стволовых клеток, толерогенных цитокинов и клеток и др. (Giuffrida P. et al., 2019; Moschen A.R. et al., 2019; Panés J. et al., 2018; Weisshof R. et al., 2018). Востребованным является разработка новых, обоснованных с патогенетических позиций и безопасных лекарственных средств преимущественно локального действия с активными веществами эндогенного или растительного происхождения. В экспериментальных и клинических условиях продемонстрирована эффективность применения при ВЗК таких растительных средств как босвеллия серрата, алоэ вера, андрографис метельчатый, вяз жёлтый и мн. др., что во многом обусловлено наличием в их составе полифенолов и флавоноидов (Khan H. et al., 2019). В этом отношении привлекает внимание экстракт корневищ Куркумы длинной (*Curcuma longa* L.), содержащий куркуминоидный комплекс, плеiotропные эффекты которого, включая антиоксидантные, цитопротекторные, антиапоптогенные, противовоспалительные, иммуномодулирующие, антимикробные и др., были продемонстрированы в клинических и экспериментальных условиях при ревматоидном артрите, увеите, атеросклерозе и др. заболеваниях, что предполагает его эффективность при ВЗК (Boozari M. et al., 2019; Kahkhaie K.R. et al., 2019). В РФ отсутствуют зарегистрированные лекарственные формы, содержащие куркумин, за исключением биологически активных добавок, что существенно ограничивает его изучение и возможности для применения при ВЗК.

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

Задачи исследования

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

Научная новизна исследования. При экспериментальном колите проведен комплексный анализ изменений клинических параметров, параметры врожденного и адаптивного иммунитета, морфологии и свободнорадикального окисления в очаге повреждения толстого кишечника. Продемонстрировано, что клинические и морфологические признаки заболевания ассоциированы с увеличением в крови количества CD3⁺, CD45RA⁺ лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, повышением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, увеличением концентрации IL-23, IgM, IgG, повышением в очаге повреждения кишечника содержания TNF- α и миелопероксидазы, накоплением первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов преимущественно в изопропанольной фазе липидного экстракта и преимущественно вторичных продуктов окислительной модификации белков основного характера.

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

Установлено, что протекторное действие экстракта куркумы при экспериментальном колите связано с уменьшением содержания в очаге повреждения толстого кишечника продуктов перекисного окисления липидов и продуктов

окислительной модификации белков, частичным восстановлением резервно-адаптационного потенциала, снижением в крови количества нейтрофилов и CD3+ лимфоцитов, увеличением количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижением концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке и содержания TNF- α , миелопероксидазы в очаге повреждения толстого кишечника. Сравнительный анализ эффектов при экспериментальном колите экстракта куркумы и 5-аминосалициловой кислоты в составе ректальных суппозиториев выявил их сопоставимость в отношении параметров адаптивного иммунитета в крови, свободнорадикального окисления и содержания миелопероксидазы и TNF- α в очаге повреждения, меньшую выраженность эффектов экстракта куркумы в отношении параметров врожденного иммунитета в крови и большую выраженность по ограничению деструктивных явлений и активации репарации в очаге повреждения толстого кишечника.

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

Разработан состав и с патогенетических позиций обосновано применение при экспериментальном колите нового лекарственного средства экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев, которое позволяет снизить выраженность клинических признаков, что сопоставимо с эффектом ректальных суппозиториев с 5-аминосалициловой кислотой и значительно ограничить деструктивные явления и активировать репарацию в очаге повреждения. Показано, что протекторное действие экстракта куркумы реализуется за счет локального антиоксидантного эффекта в очаге повреждения, коррекции врожденного и адаптивного иммунитета. Представленные в работе экспериментальные результаты являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований по эффективности применения экстракта куркумы при экспериментальном колите с последующим внедрением нового лекарственного препарата в клиническую практику.

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

Экспериментальные исследования выполнены на 210 крысах линии Wistar массой 240 ± 20 г в экспериментально-биологической клинике (виварий) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. Эксперимент проводился при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей

утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18.03.1986, Страсбург), Рекомендациями Европейской Комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 года, Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Методы исследования включали: экспериментальное моделирование, оценку клинических симптомов по индексу активности болезни (disease activity index, DAI), гематологические, биохимические, иммунологические, иммуноферментного анализа и иммуногистохимические с использованием специфических тест-систем для крыс, морфологические, фармацевтические, статистический анализ.

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры Патологической физиологии, кафедры Фармации и химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, научную работу научно-образовательного центра «Проблемы фундаментальной медицины» ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.03 – Патологическая физиология, а именно пунктам 2, 6, 8, 9, 10 области исследования, указанной в паспорте данной специальности.

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Проведены экспериментальные исследования *in vivo* на 210 белых крысах - самцах линии Wistar массой 240 ± 20 г, содержащихся в экспериментально-биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России при строгом соблюдении требований по уходу, а также выводу из эксперимента с последующей утилизацией. Для общей анестезии внутримышечно вводили препарат «Золетил» (МНН: тилетамина гидрохлорид, «Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 20 мг/кг. Животные были случайным образом разделены на 4 группы:

Группа 1 (n=21) – интактный контроль.

Группа 2 (n=63) – животные с экспериментальным колитом (ЭК).

Группа 3 (n=63) – животные с ЭК в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы.

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

Экспериментальный колит моделировали путем ректального введения тринитробензолсульфоновой (ТНБС) кислоты («Sigma-Aldrich», USA) (Morris G.P. et al., 1989, Сосса Е.А. et al., 2014). 30 мг ТНБС растворяли в 150 мл 50% этанола, однократно

ректально вводили 0,2 – 0,3 мл полученного раствора в зависимости от массы с помощью полиуретанового катетера (ОАО «Синтез», Россия) с внешним диаметром 2 мм, на глубину 8 см. В группах 3 и 4 каждые 12 ч в течение 7 суток применяли ректальные суппозитории массой 0,3 г, содержащие соответственно 0,075 мг куркумина и 50 мг 5-АСК. На 3, 5 и 7 сутки экспериментального колита в группах 2, 3 и 4 под наркозом пункцией сердца в области левого желудочка забирали кровь для иммунологических исследований, выделяли толстый кишечник для проведения морфологических, иммуногистохимических и биохимических исследований.

Индекс активности болезни (disease activity index, DAI) оценивали 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 (Hughes A.A., 1952).

Гематологические и иммунологические методы. На гематологическом анализаторе для ветеринарии «BC-2800 Vet» («Mindray», Китай) определяли количество в крови лейкоцитов. Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных азур II-эозином («Гемстандарт-Р», Россия). Чистую фракцию нейтрофилов и лимфоцитов из крови выделяли на градиенте плотности стерильных растворов фиколла («Pharmacia», Швеция) и верографина («Spofa», Чехия). Поглонительную способность нейтрофилов крови исследовали с частицами монодисперсного полистирольного латекса, учитывали активность (% клеток), интенсивность фагоцитоза (у.е.) и фагоцитарное число (у.е.). Кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови исследовали в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте с расчетом активности (% клеток), интенсивности (у.е.) и функционального резерва клеток (Маянский М.Е. и др., 1979). На проточном цитофлуориметре «Navios» («BeckmanCoulter», США) с использованием специфичных для крыс моноклональных антител («BeckmanCoulter», США) определяли количество лимфоцитов ($\cdot 10^9/\text{л}$) с фенотипом CD3^+ и CD45RA^+ ; с помощью тест-системы «Annexin-5-FITC/7-AAD kit» («eBioscience», США) дифференцировали интактные лимфоциты (Annexin-5-FITC–/7-AAD–), лимфоциты с ранними признаками апоптоза (Annexin-5-FITC+/7-AAD–), поздними признаками апоптоза и частично некротические (Annexin-5-FITC+/7-AAD+). На иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с помощью специфичных для крыс тест-систем фирмы «Cloud-Clone Corp.» (Китай) определяли концентрацию в сыворотке IL-23 (пг/мл), а также концентрацию IgG и IgM (нг/мл).

Биохимические методы. Гомогенат слизистой оболочки толстого кишечника 10% готовили из проксимальной части ободочной кишки в стеклянном механическом гомогенизаторе при температуре не выше 4°C. Содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате определяли экстракционно-спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО – Спектр», Санкт – Петербург) по методике Волчегорского И.А. и соавт. (Волчегорский И.А. и др., 2000; Львовская Е.И. и др., 1991). В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта измеряли оптическую плотность при длинах волн равных 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 кетон-динитрофенилгидразонов (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). Резервно-адаптационный потенциал (РАП, %) рассчитывали путем отношения продуктов спонтанного окисления к индуцированному.

Морфологические и иммуногистохимические методы. Данный фрагмент работы выполнен при участии руководителя отдела поисковых исследований ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» Минздрава Челябинской области к.м.н. Астаховой Л.В., 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 мм² количество нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов, гистиоцитов, плазматических клеток, фибробластов, диаметр язвенного дефекта (мкм) при увеличении x400 и x100 в 10-ти случайно отобранных полях зрения. Морфометрические исследования проводили с помощью программы «ImageScore M» (Россия). Для интегральной оценки повреждения толстого кишечника использовали индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI) (Yao J. et al., 2017). Иммуногистохимическим методом оценивали содержание МПО и TNF-α в клеточных популяциях ткани толстого кишечника с использованием наборов специфических первичных антител – кроличьи антитела к МПО крысы (host – rabbit, каталожный номер PAA601Ra01 «Cloud-Clone Corp.», Китай) и мышинные антитела к TNF-α крысы (host – mouse, каталожный номер MAA133Ra21 «Cloud-Clone Corp.», Китай), а также с использованием полимерной системы детекции «Ultra VIEW Universal DAB» (Ventana, USA) для обнаружения в срезах тканей, связанных с антигеном иммуноглобулинов кролика и мыши. Специфичное первичное антитело локализовано универсальной полимерной системой вторичного антитела. Полимер конъюгирован с пероксидазой хрена и фрагментами козьего антикроличьего и антимишиного антитела. В качестве субстрата/хромогена для визуализации полимерного комплекса использовался диаминобензидин, результат выражали в ед./мм².

Фармацевтические методы. Экстракт корневищ куркумы длиной 10% спиртовой получали дробной мацерацией из сухого сырья (*Curcuma longa* L., «Diamart», Индия) с использованием спирта этилового 80%, стандартизированного по показателям, приведенным в ОФС.1.4.1.0021.15 «Экстракты»: описание, спирт этиловый в соответствии с ОФС.1.2.1.0016.15, тяжелые металлы в соответствии с ОФС.1.2.2.2.0012.1, сухой остаток в соответствии с ОФС.1.4.2.0021.1, микробиологическая чистота в соответствии с ОФС.1.4.2.0002.18, категорией 4Б: общее количество аэробных микроорганизмов – не более 10⁵ КОЕ в 1 г; общее количество дрожжевых и плесневых грибов – не более 10⁴ КОЕ в 1 г; энтеробактерий, устойчивых к желчи, - не более 10³ КОЕ в 1 г; отсутствие *Escherichia coli* в 1 г; отсутствие бактерий рода *Salmonella* в 25 г. Ректальные суппозитории изготавливали на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) 1500, ПЭГ 6000, эмульгатора Т-2, колифора и кремофора RH-40. В качестве действующего вещества вводили 0,3 мл спиртового экстракта корневищ куркумы длиной на 1 единицу лекарственной формы. Идентификацию содержания куркуминоидов в суппозиториях проводили методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1), количественную оценку осуществляли спектрофотометрически по реакции с борно – щавелевым реактивом. Стандартизацию суппозиториев проводили в соответствии с показателями, приведенными в

ОФС.1.4.1.0013.15 «Суппозитории»: описание, однородность дозирования – в соответствии с ОФС.1.4.2.0008.15, растворение – в соответствии с ОФС.1.4.2.0014.15, распадаемость – в соответствии с ОФС.1.4.2.0012.15, определение микробиологической чистоты – в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.18, категорией 3: общее количество аэробных микроорганизмов – не более 10^3 КОЕ в 1 г; общее количество дрожжевых и плесневых грибов – не более 10^2 КОЕ в 1 г. Оценку антиоксидантной активности куркумина в суппозиториях проводили по реакции с молибдатом аммония. Высвобождение куркумина из суппозитория оценивали в тесте «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (ОФС. 1.4.2.0014.15). Ректальные суппозитории, содержащие 50 мг 5-АСК, готовили на основе суппозитория ректальных «Салофальк» (МНН: Месалазин, «Doctor Falk Pharma GmbH», Германия).

Статистические методы. Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19. Показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей [Q_{25} - Q_{75}]. Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Крускала-Уолиса, 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

Иммунные параметры, свободно-радикальное окисление и морфология очага повреждения при экспериментальном колите

Интегральная оценка клинических признаков по шкале DAI на 3, 5 и 7 сутки экспериментального колита выявила увеличение частоты дефекаций, снижение плотности и появление крови в каловых массах, снижение массы тела крыс (рисунок 1). Морфометрическая оценка очага повреждения в толстом кишечнике выявила наличие язвенных дефектов, отека, густой нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации с примесью эозинофилов, плазмочитов, гистиоцитов, формирование грануляционной ткани, а также др. признаков, интегрированных в индекс повреждения ткани толстого кишечника (TDI) (рисунок 2).

При экспериментальном колите на 3, 5 и 7 сутки наблюдения в крови увеличивалось количество лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, поглотительная способность и кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови (таблица 1). Повышалась концентрация в сыворотке IL-23 – провоспалительного цитокина, одного из ключевых маркеров в патогенезе повреждения стенки кишечника при за счет активации нейтрофилов, лимфоидных клеток врожденного иммунитета, Th1- и Th17-зависимых реакций (Verstockt B. et al., 2018; Ma C. et al., 2019; Neurath M.F., 2019). На 3, 5 и 7 сутки в стенке толстого кишечника значимо повышалось содержание миелопероксидазы (МПО) и TNF- α – ключевых маркеров ВЗК, определяющих вероятность и длительность ремиссии, применяемых для оценки эффективности проводимой терапии (Zhao M. et al., 2015; Rodrigues de Carvalho L. et al., 2018).

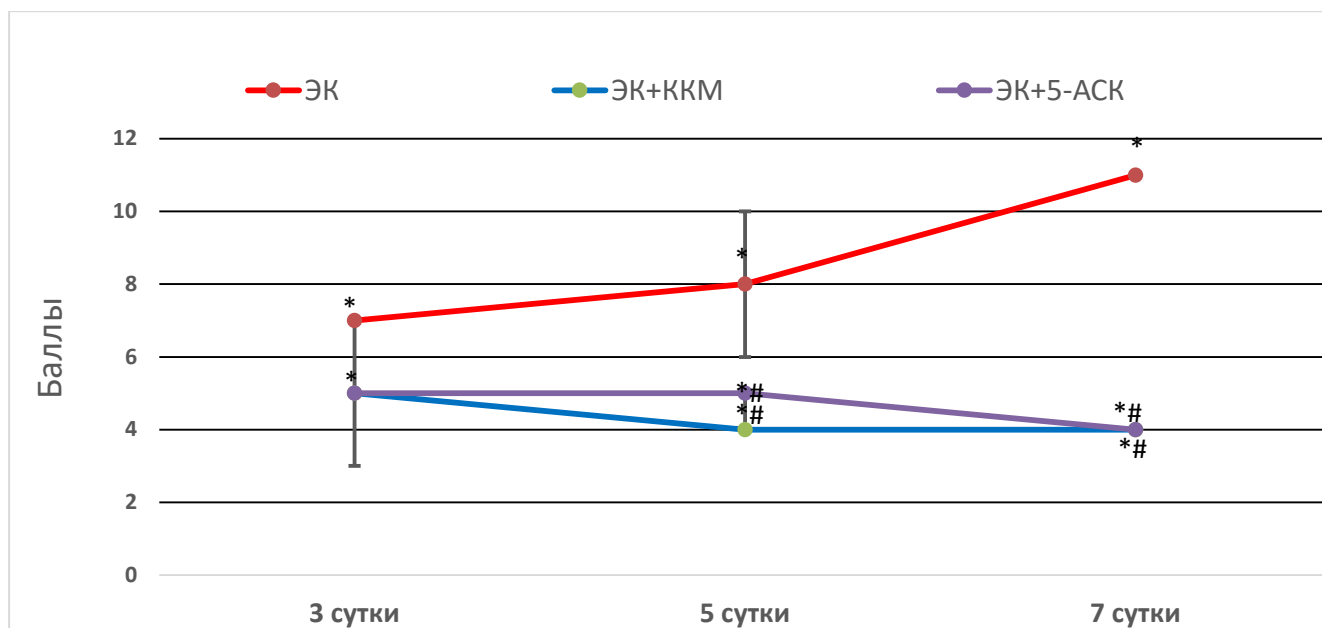


Рисунок 1 - Параметры индекса активности болезни (DAI) при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и 5-АСК. Отображены медиана и интерквартильный размах (Q₂₅; Q₇₅)

Примечание: Эк – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота; значимые ($p < 0,05$) различия с группами: * – Эк; # – Эк + ККМ.

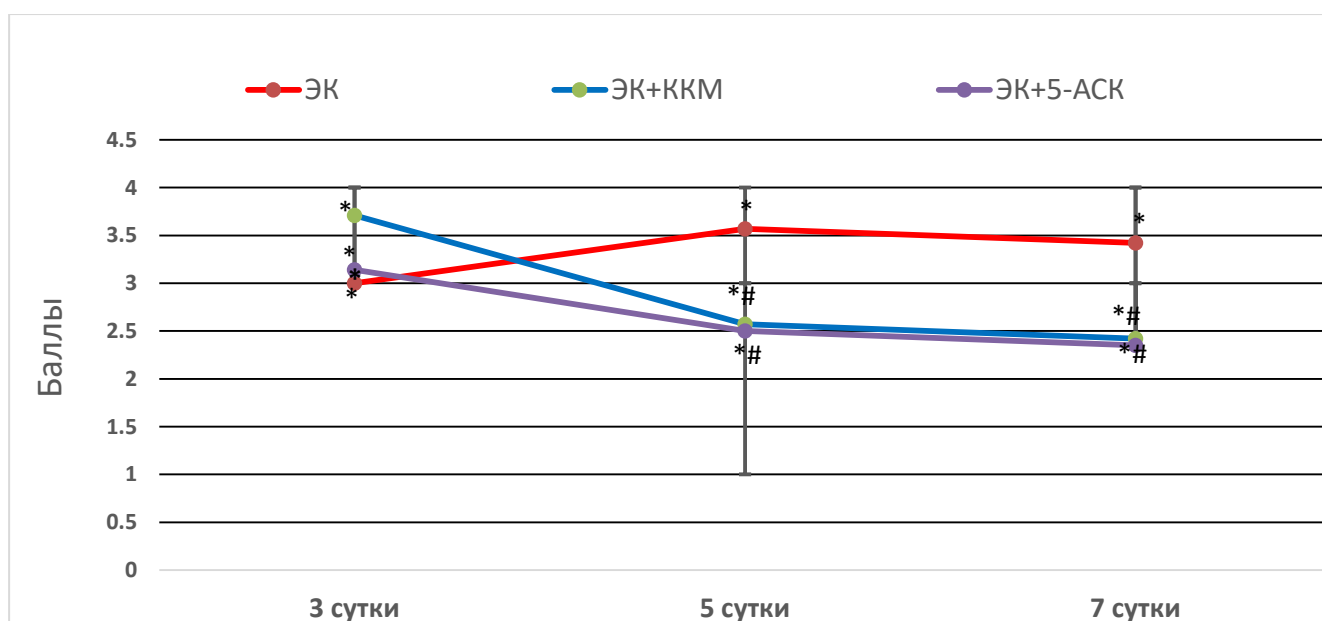


Рисунок 2 - Параметры индекса повреждения ткани (TDI) при экспериментальном колите в условиях применения оригинальных ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы и 5-АСК. Отображены медиана и интерквартильный размах (Q₂₅; Q₇₅)

Примечание: Эк – экспериментальный колит, ККМ – куркума, 5-АСК – 5-аминосалициловая кислота; значимые ($p < 0,05$) различия с группами: * – Эк; # – Эк + ККМ.

Таблица 1 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на некоторые иммунологические параметры при ЭК (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
ИФ, у.е.	0,68 (0,6-0,8)	3,85 (3,63-3,85)*	6,99 (6,37-12,16)*	5,78 (3,65-10,80)*	2,83 (1,92-3,16)* #	6,50 (6,37-12,16) * #	4,89 (3,64-5,97) * #	1,68 (1,46-6,60)*#&	8,18 (5,92-8,92) *	5,94 (3,53-7,34) *
НСТ-тест спонт., инт-ть, у.е.	0,06 (0,05-0,07)	0,17 (0,15-0,17)*	0,19 (0,19-0,20)*	0,09 (0,02-0,12)	0,13 (0,13-0,17)*	0,10 (0,06-0,14) * #	0,05 (0,05-0,09)	0,09 (0,09-0,12)*#&	0,11 (0,11-0,11) * #	0,05 (0,05-0,08) #
IL-23, пг/мл	32,16 (28,95-43,42)	75,52 (65,94-85,24)*	71,57 (59,51-73,18)*	86,04 (78,81-91,67)*	40,21 (11,26-45,84)* #	32,16 (22,52-48,25) * #	35,62 (25,66-44,81) * #	34,58 (25,73-44,23)# &	31,01 (22,16-43,88)* #	35,84 (23,32-49,05)* #
МПО, ед./мм ²	19,15 (19,00-19,15)	1235,63 (670,49-1590,03)*	1187,73 (814,17-1561,31) *	766,28 (670,49-881,22) *	1070,88 (141,76-1616,85) *	220,31 (134,09-306,51) * #	254,41 (187,35-378,92) * #	1187,73 (814,17-1561,31) *	291,95 (136,39-387,73) * #	220,31 (172,41-287,35) * #
Ig G, нгм/л	3,05 (3,02-3,22)	17,11 (17,11-21,17)*	26,93 (23,66-8,07)*	11,22 (5,15-18,46)*	7,27 (2,84-7,88)*#	9,96 (6,94-21,27)*#	5,26 (3,37-8,41)* #	6,66 (6,14-6,92)* #	9,19 (8,23-9,54)* #	6,31 (5,61-7,27)*#

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

Таблица 2 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиторий на некоторые параметры содержания перекисного окисления липидов в изопропанольной фазе и параметры спонтанной окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при ЭК (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интактные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
КДиСТ (и), е.и.о.	0,31 (0,29-0,32)	0,61 (0,61-0,71)*	0,41 (0,38-0,41)*	0,51 (0,51-0,55)*	0,64 (0,56-0,71)*	0,34 (0,30-0,39)*	0,41 (0,41-0,44)*#	0,54 (0,49-0,69)*#	0,36 (0,34-0,40)*	0,36 (0,33-0,39)*#
ШО (и), е.и.о.	0,01 (0,01-0,02)	0,08 (0,08-0,11)*	0,01 (0,00-0,01)	0,14 (0,12-0,14)*	0,08 (0,06-0,09)*	0,01 (0,01-0,01)	0,09 (0,08-0,11)*#	0,06 (0,00-0,15)*	0,00 (0,00-0,01)	0,07 (0,06-0,07)*#
S OMB спонт., у.е./мг белка	141,86 (136,04-166,74)	324,21 (313,48-340,93)*	185,88 (170,67-242,59)*	392,31 (272,17-497,71)*	128,31 (122,75-167,69) #	177,97 (92,96-183,28) *	225,42 (219,84-257,96) * #	140,64 (116,31-163,92) #	110,94 (90,27-170,41) * #	221,84 (221,84-239,01) * #

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

Количество в крови $CD3^+$ лимфоцитов статистически значимо увеличивалось на 5 и 7 сутки эксперимента, $CD45RA^+$ - на 7 сутки эксперимента, несмотря на увеличение содержания в крови лимфоцитов с ранними признаками апоптоза, с поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток, что свидетельствовало о превалировании лимфопоэз-стимулирующих сигналов над факторами активации гибели лимфоцитов. В лимфоцитах, выделенных из крови больных с ВЗК, снижена экспрессия антиапоптогенного фактора Bcl-2, они более восприимчивыми к внешним проапоптогенным сигналам, таким как TNF- α (Zhou M. et al., 2015). Подтверждением роли Th2-зависимых реакций в патогенезе ВЗК являлось повышение концентрации в сыворотке иммуноглобулинов IgM и IgG на 3, 5 и 7 сутки эксперимента.

Роль свободнорадикального окисления (СРО) в повреждении тканей кишечника при ЭК зафиксирована нами при оценке содержания продуктов ПОЛ и ОМБ в гомогенате слизистой оболочки очага повреждения толстого кишечника. На 3, 5 и 7 сутки эксперимента отмечено накопление продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе (таблица 2) и в гептановой фазе (таблица 3) липидного экстракта с преимущественным накоплением продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе. На 3, 5 и 7 сутки эксперимента в очаге повреждения толстой кишки увеличивалось суммарное количество карбонильных производных белков – необратимых продуктов окислительного стресса преимущественно за счет накопления КДНФГ – вторичных, поздних продуктов ОМБ, по большей части, основного характера, что наиболее ярко проявилось на 5 и 7 сутки наблюдения. Оценка содержания продуктов ОМБ в гомогенате слизистой оболочки очага повреждения толстого кишечника в металл-индуцированном режиме позволила установить изменение резервно-адаптационного потенциала: его повышение на 3 сутки эксперимента и снижение на 5 сутки (таблица 3).

При проведении корреляционного анализа между DAI, TDI и иммунологическими параметрами в крови, СРО в очаге повреждения толстого кишечника наибольшее количество связей выявлено на 5 сутки (рисунок 3А) и 7 сутки эксперимента (рисунок 3Б). Во все сроки наблюдения корреляция наблюдалась между DAI и интенсивностью фагоцитоза, концентрацией в сыворотке IL-23 (в том числе, сильная связь на 5 сутки), IgG, содержанием в очаге повреждения МПО (в том числе, сильная связь на 5 сутки), продуктов ОМБ в сумме (в том числе, сильная связь на 5 сутки), а также КДНФГ в спонтанном и индуцированном режимах. Во все сроки наблюдения корреляция наблюдалась между TDI и количеством в крови нейтрофилов, интенсивностью спонтанного НСТ-теста, концентрацией в сыворотке IL-23, содержанием в очаге повреждения МПО (в том числе, сильная связь на 7 сутки), первичных, вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, продуктов ОМБ в сумме в спонтанном (в том числе, сильная связь на 5 сутки), индуцированном режимах, КДНФГ в индуцированном режиме. Таким образом, при экспериментальном колите ключевые иммунологические параметры в крови и в очаге повреждения толстого кишечника, параметры СРО в очаге повреждения толстого кишечника нарастают по мере увеличения индекса активности болезни: DAI, увеличения индекса повреждения ткани: TDI.

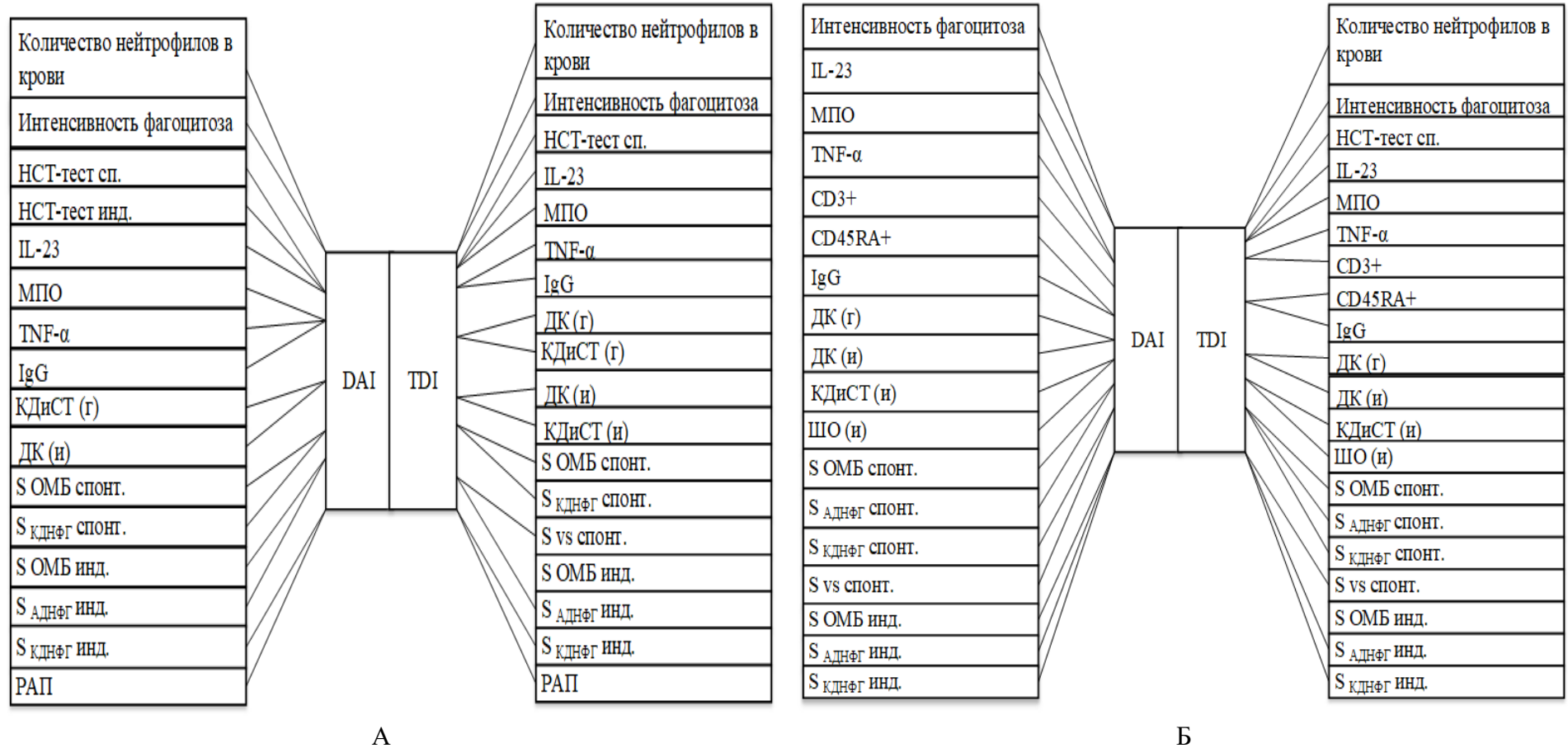


Рисунок 3 - Корреляция между параметрами индекса активности болезни (DAI), индекса повреждения тканей (TDI) и иммунологическими параметрами в крови, СРО в очаге повреждения толстого кишечника. А - на 5 сутки экспериментальном колите, Б – на 7 сутки экспериментальном колите.

Примечание: МПО – миелопероксидаза, ДК – диеновые конъюгаты, КДиСТ – кетодиены и сопряженные триены, ШО – основания Шиффа, ОМБ – окислительная модификация белка, АДНФГ – альдегид-динитрофенилгидразоны, КДНФГ – кетон-динитрофенилгидразоны, РАП – резервно-адаптационный потенциал; ——— положительная, статистически значимая связь между параметрами.

Обоснование состава и стандартизация ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы

Выбор оптимальной основы, обеспечивающей максимальное высвобождение действующих веществ, базировался на исследовании кинетики высвобождения куркумина из суппозиториев в тесте «Растворение». Установлено высвобождение экстракта корневищ куркумы длинной (*Curcuma longa* L.) спиртового преимущественно из гидрофильных основ, в то время как липофильные основы высвобождали действующие вещества за 45 минут не более, чем на 60%. Поэтому дальнейшие исследования проводили с гидрофильными составами на основе ПЭГов с разной молекулярной массой, в состав которых входили различные по своей природе вспомогательные вещества. В модельные смеси вводили 0,3 мл исследуемого экстракта корневищ куркумы длинной спиртового в пересчете на 1 суппозиторий, так как в предварительных испытаниях в условиях *in vitro* доказан максимальный антиоксидантный эффект данной дозировки. Поскольку речь идет о создании принципиально новых лекарственных препаратов, то необходимо проводить и биофармацевтические исследования, поскольку не всегда при соответствии лекарственной формы всем фармацевтико – технологическим параметрам наблюдается максимальное высвобождение действующего вещества. В качестве среды растворения использовали буферный раствор с pH = 6,8. Время отбора проб – каждые 15 минут.

Проведенные исследования позволили нам определить состав суппозиториев: экстракт корневищ куркумы длинной – 0,3 мл; ПЭГ 1500 – 0,3 г; ПЭГ 6000 – 0,7 г; эмульгатор Т-2 – 0,1 г; кремофор RH-40 – 1,25 г; колифор Р 188 – 0,75 г. Полученная лекарственная форма была стандартизирована по показателям, представленным в ОФС.1.4.1.0013.15 «Суппозитории». Для идентификации куркумина в лекарственной форме использовали тонкослойную хроматографию в системе растворителей хлороформ – спирт этиловый 96% (19:1). Для количественного определения куркумина в суппозиториях использовали метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра по методике образования комплекса розоцианина с борно – щавелевым реактивом.

Патогенетическое обоснование применения экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториев при экспериментальном колите

Применение при ЭК ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы приводило к снижению выраженности клинических симптомов на 3, 5 и 7 сутки, статистически значимому уменьшению DAI на 5 и 7 сутки наблюдения. Морфологическим отражением применения экстракта куркумы являлось в очаге повреждения уменьшение инфильтрации нейтрофилами на 3, 5 и 7 сутки, эозинофилами на 3 сутки, лимфоцитами на 5 сутки, гистиоцитами – на 7 сутки, плазмоцитами – на 5 и 7 сутки, увеличение плазмоцитов, гистиоцитов и фибробластов на 3 сутки, снижение размера язвенного дефекта на 3, 5 и 7 сутки, уменьшение индекса TDI на 5 и 7 сутки (таблица 4). Полагаем, что увеличение количества на 3 сутки гистиоцитов и фибробластов отражало активацию репаративных процессов после первичной и вторичной альтерации.

Таблица 3 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на некоторые параметры содержания перекисного окисления липидов в гептановой фазе и параметры металл-зависимой окислительной модификации белков в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника при ЭК (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интakтные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
ДК (г), е.и.о.	0,63 (0,55-0,65)	0,79 (0,79-0,81)*	0,66 (0,66-0,68)	0,75 (0,74-0,81)*	0,79 (0,77-0,82)*	0,61 (0,61-0,64)	0,72 (0,71-0,73)* #	0,73 (0,72-0,85)* #	0,63 (0,61-0,63)	0,74 (0,68-0,77)*
S АДНФГ, у.е./мг белка	228,91 (227,81- 228,91)	340,36 (336,48-380,61)*	360,77 (346,74- 397,13)*	533,57 (525,35- 585,49)*	196,41 (194,57- 265,09)* #	305,25 (208,28- 349,56)* #	421,11 (412,54- 452,17)* #	337,85 (204,91- 411,59)*&	265,31 (221,96- 320,31)* #	385,24 (352,64- 448,85)* #
S vs, у.е./мг белка	29,29 (29,29- 29,98)	36,19 (30,83-36,71)*	60,35 (55,01-79,34)*	87,26 (52,72-101,14) *	26,13 (25,02-29,81)#	60,97 (54,99-99,59)*	76,38 (73,72-82,25) * #	53,97 (50,34-87,36) * # &	68,76 (48,13-88,99) * #	94,26 (74,36- 113,21) *
РАП, %	54,71 (51,53- 56,71)	80,25 (74,89-87,87) *	45,39 (42,73-51,97)*	57,15 (50,11-59,71)	56,25 (53,87-58,87)#	51,98 (49,89-53,59)#	45,09 (45,33-46,73) * #	35,17 (32,32-57,53)#	55,56 (25,36-50,34)#	45,27 (39,44- 51,94)* #

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

Таблица 4 – Влияние экстракта куркумы и 5-АСК в составе ректальных суппозиториях на некоторые морфометрические параметры толстого кишечника при экспериментальном колите (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Параметры	Группа 1 Интakтные (n=7)	Группа 2 ЭК 3 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 5 сутки (n=7)	Группа 2 ЭК 7 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 3 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 5 сутки (n=7)	Группа 3 ЭК+ККМ 7 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 3 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 5 сутки (n=7)	Группа 4 ЭК+5-АСК 7 сутки (n=7)
ГЦ, ед./мм ²	13,43 (13,40-13,64)	115,20 (103,47- 131,25)*	1048,07 (880,51- 1242,23)*	1461,63 (748,13- 1867,99)*	1489,36 (1364,93- 1565,65)* #	863,39 (689,65- 992,90)*	853,65 (790,37- 1198,51)* #	172,34 (124,91- 260,74)* # &	480,34 (369,61- 827,25)* # &	790,37 (524,11- 1198,51)* #
ФБ, ед./мм ²	20,06 (13,55-26,80)	337,37 (258,39- 481,34)*	1369,03 (890,58- 1706,03)*	1259,44 (991,32- 2864,25)*	2730,15 (2172,41- 3400,67)* #	977,66 (772,78- 1139,68)*	1747,96 (1351,35- 1821,31)*	357,44 (284,19- 386,13)*&	1362,53 (1037,59- 2075,47)*	1456,31 (1351,35- 1821,31)*
Язвенный дефект, мкм	0	615,00 (288,00- 680,50)*	936,00 (815,50- 991,50)*	453,00 (349,00- 702,50)*	228,50 (172,00- 302,00)* #	240,00 (161,00- 678,00)* #	244,00 (198,00- 364,00)* #	420,00 (262,00- 634,00)* &	199,00 (149,00- 628,00)* #	294,00 (164,00- 397,00)* #

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

Применение суппозиторий с экстрактом куркумы при ЭК приводило в крови к уменьшению до уровня интактных животных общего количества лейкоцитов на 3, 5 и 7 сутки, количества лимфоцитов – на 5 и 7 сутки, моноцитов – на 3 сутки, количества сегментоядерных нейтрофилов на 3 и 5 сутки. Снижалось, частично восстанавливалось поглотительная активность нейтрофилов на 3, 5 и 7 сутки, снижалась НСТ-редуцирующая активность в спонтанном режиме на 5 и 7 сутки, в индуцированном – на 3 и 5 сутки. Изменения врожденного и адаптивного иммунитета при ЭК в условиях применения экстракта куркумы, в том числе, обусловлены снижением концентрации в сыворотке IL-23 на 3, 5 и 7 сутки эксперимента, снижением и частичным восстановлением содержания в очаге повреждения TNF- α и МПО на 5 и 7 сутки. В условиях применения экстракта куркумы при ЭК снижалось и полностью восстанавливалось количество в крови CD3⁺ лимфоцитов. Парадоксально увеличивалось количество лимфоцитов в крови с признаками апоптоза и некроза, что может отражать феномен негативной селекции лимфоцитов в кровотоке. Применение экстракта куркумы приводило к снижению и полному восстановлению концентрации в сыворотке IgM, снижению и частичному восстановлению концентрации в сыворотке IgG. При оценке содержания продуктов ПОЛ и ОМБ в гомогенате слизистой оболочки толстого кишечника выявлено в гептановой фазе липидного экстракта снижение содержания первичных продуктов ПОЛ на 7 сутки (таблица 3), в изопропанольной фазе - первичных продуктов на 3 и 5 сутки, вторичных и конечных продуктов на 7 сутки (таблица 2). На 3 и 7 сутки ЭК снижалось и частично восстанавливалось общее содержание, содержание первичных и вторичных, а также основного и нейтрального характера карбонильных производных белков, на 5 сутки снижался и полностью восстанавливался только уровень вторичных карбонильных производных белков, в том числе основного и нейтрального характера. Резервно-адаптационный потенциал, оцениваемый по продуктам ОМБ, снижался и полностью восстанавливался на 3 сутки, увеличивался и полностью восстанавливался на 5 сутки. Можно выделить несколько механизмов протекторного действия экстракта куркумы при ЭК. Наиболее изученным является локальный антиоксидантный эффект. Благодаря своей химической структуре (фенольные О-Н и С-Н группы), куркумин выступает в роли сквенджера свободных радикалов и антиокислительного агента, а также ингибирует избыточную активность iNOS, поглощает NO (Boozari M. et al., 2019). Куркумин снижает содержание МПО в тканях при воспалении за счет уменьшения избыточной инфильтрации нейтрофилами (Mouzaoui S. et al., 2012). Зафиксирована способность куркумина повышать активность супероксиддисмутазы, гемоксигеназы HO-1 и др. факторов АОЗ (Song W.B. et al., 2010). Прямой иммунотропный эффект куркумина обусловлен регуляцией сигнальных путей: продукции провоспалительных цитокинов, реактантов острой фазы, ЦОГ-2 и др. (Gupta S.C. et al., 2013). Куркумин ингибирует активацию TLR4, блокируя MyD88-зависимые механизмы, связываясь с миелоидным белком дифференцировки-2 – доменом TLR4, блокирует последующие звенья TLR4-зависимого пути, включая TRAF6 и IRAK1 (Peng L. et al., 2010), снижает активность NF- κ B (Pan M.H. et al., 2000). Наконец, куркумин блокирует передачу сигнала AP-1, ингибируя MAPK, ERK1/2, JNK и p38. Указанные механизмы ограничивают транскрипцию генов провоспалительных цитокинов (Shishodia S. et al., 2007). Прямое участие куркумина в регуляции функции и количества иммунокомпетентных клеток, реализуется, во-первых, за счет угнетения созревания ДК, повышения их толерогенного потенциала и угнетения презентации антигенов, что сопряжено с увеличением дифференцировки Treg, снижением активности Th1, Th17 (Kahkhaie K.R. et al., 2019). Во-вторых, угнетение куркумином пролиферации Th1, Th17 и повышение активности Th2

приводит к уменьшению продукции провоспалительных цитокинов (Bakır B. et al., 2016). В-третьих, куркумин угнетает чрезмерную миграционную способность, дегрануляцию нейтрофилов при воспалении, модулирует функцию В-лимфоцитов (Larmonier C.B. et al., 2011), снижает содержание нейтрофилами и макрофагами ММП (Desai S.J. et al., 2018). Механизмом протекторного действия куркумина может быть его антимикробный эффект и способность регулировать состав кишечной микробиоты в целом (Shen L. et al., 2017; Burge K. et al., 2019). Куркумин благоприятно влияет на жизнедеятельность бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты, обеспечивающих защиту энтероцитов (Peterson C.T. et al., 2018). Сам куркумин в кишечнике подвергается влиянию ферментов бактериального происхождения, образуя фармакологически более активные метаболиты (Tsuda T., 2018; Pluta R. et al., 2020).

Сравнительный анализ эффективности применения при экспериментальном колите экстракта куркумы и 5-аминосалициловой кислоты в составе ректальных суппозиториях

При экспериментальном колите индекс активности болезни (DAI) снижался на 5 и 7 сутки, как и в условиях применения экстракта куркумы, что свидетельствует о сопоставимости эффектов экстракта куркумы и 5-АСК в отношении клинических симптомов. При сравнительном исследовании морфологии очага повреждения при ЭК обнаружено, что на фоне применения ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы в отличие от 5-АСК наблюдались на 3, 5 и 7 сутки менее глубокие язвенные дефекты, менее выраженные признаки воспалительного процесса в виде лейкоцитарной инфильтрации, отека, раньше фиксировались признаки заживления язвенных дефектов, репарации поврежденных тканей кишечника, что нашло отражение в морфометрических параметрах очага повреждения: более ранним увеличением количества гистиоцитов, фибробластов, снижением количества эозинофилов, уменьшение размеров язвенных дефектов на 3 сутки. Параметр повреждения ткани кишечника, индекс TDI, значимо снижался на 3 и 5 сутки ЭК одинаково как в условиях применения экстракта куркумы, так и применения 5-АСК.

Применение 5-АСК в составе суппозиториях приводило к снижению количества в крови и полному восстановлению во все сроки наблюдения общего количества лейкоцитов, количества лимфоцитов, частичному восстановлению количества нейтрофилов на 5 сутки наблюдения, снижению и частичному восстановлению поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови. На фоне применения 5-АСК во все сроки наблюдения снижалась концентрация IL-23 в сыворотке и снижалось содержание TNF- α и МПО в очаге повреждения толстого кишечника. Сравнительный анализ установил, что эффект при ЭК экстракта куркумы сопоставим с эффектом 5-АСК в отношении общего количества лейкоцитов, количества лимфоцитов и нейтрофилов в крови, содержания TNF- α и МПО в кишечнике. Сравнительный анализ применения при ЭК экстракта куркумы и 5-АСК выявил, что по изменению количества в крови CD3⁺ и CD45RA⁺ лимфоцитов, лимфоцитов с ранними признаками, поздними признаками апоптоза и частично некротических клеток, концентрации в сыворотке IgM и IgG эффекты экстракта куркумы и 5-АСК полностью сопоставимы. Анализ параметров СРО в толстом кишечнике выявил, что уровень продуктов ПОЛ, продуктов ОМБ в спонтанном и металл-индуцированном режимах при экспериментальном колите в условиях применения суппозиториях с экстрактом куркумы и с 5-АСК статистически значимо не отличается.



Рисунок 4 - Некоторые аспекты патогенеза экспериментального колита механизма действия экстракта куркумы в составе оригинальных ректальных суппозиториях по результатам проведенного экспериментального исследования.

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

Результаты оценки клинических симптомов, морфологии очага повреждения, врожденного и адаптивного иммунитета, СРО в очаге повреждения при экспериментальном колите в условиях применения ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы представлены на интегральной схеме (рисунок 4). Полагаем, что индукция спиртовым раствором ТНБС первичной альтерации в толстом кишечнике приводит к активации факторов врожденного иммунитета, аккумуляции и стимуляции поглотительной функции, кислородзависимого метаболизма с активацией НАДФН-оксидазы, iNOS, содержания МПО и генерации АФК нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами/макрофагами. Вклад в активацию СРО в очаге могут вносить эндотелиоциты, эпителиоциты кишечника, истощение компонентов антиоксидантной защиты. Маркерами окислительного стресса в очаге повреждения выступают экстрагируемые из гептановой и изопропанольной фазы липидного экстракта продукты ПОЛ, продукты ОМБ в спонтанном и металл-индуцируемом режимах. Нами зафиксирована активация факторов адаптивного иммунитета, увеличение в крови количества $CD3^+$, $CD45RA^+$, концентрации IgM, IgG. В активации факторов иммунитета, СРО имеет значение дисрегуляция иммунного ответа: увеличение концентрации в сыворотке IL-23 и содержания в очаге повреждения TNF- α . Выявлена активация гибели лимфоцитов крови путем некроза и апоптоза, которая может быть инициирована окислительным стрессом, повреждением клеточных мембран, изменением в клетках электролитного гомеостаза, pH, действием проапоптогенных цитокинов. Указанные патогенетические факторы участвуют в расширении зоны альтерации в толстом кишечнике, эскалации деструктивных процессов, приводят к клиническим и морфологическим признакам ЭК, интегрированным в DAI и TDI.

Применение при ЭК экстракта куркумы направлено, во-первых, на коррекцию редокс-статуса в стенке толстого кишечника за счет прямого и опосредованного антиоксидантного эффекта. Во-вторых, прямой иммуотропный эффект куркумина за счет вмешательства во внутриклеточные сигнальные пути и функцию иммуокомпетентных клеток, изменение баланса про- и противовоспалительной, про- и антиапоптогенной активности в крови и стенке кишечника зафиксирован нами в виде уменьшения количества и функции нейтрофилов, $CD3^+$ лимфоцитов, снижения концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке, содержания TNF- α , МПО в кишечнике. Нельзя исключить цитопротекторный эффект куркумина в области вторичной альтерации очага повреждения толстого кишечника за счет модуляции состава кишечной микробиоты.

Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальном колите зафиксированы клинические и морфологические признаки заболевания, прогрессирующие от 3 к 7 суткам наблюдения, ассоциированные с изменениями иммунологических параметров: увеличением в крови количества CD3⁺, CD45RA⁺ лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, повышением поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов, увеличением концентрации в сыворотке IL-23, IgM, IgG, повышением содержания в очаге повреждения кишечника TNF- α и миелопероксидазы.

2. При экспериментальном колите в очаге повреждения толстого кишечника развивается окислительный стресс, о чем свидетельствует накопление на 3, 5 и 7 сутки наблюдения первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов преимущественно в изопропанольной фазе липидного экстракта и преимущественно вторичных продуктов окислительной модификации белков основного характера; клинические и морфологические признаки колита нарастают по мере увеличения содержания в кишечнике продуктов перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков.

3. При экспериментальном колите применение каждые 12 часов оригинальных ректальных суппозиториев с 0,075 мг экстракта куркумы приводит с максимальным эффектом на 5 и 7 сутки наблюдения к снижению выраженности клинических и морфологических признаков заболевания, включая размер язвенного дефекта, инфильтрацию нейтрофилами, лимфоцитами, эозинофилами, плазмоцитами, гистиоцитами, фибробластами.

4. Иммунотропные эффекты применения при экспериментальном колите ректальных суппозиториев с экстрактом куркумы реализуются в виде снижения в крови количества сегментоядерных нейтрофилов и CD3⁺ лимфоцитов, увеличения количества лимфоцитов с признаками апоптоза и некроза, снижения поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, снижения концентрации IL-23, IgM, IgG в сыворотке и содержания TNF- α , миелопероксидазы в очаге повреждения толстого кишечника.

5. Локальный антиоксидантный эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиториев при экспериментальном колите проявляется в уменьшении содержания в очаге повреждения толстого кишечника продуктов перекисного окисления липидов преимущественно в изопропанольной фазе и продуктов окислительной модификации белков с ограничением образования преимущественно вторичных карбонильных производных белков основного и нейтрального характера и частичным восстановлением резервно-адаптационного потенциала.

6. При экспериментальном колите эффекты применения ректальных суппозиториев с 0,075 мг экстракта куркумы на клинические признаки, параметры адаптивного иммунитета в крови, свободно-радикального окисления и содержание миелопероксидазы и TNF- α в очаге повреждения сопоставимы с эффектами от применения ректальных суппозиториев с 50 мг 5-аминосалициловой кислоты, менее выражены в отношении параметров врожденного иммунитета в крови и более выражены по ограничению деструктивных явлений и активации репарации в очаге повреждения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в научных изданиях, рецензированных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных реферативных базах данных Scopus, Web of Science, Pubmed:

1. Осиков, М.В. Антиоксидантный эффект экстракта куркумы в составе ректальных суппозиторий оригинального состава при экспериментальной болезни Крона // М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева**, О.И. Огнева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 3. – С. 314 – 319. (IF Scopus – 1.2)
2. Осиков, М.В. Влияние экстракта корневищ куркумы длинной в составе ректальных суппозиторий на показатели перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева** // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 175. – № 3. – С. 80 – 86. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.373, IF Scopus – 0.2)
3. Осиков, М.В. Динамика показателей перекисного окисления липидов в толстом кишечнике при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиторий с экстрактом корневищ куркумы длинной / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева**, О.И. Огнева // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64. – № 3. – С. 131 – 136. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.466, IF Scopus – 0.125)
4. Осиков, М.В. Иммуотропные эффекты куркумина в составе оригинальных ректальных суппозиторий при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева**, О.И. Огнева // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 483 – 496. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.740, IF Scopus – 0.4)
5. Осиков, М.В. Клинико-иммунологическая характеристика экспериментальной болезни Крона в условиях локального применения экстракта корневищ куркумы длинной / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева** // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2020. – Т. 17. – №1. – С. 61 – 71. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.146)
6. Осиков, М.В. Эффективность локального применения экстракта куркумы при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева** // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – Т. 178. – № 6. – С. 133 – 140. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.373, IF Scopus – 0.2)
7. Особенности свободнорадикального окисления в толстом кишечнике при язвенном колите и болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Давыдова, М.С. Бойко, **А.Е. Бакеева**, Н.В. Кайгородцева, И.Р. Галеева, А.А. Федосов, М.А. Ильиных, Л.В. Воргова // Вестник РГМУ. – 2020. – № 3. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027 (дата обращения: 09.05.2020). (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.499, IF Scopus – 0.2, IF Web of Science – 0.2)
8. Осиков, М.В. Иммуотропные эффекты экстракта *Curcuma longa* в составе ректальных суппозиторий при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева** // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=29207> (дата обращения: 23.06.2020). (ВАК, ИФ РИНЦ – 0,823)
9. Осиков, М.В. Сравнительный анализ влияния куркумина в составе ректальных суппозиторий на концентрацию IgG и IgM в сыворотке при экспериментальной болезни Крона / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева**, М.С. Бойко // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22). – № 3. – С. 1235 – 1238. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.671)
10. Экспериментальное моделирование и перспективные направления коррекции гомеостаза при воспалительных заболеваниях кишечника / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева**, М.С. Бойко, В.А. Бивалькевич // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 1-2. – С. 153 – 160. (ВАК, ИФ РИНЦ – 0.138)
11. Воспалительные заболевания кишечника: выбор оптимальной экспериментальной модели / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, Е.В. Листик, **А.Е. Бакеева**, В.А. Бивалькевич //

Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 3. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26524> (дата обращения: 21.06.2019). (БАК, ИФ РИНЦ – 0.823)

12. Осиков, М.В. Экспериментальное моделирование болезни Крона и язвенного колита / М.В. Осиков, Е.В. Симонян, **А.Е. Бакеева**, А.А. Костина // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 4. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25072> (дата обращения: 21.06.2019). (БАК, ИФ РИНЦ – 0.823)

Патент

13. Патент на изобретение № 2743427 РФ. Ректальные суппозитории, обладающие противовоспалительным, антиоксидантным, иммуностимулирующим действием, содержащие экстракт корневищ с корнями куркумы длинной / М.В. Осиков ; патентообладатель Ин-т ; заявл. 15.04.2021 ; опубл. 27.12.2021 // Бюл. 2012. № 36. 16 с.

Публикации в других изданиях:

14. Афлятунова А.А. **Бакеева А.Е.** Клинический статус и некоторые показатели врожденного иммунитета при экспериментальной болезни Крона в условиях применения ректальных суппозиториях с экстрактом куркумы длинной // XXVI Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 26 – 27 марта 2020). – Санкт-Петербург, 2020. – С. 34 – 36.
15. **Бакеева, А.Е.** Влияние спиртового экстракта куркумы длинной в составе ректальных суппозиториях на клинический статус и показатели перекисного окисления липидов при экспериментальной болезни Крона // Актуальные проблемы биомедицины – 2020 : сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 26-27 марта 2020). – Санкт-Петербург, 2020. – С. 36-37.
16. Афлятунова А.А., Бивалькевич В.А., **Бакеева А.Е.** Влияние новой лекарственной формы с экстрактом куркумы на количественный состав лейкоцитов и функциональную активность нейтрофилов крови при экспериментальной болезни Крона // XXV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием (Санкт-Петербург, 28 – 29 марта 2019). – Санкт-Петербург, 2019. – С. 25 – 26.
17. Бойко М.С., **Бакеева А.Е.**, Голощапова Ж.А. Экспериментальное моделирование язвенного колита и болезни Крона // XVI итоговая научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов (Челябинск, 26 апреля 2018). Челябинск, 2018. – С. 71

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5-АСК	5-аминосалициловая кислота
АДНФГ	альдегид-динитрофенилгидразоны
АФК	активные формы кислорода
ДК	диеновые конъюгаты
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
КД	кетодиены
КДНФГ	кетон-динитрофенилгидразоны
ММП	металлопротеиназы
МПО	миелопероксидаза
НАДФ	никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НСТТ	тест восстановления нитросинего тетразолия
ОФС	общая фармакопейная статья
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПЭГ	полиэтиленгликоль
СРО	свободнорадикальное окисление
CD	кластер дифференцировки

Бакеева Алина Евгеньевна

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

14.03.03 – Патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Екатеринбург – 2021