Уральский медицинский журнал. 2022. Т. 21, № 5. С. 33-40.
Ural medical journal. 2022; Vol. 21, No 5. P. 33-40.

Научная статья
УДК 612.014.464:616.348-002-092.9
DOI 10.52420/2071-5943-2022-21-5-33-40

ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ОКСАЗОЛОН-ИНДУЦИРОВАННОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ В УСЛОВИЯХ ОЗОНОТЕРАПИИ

Евгения Валерьевна Давыдова[1], Михаил Владимирович Осиков[2], Наталья Васильевна Кайгородцева[3]

[1–3] Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия
[2] Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия
[1] davidova-ev.med@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6392-8971.
[2] prof.osikov@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6487-9083
[3] nkaigorodceva@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-8403-8599

Аннотация
Введение. Воспалительные заболевания кишечника представляют серьезную медико-социальную проблему в связи с ростом заболеваемости и инвалидизации среди молодого, трудоспособного населения. **Цель исследования –** изучить влияние внутрибрюшинной и ректальной озонотерапии на морфологию и показатели морфометрии зоны повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите в динамике эксперимента. **Материалы и методы.** Исследование выполнено на 97 самцах крыс линии Wistar. Экспериментальный колит (ЭК) моделировали с помощью оксазолона (Sigma-Aldrich; США). Первый этап включал проведение накожной сенсибилизации за счет нанесения 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолона на межлопаточную область животного, второй этап представлял собой ректальное введение 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолона per rectum на глубину 7–8 см. Для анестезии был применен препарат Золетил-100 (МНН: тилетамина гидрохлорид) (VirbacSanteAnimale; Франция) в дозе 20 мг/кг. Морфометрию выполняли с использованием программы ImageScope M (Россия). Повреждение тканей толстой кишки оценивали с помощью индекса повреждения тканей (tissue damage index, TDI). В очаге повреждения толстой кишки на 1 мм2 определяли содержание нейтрофилов (НФ), лимфоцитов (ЛЦ), эозинофилов (ЭО), гистиоцитов (ГЦ), плазматических клеток (ПЦ), фибробластов (ФБ). Диаметр язвенного дефекта (в мкм) на микроскопе PrimoStar (CarlZeiss, Германия), с морфометрической установкой Pro150ES (Pixera Corporation, USA). **Результаты.** При ЭК на вторые, четвертые, шестые сутки повышается DAI, в очаге повреждения толстой кишки фиксируется язвенный дефект, увеличивается TDI, содержание НФ, ЛЦ, ЭФ, ПЦ, ГЦ, ФБ. Показано, что применение озона внутрибрюшинно позитивно отражается на показателях морфометрии тканей очага повреждения, на вторые сутки, а также в динамике на четвертые и шестые сутки отмечено значимое в сравнении с аналогичными показателями группы II ограничение площади язвенного дефекта с параллельным постепенным снижением показателя повреждения тканей (TDI). При ректальном варианте применения озона динамика изменения состава воспалительного инфильтрата характеризовалась также значимым повышением всех параметров на вторые, четвертые (за исключением ЭФ), шестые (за исключением НФ, ЭФ) сутки в сравнении с группой интактных животных. Размер язвенного дефекта и индекс повреждения тканей после ректального применения озона уже на вторые сутки оказался значимо меньших размеров, чем в группе с ЭК и группе применения озона внутрибрюшинно, однако не достигали значений интактной группы, т. е. полного восстановления не происходило. **Обсуждение.** В экспериментах на крысах продемонстрировано, что внутрибрюшинное введение озона в дозе 150 мг/кг уменьшает стрептозотоцин-индуцированные повреждения поджелудочной железы за счет увеличения количества в ткани железы глутатионтрансферазы, активации Nrf2-зависимых путей транскрипции, повышения уровня сывороточного инсулина и лептина. В клинических условиях показано гепатопротекторное действие О3, а также увеличение эффективности традиционных гепатопротекторов при комбинированном применении последних с О3. **Заключение.** Применение озонотерапии при оксазолон-индуцированном язвенном колите обнаружило положительное действие озона на морфологическую картину участка повреждения и динамику изменений клеточного состава воспалительного инфильтрата. Зафиксирован более выраженный позитивный эффект локального применения озона в виде ректальной озонотерапии на показатели морфометрии: нормализация на шестые сутки количества нейтрофилов, более выраженное сокращение площади язвенного дефекта, снижение индекса повреждения тканей.
Ключевые слова: экспериментальный колит, озон, воспалительные заболевания кишечника

Для цитирования: Давыдова Е.В., Осиков М.В., Кайгородцева Н.В. Изменения морфологических и иммуногистохимических показателей при оксазолон-индуцированноим язвенном колите в условиях озонотерапии. Уральский медицинский журнал. 2022;21(5): 33-40. http://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-33-40.

@ Давыдова Е.В., Осиков М.В., Кайгородцева Н.В.
@ Davydova E.V., Osikov M.V., Kaygorodtseva N.V.

Original Article

MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHANGES IN OXAZOLONE-INDUCED ULCERATIVE COLITIS UNDER OZONE THERAPY

Evgenija V. Davydova[1], Mihail V. Osikov[2], Natal'ja V. Kaygorodtseva[3]

[1–3] South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia
[2] Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia
[1] *davidova-ev.med@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6392-8971.*
[2] *prof.osikov@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-6487-9083*
[3] *nkaigorodceva@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0001-8403-8599*

Abstract
Introduction. Inflammatory bowel diseases are a serious medical and social problem due to the increase in morbidity and disability among the young, able—bodied population. **The aim of the study** was to investigate the effect of intraperitoneal and rectal ozone therapy on the morphology and morphometry parameters of the damage zone in oxazole-induced ulcerative colitis in the dynamics of the experiment. **Materials and Methods.** The study was performed on 97 male Wistar rats. Experimental colitis (EC) was modeled using oxazolone (Sigma-Aldrich; USA). The first stage included skin sensitization by applying 150 ml of a 3% alcohol solution of oxazolone to the interscapular area of the animal, the second stage was a rectal injection of 150 ml of a 3% alcohol solution of oxazolone per rectum to a depth of 7–8 cm. Zoletil-100 (INN: tiletamine hydrochloride) (VirbacSanteAnimale; France) was used for anesthesia at a dose of 20 mg/kg. Morphometry was performed using ImageScope M program (Russia). Colon tissue damage was assessed using tissue damage index (TDI). The content of neutrophils (NF), lymphocytes (LC), eosinophils (EO), histiocytes (HC), plasma cells (PC), fibroblasts (FB) per 1 mm2 was determined in the focus of colorectal damage. Ulcerous defect diameter (in μm) on a PrimoStar microscope (CarlZeiss, Germany), with a Pro150ES morphometric unit (Pixera Corporation, USA). **Results.** At EC on the second, fourth and sixth days DAI increases, in the lesion of the colon an ulcerous defect is fixed, TDI, the content of NF, LC, EF, PC, HC, FB increase. The intraperitoneal application of ozone was shown to have a positive effect on the tissue morphometry indices of the lesion focus; on the second day and in dynamics on the fourth and sixth day the significant limitation of the ulcerous defect area with the parallel gradual decrease of the tissue damage index (TDI) in comparison with the similar indices in group II was registered. In the rectal variant of ozone application the dynamics of changes in the inflammatory infiltrate composition was also characterized by the significant increase of all parameters on the second, fourth (except for EF), sixth (except for NF, EF) day in comparison with the group of intact animals. The size of the ulcerous defect and tissue damage index after rectal application of ozone on the second day was significantly smaller than in the group with EC and in the intraperitoneal ozone application group, but did not reach the values of the intact group, i.e. there was no complete recovery. **Discussion.** In experiments on rats it was demonstrated that intraperitoneal injection of ozone at a dose of 150 mg/kg reduces streptozotocin-induced pancreatic damage by increasing the amount of glutathione transferase in the gland tissue, activation of Nrf2-dependent transcriptional pathways, increase in serum insulin and leptin levels. Under clinical conditions the hepatoprotective effect of O3 was shown, as well as an increase in the effectiveness of traditional hepatoprotectors when the latter are combined with O3. **Conclusions.** Application of ozone therapy in oxazolone-induced ulcerative colitis revealed a positive effect of ozone on the morphological picture of the lesion area and the dynamics of changes in the cellular composition of the inflammatory infiltrate. A more pronounced positive effect of local application of ozone in the form of rectal ozone therapy on morphometry parameters was recorded: normalization on the sixth day of the neutrophil count, more pronounced reduction of the ulcerous defect area, reduction of the tissue damage index.
Keywords: experimental colitis, ozone, inflammatory bowel diseases

For citation: Davydova E.V., Osikov M.V., Kaygorodtseva N.V. Morphological and immunohistochemical changes in oxazolone-induced ulcerative colitis under ozone therapy. Ural medical journal. 2022;21(5):33-40. (In Russ.). http://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-33-40

ВВЕДЕНИЕ

Воспалительные заболевания кишечника представляют серьезную медико-социальную проблему в связи с ростом заболеваемости и инвалидизации среди молодого, трудоспособного населения [1, 2].

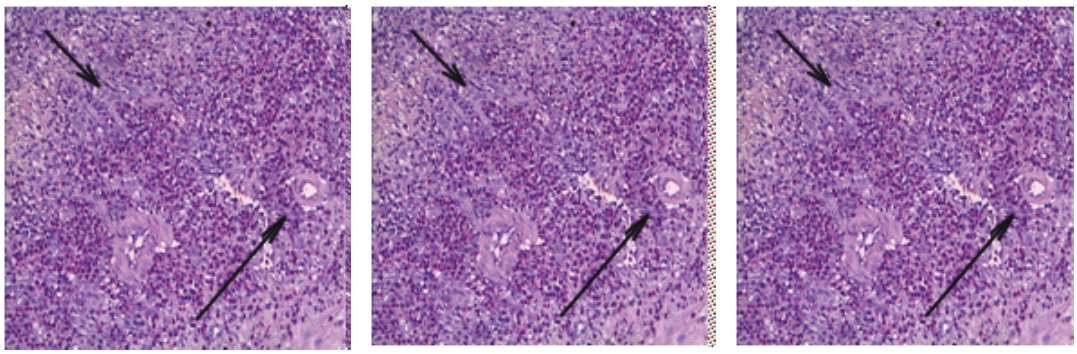
Широкий спектр этиологических факторов, приводящих к эскалации воспалительных изменений в стенке кишечника, изменению морфоархитектоники тканей, препятствует разработке этиотропной терапии. В патогенезе язвенного колита особую роль играет активация клеточных и гуморальных механизмов иммунного ответа, дисбаланс Th17/Treg [3, 4]. Неспецифичность клинических проявлений ВЗК нередко усложняет диагностику данной патологии. Верификация диагноза базируется на морфлологическом исследовании биоптата стенки кишки. Применение традиционной терапии ВЗК, включающей применение кортикостероидов, 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), моноклональных антител, имуносупрессантов, хирургических методов лечения нередко приводит

к развитию побочных эффектов, препятствующих продолжению терапии [5, 6]. Одним из современных методов лечения ВЗК является озонотерапия, имеющая высокий профиль безопасности за счет противовоспалительного, иммуномодулирующего, антибактериального, дезинфицирующего действия озона. Известно о хорошей переносимости озонотерапии, а также ее минимальных побочных эффектах [7, 8].

Цель работы – изучить влияние внутрибрюшинной и ректальной озонотерапии на морфологию и показатели морфометрии зоны повреждения при оксазолон-индуцированном язвенном колите в динамике эксперимента.

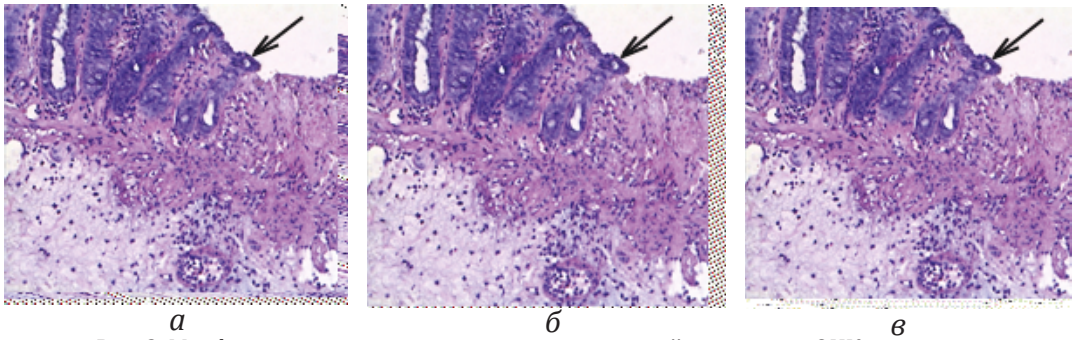
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнено на 97 половозрелых крысах-самцах чистой линии Wistar, массой 240 ± 20 г, находящихся на стандартном рационе в экспериментально-биологической клинике (виварии) ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию лабораторных животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией. Для проведения эксперимента крысы методом простой рандомизации были разделены на четыре группы: I группа (n = 10) – интактный контроль; II группа (n = 29) – животные с ОИК; III группа (n = 29) – животные с ОИК в условиях внутрибрюшинного введения озонокислородной смеси (ОКС) с концентрацией озона 2,5 мг/л, в дозе озона 0,05 мг/кг, курсовая доза 0,3 мг/кг, объем смеси рассчитывали на массу животного; IV группа (n = 29) – животные с ОИК в условиях ректального введения ОКС с концентрацией озона 2,5 мг/л, в дозе озона 0,1 мг/кг, курсовая доза 0,6 мг/кг. ОКС получали на озонотерапевтической автоматиче-



а *б* *в*

Рис. 1. Морфологические изменения в стенке толстой кишки при ОИК (окраска гематоксилин-эозином, ув. ×200): а – вторые сутки, поверхностный эпителий разрушен, поверхность покрыта фибрином с выраженной гранулоцитарно-лимфоцитарной инфильтрацией (стрелка); б – четвертые сутки, очаг некроза слизистой оболочки (стрелка), поверхностный эпителий разрушен, желез мало, бокаловидные клетки отсутствуют; в – шестые стуки, венозное и капиллярное полнокровие подслизистого слоя, плотная диффузная воспалительная клеточная инфильтрация, на фоне которой видны небольшие тяжи пролиферирующих фибробластов (стрелки)



а *б* *в*

Рис. 2. Морфологические изменения в стенке толстой кишки при ОИК в условиях внутрибрюшинного введения ОКС (окраска гематоксилин-эозином, ув. ×200): а – вторые сутки, густая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (стрелки) и очаговые диапедезные кровоизлияния (пунктирные стрелки) в подслизистом слое на границе с некротизированной слизистой оболочкой; б – четвертые сутки, в подслизистом слое на фоне венозного полнокровия (стрелка) видна плотная нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (пунктирная стрелка); в – шестые стуки, нейтрофильно-лимфоцитарный инфильтрат (стрелка) в подслизистом слое и небольшие тяжи пролиферирующих фибробластов (пунктирная стрелка)

ской установке с деструктором озона УОТА-60-01 Медозон (ООО «МЕДОЗОН», Москва).

Экспериментальное моделирование язвенного колита

Моделирование язвенного колита проводилось с помощью оксазолона (Sigma-Aldrich; США). Первый этап включал проведение накожной сенсибилизации за счет нанесения 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолона на межлопаточную область животного, второй этап представлял собой ректальное введение 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолона per rectum на глубину 7–8 см [9, 10]. Для анестезии был применен препарат Золетил-100 (МНН: тилетамина гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг.

Методы регистрации исходов эксперимента

Выведение животных из эксперимента проводили на вторые, четвертые и шестые сутки. Документирование наличия язвенного колита осуществляли с помощью морфологического исследования фрагментов тканей очага повреждения. Отобранные фрагменты тканей толстого кишечника интактных и ОИК животных помещали в маркированные гистологические кассеты и фиксировали 72 часа в 10%-м нейтральном формалине, с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Подсчет клеточных элементов проводили на 1 мм2. Учитывали количество нейтрофилов (НФ), лимфоцитов (ЛФ), эозинофилов (ЭО), гистиоцитов (ГЦ), плазматических клеток (ПЦ), фибробластов (ФБ) в 10 случайно отобранных полях зрения, диаметр язвенного дефекта (в мкм) на микроскопе PrimoStar (Carl Zeiss, Германия), с морфометрической установкой Pro150ES (Pixera Corporation, USA), диапазон увеличений: окуляр ×10, объектив ×20. Для анализа полученных изображений использовали программу QuPath. Повреждение тканей толстой кишки оценивали с помощью индекса повреждения тканей (tissue damage index, TDI): по шкале от 0 до 6 оценивали площадь повреждения, утолщение стенки кишки, сосудистый компонент, потерю клеточной специфичности (потерю бокаловидных клеток, интенсивность лейкоцитарной инфильтрации) [11].

Статистический анализ

Обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – показатели нижнего и верхнего квартилей соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (Манна – Уитни, Вальда Вольфовитца, Краскелла – Уоллиса). Статистические различия между группами с учетом поправки Бонферрони считали значимыми при $p \leq 0,02$.

Содержание животных и выполнение медицинских манипуляций осуществляли согласно требованиям нормативных документов и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных целях, и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

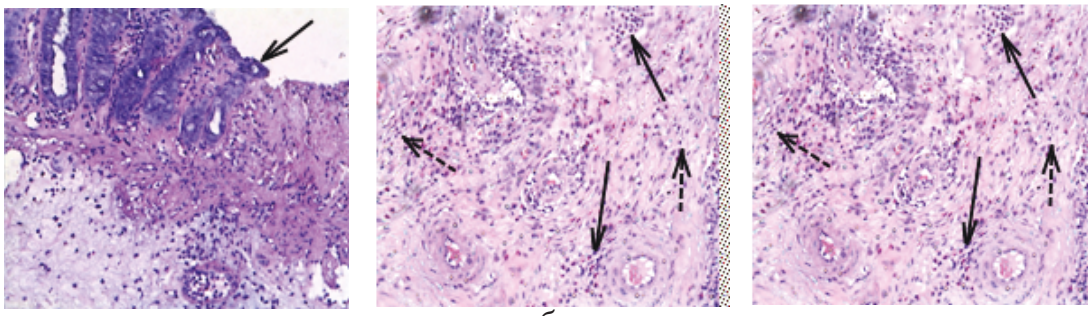
Морфологическое исследование фрагментов патологически измененных тканей толстого кишечника при оксазолон-индуцированном колите без лечения уже на вторые сутки показало наличие полных эрозий слизистой оболочки и язвенных дефектов, локализующихся в слизистом и подслизистом слоях, выраженную лимфогранулоцитарную инфильтрацию с лейкодиапедезом в эпителий желез и формированием крипт-абсцессов (рис. 1а). Четвертые сутки характеризовались наличием в подслизистом слое очагов некроза с выраженными кровоизлияниями, наложениями фибрина, паретично расширенными сосудами с утолщенной стенкой. Отмечалась тотальная полиморфноклеточная инфильтрация тканей с большим количеством эозинофилов и нейтрофилов, белковая дистрофия крипт (рис. 1б). На шестые сутки ОИК ниша язвенных дефектов покрыта бесструктурным некротизированным детритом, ткани отечны, полнокровны, отмечаются единичные участки фибробластогенеза (рис. 1в).

При внутрибрюшинном введении ОКС на вторые сутки наблюдалось изменение микроархитектоники поврежденных тканей: разрыхление стромы, частичное разрушение желез, полнокровие сосудов с утолщением стенки, диффузная лимфоцитарная инфильтрация (рис. 2а). Четвертые сутки характеризовались диффузной гранулоцитарно-лимфоцитарной инфильтрацией стромы, тесным расположением железистых крипт, снижением количества бокаловидных клеток, на дне язвенного дефекта отмечалось разрастание грануляционной ткани с фибрином на верхушке дефекта (рис. 2б). На шестые сутки определялись признаки эпителизации язвенного дефекта с наличием полей фибриллогенеза, пролиферации фибробластов в грануляционной ткани подслизистого слоя.

Динамика морфологических изменений очага повреждения в условиях ректального применения озонотерапии (рис. 3) следующая: на вторые сутки фиксировалось наличие рыхлой отечной стромы, полнокровное расширение сосудов, капилляростаз, лейкодиапедез подслизистого слоя, клеточная инфильтрация собственной пластинки слизистой, крупные толстостенные сосуды с выраженной гранулоцитарной инфильтрацией стенки; четвертые сутки характеризовались наличием фибринозного воспаления стенки кишки с пролиферацией сохранившихся камбиальных клеток кишечных желез и крипт; на шестые сутки имели место признаки заживления язвенного дефекта, поля пролиферации фибробластов, элементы фибриллогенеза, выраженная краевая эпителизация язвенного дефекта.

Морфометрические исследования показали значительные изменения клеточного состава в зоне повреждения толстого кишечника при окса-

золон-индуцированном колите на единице площади (табл. 1). Размеры язвенного дефекта и индекс повреждения тканей (TDI) в группе II увеличивались на вторые, четвертые и шестые сутки эксперимента. В динамике ЭК количество НФ, ЛЦ, ГЦ, ПЦ и ФБ значимо нарастало от вторых к шестым суткам в сравнении с группой интактных животных. В динамике число НФ на четвертые сутки не имело значимых различий с показателем на вторые сутки, значимо повышаясь к шестым суткам ($p < 0,02$). Количество ЛФ, значимо увеличиваясь на вторые, четвертые и шестые сутки в сравнении с показателем интактных животных, в динамике эксперимента не нарастало. Зафиксирован рост числа ГЦ и ФБ на вторые сутки эксперимента в сравнении с показателями I группы со значимым нарастанием на четвертые ($p < 0,02$) и шестые ($p < 0,02$) сутки в сравнении со вторыми сутками. Количество ПЦ плавно нарастало в динамике эксперимента от вторых к шестым суткам. Увеличение численности



а *б* *в*

Рис. 3. Морфологические изменения в стенке толстой кишки при ОИК в условиях ректального введения ОКС (окраска гематоксилин-эозином, ув. ×200): а – вторые сутки, начальные явления пролиферации столбчатого каемчатого эпителия слизистой оболочки (стрелка) в перифокальной зоне; б – четвертые сутки, в просвете венулы – отделение плазмы от форменных элементов, лейкостаз; в – шестые стуки, на фоне применения озона – очаги круглоклеточной инфильтрации (стрелки) и тяжи пролиферирующих фибробластов (пунктирные стрелки) в подслизистом слое

Таблица 1

Морфометрические показатели зоны повреждения толстой кишки при оксазолон-индуцированном колите в условиях применения озона (Me (Q1; Q3))

Показатели	Группа I	Группа II вторые сутки	Группа II четвертые сутки	Группа II шестые сутки	Группа III вторые сутки	Группа III четвертые сутки	Группа III шестые сутки	Группа IV вторые сутки	Группа IV четвертые сутки	Группа IV шестые сутки
Количество	10	9	10	10	9	10	10	9	10	10
НФ, ед/мм2	73,5 (56,2; 90,4)	402,6 (365,2; 452,3)*	415,4 (298,3; 541,3)*	570,5 (487,3; 624,3)*	249,7 (154,2; 289,3)*#	207,4 (123,2; 247,1)*#	169,6 (123,3; 214,3)*#	174,3 (122,3; 212,3)*#	151,5 (98,3; 212,3)*#§	96,6 (45,3; 111,0)#§
ЛЦ, ед/мм2	344,1 (302,2; 389,6)	569,4 (523,1; 688,3)*	684,3 (530,9; 865,3)*	736,9 (535,1; 986,3)*	737,3 (558,6; 888,8)*#	898,2 (656,3; 956,2)*#	533,5 (423,3; 543,7)*#	492,1 (294,2; 653,9)*#	449,8 (382,3; 598,3)*§#	376,4 (336,3; 395,2)*#§
ЭФ, ед/мм^2	56,7 (51,0; 58,9)	69,7 (54,2; 87,2)	196,4 (125,3; 253,2)*	72,7 (46,3; 98,6)*	73,4 (56,3; 89,6)*	47,1 (34,2; 56,3)	51,4 (35,2; 56,2)	88,7 (58,6; 98,6)*	59,1 (56,3; 65,3)	44,3 (32,3; 53,4)
ГЦ, ед/мм^2	183,8 (51,2; 197,3)	213,3 (198,5; 322,5)*	378,7 (330,5; 512,3)*	797,3 (740,7; 854,7)*	595,9 (263,1; 672,3)*#	1040,8 (956,5; 1272,7)*#	1466,8 (1271,2; 1634,6)*#	495,6 (347,8; 590,6)*#	762,7 (869,1; 952,3)*#§	1443,8 (1228,1; 1694,9)*#§
ПЦ, ед/мм2	45,9 (38,3; 53,7)	212,3 (80,6; 272,7)*	292,4 (176,9; 366,9)*	550,5 (370,4; 701,7)*	314,3 (175,6; 344,2)*	352,4 (340,4; 398,5)*	334,9 (323,5; 471,6)*#	226,4 (97,1; 297,1)*	239,3 (190,5; 277,7)*§	163,4 (105,2; 195,7)*#§
ФБ, ед/мм^2	28,1 (18,3; 25,3)	489,5 (288,6; 654,2)*	744,1 (521,7; 1025,6)*	1249,4 (991,7; 1491,3)*	716,3 (517,3; 689,6)*	780,2 (558,7; 667,7)*	889,5 (704,3; 966,7)*#	671,5 (388,3; 693,1)*#	663,4 (593,2; 740,7)*§	495,1 (255,2; 510,8)*#§
Размер язвы, мкм	0	482,3 (398,3; 524,1)*	569,3 (422,1; 586,3)*	768,3 (596,3; 852,1)*	324,2 (256,1; 375,6)*#	413,2 (224,3; 420,8)*#	231,2 (198,6; 242,1)*#	321,2 (241,3; 386,3)*#	254,3 (212,3; 176,3)*#§	165,3 (142,3; 188,9)*#§
TDI, у.е.	0	3,4 (3,0;3,8)*	3,7 (3,5;4,0)*	3,9 (3,5;4,0)*	3,5 (3,0;4,0)*	3,0 (2,0;3,0)*#	2,1 (1,0;2,0)*#	3,3 (2,0;3,6)*	2,5 (1,0;2,6)*#§	2,0 (1,0;2,2)*#§

Примечание: * – значимые различия ($p \le 0,02$) с группой I; # – с группой II; § – с группой III. НФ – нейтрофилы, ЛЦ – лимфоциты, ЭФ – эозинофилы, ГЦ – гистиоциты, ПЦ – плазматические клетки, ФБ – фибробласты.

ЭФ отмечено начиная с четвертых суток эксперимента ($p < 0,02$) со снижением показателя практически до уровня интактных животных на шестые сутки. Площадь язвенного дефекта в динамике оксазолон-индуцированного ЭК закономерно увеличивалась от вторых к шестым суткам параллельно с нарастанием показателя индекса повреждения тканей. Таким образом, максимальная выраженность изменений практически всех изучаемых показателей морфометрии, за исключением ЭФ, в группе животных с ЭЯК без лечения зафиксирована на шестые сутки, что является закономерным следствием оксазолоновой индукции тяжелого воспалительного процесса в тканях толстого кишечника.

Исследованиями показано, что применение внутрибрюшинной озонотерапии позитивно отражается на показателях морфометрии тканей очага повреждения. После однократного внутрибрюшинного введения ОКС на вторые сутки, а также в динамике на четвертые и шестые сутки отмечено значимое в сравнении с аналогичными показателями группы II, ограничение площади язвенного дефекта с параллельным постепенным снижением показателя повреждения тканей (TDI). Количество НФ на вторые, четвертые и шестые сутки было меньше в сравнении с аналогичными показателями группы II. Показатель ЛФ на вторые и четвертые сутки превысил аналогичные показатели в группе II, со значимым снижением на шестые сутки относительно показателя II группы ($p < 0,02$), не достигающим, однако, значений группы интактных животных. Количество ЭФ нормализовалось относительно показателя интактной группы начиная с четвертых суток внутрибрюшинного введения ОКС. На фоне внутрибрюшинной озонотерапии показатель ГЦ значимо нарастал в динамике начиная со вторых и максимально к шестым суткам, в сравнении с группой интактных животных и аналогичными показателями группы II.

Количество плазмоцитов, увеличиваясь на вторые сутки эксперимента, на фоне внутрибрюшинного введения ОКС не претерпевало значимых изменений численности, однако на шестые сутки было ниже аналогичного показателя группы II. Количество фибробластов, нарастая на вторые, четвертые и шестые сутки относительно показателя интактной группы, значимо снижалось на шестые сутки в сравнении с аналогичным показателем группы II. Таким образом, применение внутрибрюшинной озонотерапии приводило к ограничению воспалительных изменений в толстом кишечнике, что проявлялось в виде значимого снижения в динамике числа НФ, ЛФ, ЭО, ФБ, сокращению язвенного дефекта и снижению индекса повреждения тканей.

При ректальном варианте озонотерапии динамика изменения состава воспалительного инфильтрата характеризовалась также значимым повышением всех параметров на вторые, четвертые (за исключением ЭФ), шестые (за исключением НФ, ЭФ) сутки в сравнении с группой интактных животных. В целом в III группе отмечались более низкие значения количества НФ, ЛЦ, ПЦ на вторые, четвертые и шестые сутки эксперимента в сравнении с показателями II и III групп. На фоне ректального введения озона количество НФ и ЛФ на шестые сутки снизилось до значений интактной группы, при этом количество ПЦ по-прежнему оставалось на значимо высоком уровне. Показатель эозинофилов превышал значения группы интактных животных только на вторые сутки, с нормализацией показателя на четвертые и шестые сутки. Отмечено нарастание числа ГЦ на фоне ректального применения озонотерапии со вторых суток, максимальное – на шестые сутки.

Количество ФБ, значимо повышаясь относительно показателей интактной группы уже на вторые сутки, на фоне терапии на шестые сутки снизилось незначительно, однако данный показатель на шестые сутки был значимо ниже, чем в группах II и III. Размер язвенного дефекта и индекс повреждения тканей после ректального применения озона уже на вторые сутки оказался значимо меньших размеров, чем в группах II и III, однако не достигали значений интактной группы, т. е. полного восстановления не происходило.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несомненно, язвенный колит является актуальной и нерешенной проблемой современной медицины. Имеется ряд экспериментальных моделей для изучения механизмов развития ВЗК и доклинической оценки терапевтических стратегий. Экспериментальные модели включают химическое воздействие на стенку кишечника (тринитробензолсульфоновая кислота, оксазолон, уксусная кислота, НПВС, каррагинан, пептидогликан-полисахарид), трансгенные модели (Gαi–/– , IL-2 –/– , IL-10–/– , Keratin 8–/– , TCRα –/–), адаптивного переноса (CD4+ T cells/SCID, CD3ϵ (Tgϵ26)), спонтанные (C3H/HeBir), однако ни одна из предложенных моделей не отражает в полной мере всей совокупности и сложности изменений, происходящих в тканях толстого кишечника при ВЗК [12, 13]. Тем не менее они могут быть использованы для отработки различных терапевтических подходов [14]. Выбор оксазолоновой модели ВЗК обусловлен, во-первых, способностью оксазолона (4-этоксиметилен-2-фенил-2-оксазолин-5-он) модифицировать белки, селективно связываясь с ними на поверхности колоноцитов с возможностью развития аутоиммунного компонента воспаления, во-вторых, способностью вызывать воспаление, напоминающее дистальный язвенный колит. Индуцируемое оксазолоном воспаление дистальных отделов толстого кишечника более поверхностное, сопровождается инфильтрацией лимфоцитами и нейтрофилами, отеком собственной пластинки слизистой оболочки, наличием эрозий и язв. Механизм действия оксазолона аналогичен свойствам гаптенов, способных селективно связываться с эндоген-

ными протеинами, муцинами в слизистой оболочке толстого кишечника, индуцируя иммунный ответ мукозоассоциированной ткани кишечника в виде активации дендритных клеток, макрофагов, Т-хелперов 2-го типа с формированием Th2-поляризованного иммунного ответа [15].

Достигнутые положительные эффекты озонотерапии в целом обусловлены полимодальными свойствами молекулы озона [16, 17]. Поступление озона в организм приводит к умеренному окислительному стрессу, прежде всего за счет взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) и водой, образования АФК, липоперекисей, гидроперекисей, изопростанов, озонидов, 4-гидроксиноненала и других соединений [18]. Индукция в клетке окислительных реакций сопровождается активацией транскрипционного фактора Nrf2 и последующим повышением синтеза и активности ферментов антиоксидантной защиты [19–21].

Имеются сведения об индукции озоном синтеза ряда белков теплового шока, играющих важную роль в защите клеточных мембран при воспалении [22]. Описана горметическая роль О3 в отношении противовоспалительных и регуляторных эффектов, в частности, синтеза простагландинов с различным механизмом действия, регуляции сосудистого тонуса [23]. Молекула озона способна вмешиваться в метаболизм клеток, повышая эффектность работы дыхательной цепи митохондрий, увеличивая скорость гликолиза за счет повышения активности фосфофруктокиназы, увеличивает синтез АТФ и 2,3-ДФГ, сдвигает кривую диссоциации оксигемоглобина вправо и наряду с увеличением синтеза NO, простациклина повышает резистентность тканей к гипоксии, увеличивает площадь эффективной перфузии [24, 25], способствуя процессам репарации поврежденных тканей [26].

Противовоспалительное действие озона, кроме того, обусловлено уменьшением синтеза провоспалительных цитокинов за счет блокады активации NF-kB-зависимых путей [27]. Показано, что орошение 3- и 5%-ным раствором О3 колонии синовиальных фибробластов приводит к снижению синтеза ими провоспалительных факторов IL-1β, TNF-α, IL-6.

В экспериментах на крысах продемонстрировано, что внутрибрюшинное введение озона в дозе 150 мг/кг уменьшает стрептозотоцин-индуцированные повреждения поджелудочной железы за счет увеличения количества в ткани железы глутатионтрансферазы, активации Nrf2-зависимых путей транскрипции, повышения уровня сывороточного инсулина и лептина [28, 29]. В клинических условиях показано гепатопротекторное действие О3, а также увеличение эффективности традиционных гепатопротекторов при комбинированном применении последних с О3 [30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение озонотерапии при оксазолон-индуцированном язвенном колите обнаружило положительное действие озона на морфологическую картину участка повреждения и динамику изменений клеточного состава воспалительного инфильтрата. Зафиксирован более выраженный позитивный эффект локального применения озона в виде ректальной озонотерапии на показатели морфометрии: нормализация на шестые сутки количества нейтрофилов, более выраженное сокращение площади язвенного дефекта, снижение индекса повреждения тканей. Полученные результаты позволяют рассматривать озонотерапию как одно из перспективных направлений терапии воспалительных заболеваний кишечника.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Battistini C., Ballan R., Herkenhoff M.E. et al. Vitamin D Modulates Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. Int J Mol Sci. 2020;22(1):362. https://doi.org/10.3390/ijms22010362.
2. Burisch J., Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 2015;50(8):942–951. https://doi.org/10.3109/00365521.2015.1014407.
3. Lai L.J., Shen J., Ran Z.H. Natural killer T cells and ulcerative colitis. Cell Immunol. 2019;335:1–5. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.08.010.
4. Omenetti S., Pizarro T.T. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. Front Immunol. 2015;6:639. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00639.
5. Weisshof R., El Jurdi K., Zmeter N., Rubin D.T. Emerging Therapies for Inflammatory Bowel Disease. Adv Ther. 2018;35(11):1746–1762. https://doi.org/10.1007/s12325-018-0795-9.
6. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. Альманах клинической медицины. 2018;46(5):396–425. https://doi.org/10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425.
7. Новгородцев А.Д., Кочагина Ю.А. Потенциал озонотерапии в онкологии // Онкология – XXI век: материалы XXI Междунар. науч. конф. «Онкология – XXI век». Пермь: Книж. формат, 2017. С. 155–159.
8. Kiesler P., Fuss I.J., Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 2015;1(2):154–170. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.01.006.
9. Hoving J.C., Keeton R., Höft M.A. et al. IL-4 Receptor-Alpha Signalling of Intestinal Epithelial Cells, Smooth Muscle Cells, and Macrophages Plays a Redundant Role in Oxazolone Colitis. Mediators Inflamm. 2020;2020:4361043. https://doi.org/10.1155/2020/4361043.
10. Yao J., Lu Y., Zhi M. et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR-γ/NFAT. Mol Med Rep. 2017;16(6):8315–8322. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7673.
11. Boismenu R., Chen Y. Insights from mouse models of colitis. J Leukoc Biol. 2000;67(3):267–278. https://doi.org/10.1002/jlb.67.3.267.
12. Randhawa P.K., Singh K., Singh N. et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. Korean J. Physiol. Pharmacol. 2014;18(4):279–288. https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.4.279.

13. Perše M., Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. J Biomed Biotechnol. 2012;2012:718617. https://doi.org/10.1155/2012/718617.
14. Jiang W., Su J., Zhang X. et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm. Res. 2014;63:943–950. https://doi.org/10.1007/s00011-014-0768-7.
15. Зинчук В.В., Билецкая Е.С. Кислородзависимые механизмы физиологического действия озона (обзор). Журнал медико-биологических исследований. 2019;7(2):216–227.
16. Himuro H. The Effect of Ozone on Colonic Epithelial Cells. Kurume Med J. 2018;64(4):75–81. https://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS644002.
17. Clavo B., Santana-Rodríguez N., Llontop P. et al. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? Evidence-based complementary and alternative medicine. 2018;2018: 7931849. URL: https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/7931849.
18. Tian T., Wang Z., Zhang J., Tian T. Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017;2017: 4535194. URL: https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/4535194.
19. Mohan S., Gupta D. Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. Biomed. Pharmacother. 2018;108,1866–1878. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.019.
20. Martínez-Sánchez G., Schwartz A., Di Donna V. Potential cytoprotective activity of ozone therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. Antioxidants. 2020;9:389–401. https://doi.org/10.3390/antiox9050389.
21. Bocci V., Valacchi G. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. Frontiers in chemistry. 2015;3(4). URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2015.00004/full.
22. Kim Y.M., Pae H.O., Park J.E. et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2011;14(1):137–167.
23. Manoto S.L., Maepa M.J., Motaung S.K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. Saudi journal of biological science. 2018;25(4):672–679.
24. Orakdogen M., Uslu S., Emon S.T. et al. The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery. Turkish neurosurgery. 2016;26:860–865.
25. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E. Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction. Crit Care Clin. 2017;33(1):167–191. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2016.08.006.
26. Izadi M., Bozorgi M. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. Medicine (Baltimore). 2018;97(48):e12505. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000012505.
27. Siniscalco D., Trotta M.C., Brigida AL. Intraperitoneal Administration of Oxygen/Ozone to Rats Reduces the Pancreatic Damage Induced by Streptozotocin. Biology (Basel). 2018;7(1). https://doi.org/10.3390/biology7010010.
28. Wang Z., Zhang A., Meng W. et al. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis. Eur. J. Pharmacol. 2018;835:82–93. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.059.
29. Seyam O., Smith N.L., Reid I. et al. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. Med Gas Res. 2018;8(3):103–110. https://doi.org/10.4103/2045-9912.241075.
30. Bai Z., Li H., Guo X., Liu Y. et al. Successful treatment of acute-on-chronic liver failure and hemolytic anemia with hepato-protective drugs in combination with intravenous ozone without steroids: A case report. Intractable Rare Dis Res. 2018;7(3):204–208. https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01074.

Сведения об авторе
Е. В. Давыдова – доктор медицинских наук;
М. В. Осиков – доктор медицинских наук, профессор;
Н. В. Кайгородцева – ассистент кафедры.

Information about the author
E.V. Davydova – Doctor of Science (Medicine);
M.V. Osikov – Doctor of Science (Medicine), Professor;
N.V. Kaygorodtceva – Department Assistant.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflicts of interests. The author declares no conflicts of interests.

Источник финансирования. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.
Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Этическая экспертиза. Заключение Этического комитета ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России на проведение исследования (протокол № 4 от 22.05.2020 года).
Ethics. Conclusion of the Ethical Committee of FGBOU VO SUSHMU of the Ministry of Health of Russia to conduct the study (Protocol №4 dated 22.05.2020).

Информированное согласие не применимо.
Informed consent is not applicable.

Статья поступила в редакцию 02.06.2022; одобрена после рецензирования 20.07.2022; принята к публикации 26.09.2022.
The article was submitted 02.06.2022; approved after reviewing 20.07.2022; accepted for publication 26.09.2022.