

АУТОИММУННЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ

Давыдова Е.В., Осиков М.В., Бакеева А.Е., Кайгородцева Н.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. На сегодняшний день в мире число заболеваний органов пищеварения удваивается каждые десять лет, что представляет собой значимую медико-социальную проблему. Недостаточное понимание ряда аспектов патогенеза воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) препятствует разработке патогенетически обоснованных методов терапии. Патогенез ЯК остается дискуссионным, в связи с большим набором этиологических факторов, инициирующих активацию клеточных и гуморальных механизмов иммунного реагирования в процессе формирования воспалительных изменений в толстом кишечнике. Малоизученными остаются вопросы цитокиновой регуляции иммунного реагирования при ВЗК. Цель работы – на примере экспериментальной оксазолоновой модели язвенного колита изучить роль цитокинов аутоиммунной направленности в крови и Т-регуляторных клеток в тканях толстого кишечника в патогенезе данного заболевания.

Работа выполнена на 40 белых крысах линии Wistar, язвенный колит моделировали ректальным введением 3%-ного спиртового раствора оксазолон. Для анестезии использовали препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамина гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг. Исследования проводили на 2-е, 4-е и 6-е сутки. Концентрацию в сыворотке IL-17 и IL-23 определяли с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB с применением специфических тест-системы для крыс. Для иммуногистохимического исследования Т-регуляторных клеток использовали анти-FoxP3 антитела (Arigo Biolaboratories, Тайвань) с последующей постановкой реакции в иммуногистостейнере VENTANA BenchMark XT (США). Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Установлено, что при экспериментальном язвенном колите в сыворотке крыс на 2-е, 4-е и 6-е сутки эксперимента увеличивается концентрация провоспалительного IL-17, эффекты которого реализуются посредством привлечения в очаг воспаления нейтрофилов и других клеток врожденного иммунитета, участием в поддержании хронического воспаления и аутоиммунных реакциях. Концентрация в сыворотке IL-23, индуцирующего и поддерживающего воспалительный процесс в стенке толстого кишечника, также значимо увеличивались на 2-е, 4-е и 6-е сутки. На 4-е и 6-е сутки эксперимента в клеточных популяциях ткани толстого кишечника значимо снижался процент позитивных FoxP3⁺Т-лимфоцитов, что свидетельствует о возможном разворачивании аутоиммунных процессов в стенке толстого кишечника.

Ключевые слова: цитокины, Т-лимфоциты, экспериментальный язвенный колит

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Evgeniya V.
South Ural State Medical University
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: davidova-ev.med@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Давыдова, М.В. Осиков, А.Е. Бакеева,
Н.В. Кайгородцева «Аутоиммунный профиль крови
крыс при экспериментальном язвенном колите»
// Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24,
№ 2. С. 209–214.
doi: 10.46235/1028-7221-1013-АРО
© Давыдова Е.В. и соавт., 2021

For citation:

E.V. Davydova, M.V. Osikov, A.E. Bakeeva,
N.V. Kaigorodtseva "Autoimmune profile of rat blood
in experimental ulcerative colitis", Russian Journal of
Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2021,
Vol. 24, no. 2, pp. 209–214.
doi: 10.46235/1028-7221-1013-АРО
DOI: 10.46235/1028-7221-1013-АРО

AUTOIMMUNE PROFILE OF RAT BLOOD IN EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS

Davydova E.V., Osikov M.V., Bakeeva A.E., Kaigorodtseva N.V.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Worldwide incidence of digestive system disorders doubles each decade, thus representing a significant medical and social problem. Despite lacking knowledge in pathogenesis of inflammatory bowel diseases, it is clear that serum cytokine imbalance, and lesions in the walls of gastrointestinal tract are observed in experimental colitis. Pathogenesis of UC remains controversial due to a large set of etiological factors that initiate activation of cellular and humoral mechanisms of the immune response upon development of inflammatory changes in the large intestine. At the same time, cytokine secretion and expression have not been studied in details. The aim of the work was to study the cytokine profile of blood in rats using the experimental oxazolone model of ulcerative colitis. The work was performed in 40 white Wistar rats; ulcerative colitis was induced by rectal administration of a 3% alcohol solution of oxazolone. For anesthesia, Zoletil-100 (INN: tiletamine hydrochloride, VirbacSanteAnimale; France) was used at a dose of 20 mg/kg. The studies were carried out on the 2nd, 4th and 6th days. Serum concentration of IL-6, IL-8, IL-17 and IL-23 was determined by means of automatic ELISA analyzer “Personal LAB” using a specific test system for rats. For immunohistochemistry of Treg cells, we used anti-FoxP3 antibody (Arigo Biolaboratories, Тайвань) followed by immunohistostaining in VENTANA BenchMark XT (USA). Statistical evaluation was performed by non-parametric Mann–Whitney and Wald–Wolfowitz criteria. The difference was considered significant at $p \leq 0.05$. In rats with experimental colitis, an increase of proinflammatory IL-17 which acts by attraction of neutrophils and other cells of innate immunity, supporting chronic inflammation and autoimmune reactions. We have found an increase of serum IL-23 concentration in rats with experimental ulcerative colitis on days 2, 4 and 6 of the experiment. This cytokine induces and maintains the inflammatory process in the wall of the large intestine. Significant decrease of FoxP3⁺T-lymphocytes was revealed in colonic tissues, thus suggesting appropriate local autoimmune disorders.

Keywords: cytokines, T-lymphocytes, experimental ulcerative colitis

Введение

На сегодняшний день в мире число заболеваний органов пищеварения удваивается каждый десять лет, что представляет собой значимую медико-социальную проблему [7]. Рост заболеваемости язвенным колитом (ЯК) в том числе среди молодых социально активных и трудоспособных лиц, отмечается многими исследователями [1, 5]. Патогенез ЯК до конца не ясен, прежде всего, в связи с широким спектром этиологических факторов, инициирующих активацию клеточных и гуморальных компонентов иммунной системы при участии Th1-, Th2-зависимого иммунного ответа, изменения баланса Th17/Treg [13]. Известно, что при ВЗК в крови формируется особый цитокиновый профиль, инициирующий и поддерживающий хроническое воспаление, а сами цитокины являются ключевыми мишенями патогенетически ориентированной терапии [11, 15]. В патогенезе поражения слизистой оболочки толстого кишечника при ЭЯК имеет значение IL-23-зависимая активация Th17-зависимого иммунного ответа с последующим

увеличением продукции гуморальных эффекторных факторов иммунитета [14]. Имеет место дифференциация наивных Th0 при участии IL-12 в Th1-субпопуляцию, при участии IL-4 в Th2-субпопуляцию, а при участии IL-23, IL-1 β , TGF- β , IL-21 – в Th17 [8]. Однако цитокиновая секреция и экспрессия изучена не в полной мере.

Цель работы – на примере экспериментальной оксазолонной модели язвенного колита изучить роль цитокинов аутоиммунной направленности в патогенезе данного заболевания.

Материалы и методы

Исследование проведено на 40 белых крысах линии Wistar массой 240-260 г, разделенных на 2 группы: I (n = 10) – интактный контроль; II (n = 30) – животные с ЭЯК. Постановка модели ЯК проводилась с помощью двухэтапного введения оксазолонана (Sigma-aldrich; США). Первый этап включал кожную сенсibilизацию за счет нанесения 150 мкл 3%-го спиртового раствора оксазолонана межлопаточную область, второй этап представлял собой ректальное введение 150 мкл

3%-го спиртового раствора оксазолон на глубину 7-8 см [9]. Для анестезии был применен препарат «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид) (Virbac Sante Animale; Франция) в дозе 20 мг/кг. Концентрацию в сыворотке IL-17, IL-23 определяли на 2-е, 4-е и 6-е сутки, с помощью автоматического иммуноферментного анализатора Personal LAB (Италия) с применением иммуноферментной тест-системы для крыс фирмы Cloud-Clone Corp. (Китай). Результаты выражали в пг/мл. Для иммуногистохимического исследования были использованы фрагменты стенки толстого кишечника опытных и контрольных животных: вырезанные фрагменты ткани помещали в маркированные гистологические кассеты и фиксировали 72 часа в 10% нейтральном формалине. Подготовку материала проводили по стандартной методике в гистопроцессоре Sakura Tissue Tek VIP 5 Tissue Processor. Окраска гематоксилином и эозином производилась ручным способом по общепринятой схеме: депарафинизация, регидратация, окраска красителями, дегидратация, просветление и заключение под покровное стекло. Для иммуногистохимического исследования использовали анти-FoxP3 антитела (Arigo Biolaboratories, Тайвань). Постановка иммуногистохимической реакции производилась в иммуногистостейнере Ventana BenchMark XT (США). Подсчет клеток производили на микроскопе PrimoStar (Carl Zeiss), с морфометрической установкой Pro 150ES (Pixer), диапазон увеличений: окуляр 10, объектив 20. Для анализа полученных изображений использовали программу QuPath. Обработка полученных данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 10.0 for Windows, с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни, Вальда Вольфовитца, Краскелла–Уоллиса. Статистические

различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Особую роль в развитии иммунного ответа при экспериментально-индуцированных воспалительных процессах в дистальных отделах толстого кишечника играют провоспалительные цитокины. В ряде исследований в изменении иммунного статуса показана роль провоспалительных цитокинов аутоиммунной направленности IL-17 и IL-23 [12].

В таблице 1 представлена динамика уровня провоспалительных цитокинов при экспериментальном ЯК на 2-е, 4-е и 6-е сутки наблюдения. Установлено, что концентрация IL-23 в сыворотке статистически значимо увеличивается на 2-е сутки в сравнении с показателем, полученным в группе интактных животных, и достигает максимальных значений на 6-е сутки. Концентрация IL-17 значимо возрастает на 4-е и 6-е сутки в сравнении с показателем интактных животных.

Полученные данные указывают на формирование провоспалительного профиля крови в ответ на развитие оксазолон-индуцированного язвенного колита. Известно, что одна из ключевых позиций патогенеза ВЗК является реализация оси IL-23/Th17 [3, 4]. IL-23 относится к семейству IL-12, имеет общую с IL-12 субъединицу p40, продуцируется преимущественно макрофагами, дендритными и др. клетками и связывается с рецепторами IL-12 β 1 на наивных Th0, Th17, макрофагах, нейтрофилах и др. клетках. Доказано, что Th17-связанные эффекторные цитокины, такие как IL-17A и IL-17F индуцируют и поддерживают воспалительный процесс в стенке толстого кишечника и других отделов ЖКТ за счет рекру-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОВСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF SOME CYTOKINES IN SERUM IN EXPERIMENTAL COLITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, пг/мл Parameter, pg/ml	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ЭК 2-е сутки Group 2 EC 2 nd day (n = 10)	Группа 2 ЭК 4-е сутки Group 2 EC 4 th day (n = 10)	Группа 2 ЭК 6-е сутки Group 2 EC 6 th day (n = 10)
IL-17	7,8 (7,2-8,0)	5,7 (5,2-6,4)	14,3 (13,8-18,9)*	16,7 (16,2-24,9)*
IL-23	31,26 (28,59-42,34)	72,25 (69,54-84,52)*	75,47 (55,19-78,31)*	84,6 (71,18-97,16)*

Примечание. * – значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1.

Note. *, significant ($p < 0.05$) difference with group 1.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ FоxP3-ПОЗИТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЯЗВЕННОМ КОЛИТЕ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONCENTRATION OF FоxP3 IN MUCOSA OF THE LARGE INTESTINE IN EXPERIMENTAL COLITIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, ед./мм ² Parameter, item/mm ²	Группа 1 Интактные Group 1 Intact (n = 10)	Группа 2 ЭК 2-е сутки Group 2 EC 2 nd day (n = 10)	Группа 2 ЭК 4-е сутки Group 2 EC 4 th day (n = 10)	Группа 2 ЭК 6-е сутки Group 2 EC 6 th day (n = 10)
FоxP3	3,5 (3,2-4,3)	3,4 (3,3-4,1)	2,8 (2,2-3,0)*	2,4 (1,8-2,6)*

Примечание. См примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

тирования из кровотока нейтрофилов, при участии ИЛ-8, индукции синтеза макрофагами провоспалительных медиаторов ИЛ-6, ИЛ-1 β , TNF α и др., секреции матриксных металлопротеиназ фибробластами кишечника [10]. В то же время показано, что концентрация ИЛ-23 у больных с воспалительными заболеваниями кишечника повышается в сыворотке и в стенке кишечника и коррелирует с активностью заболевания [6]. ИЛ-23 также рассматривается как связующее звено между реакциями врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника и потенциальная терапевтическая мишень [6].

Обнаруженные изменения цитокинового профиля крови при экспериментальном язвенном колите в виде увеличения концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-17, ИЛ-23 в сыворотке могут являться отражением аутоиммунного процесса, формирующегося в стенке толстого кишечника. В связи с этим на следующем этапе в динамике экспериментального колита исследовано содержание FоxP3-позитивных Т-лимфоцитов (Т-регуляторных лимфоцитов) в стенке толстого кишечника (табл. 2).

Результаты оценки процентного содержания количества FоxP3-позитивных клеток в слизистой оболочке толстого кишечника при экспериментальном колите представлены в таблице 2. На 4-е и 6-е сутки процент FоxP3-позитивных

клеток в слизистой оболочке толстого кишечника значительно снижался в сравнении с показателем группы интактных животных. Максимальное снижение FоxP3-позитивных клеток в динамике эксперимента фиксировалось на 6-е сутки. Снижение в динамике ЭЯК количества Т-регуляторных лимфоцитов на фоне роста в крови ИЛ-17 и ИЛ-23 создает предпосылки для развертывания аутоиммунных реакций в стенке толстого кишечника при ЭЯК. Важным моментом для дифференцировки Т-хелперов 17-го типа, продуцирующих ИЛ-17, является концентрация TGF- β , который в низких концентрациях стимулирует развитие Т-хелперов 17-го типа из наивных Th0, а в высоких — продукцию в Th0 наивных белка FоxP3, блокирующего экспрессию генов, связанных с ROR γ t, результатом чего является дифференцировка наивных хелперных клеток в Treg-клетки [2].

Выводы

Выявленный нами дисбаланс в повышении в крови ИЛ-17 и ИЛ-23 на фоне снижения в динамике ЭЯК в тканях толстого кишечника процента Т-регуляторных клеток, осуществляющих контроль за развитием аутоиммунных процессов, может свидетельствовать о формировании аутоиммунного цитокинового профиля крови на фоне развития аутовоспалительных изменений в стенке толстого кишечника.

Список литературы / References

1. Долгушина А.И., Хусаинова Г.М., Василенко Г.М., Кононенко А.Г. Распространенность воспалительных заболеваний кишечника в Челябинской области // Альманах клинической медицины, 2019. Т. 47, № 6. С. 511-517. [Dolgushina A.I., Khusainova G.M., Vasilenko G.M., Kononenko A.G. Prevalence of inflammatory bowel disease in the Chelyabinsk region. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2019, Vol. 47, no. 6, pp. 511-517. (In Russ.)]
2. Дьяченко П.А., Дьяченко А.Г. Клетки Th17 и их роль в возникновении аутоиммунных заболеваний // Иммунология та алергологія: наука і практика, 2011. № 2. С. 4-10. [Dyachenko P.A., Dyachenko A.G. Th17 cells and their role in the occurrence of autoimmune diseases. *Imunologiya i alergologiya: nauka i praktika = Immunology and Allergology: Science and Practice*, 2011, no. 2, pp. 4-10. (In Russ.)]

3. Bo L., Fu H., Yang J. Comprehensive analysis of gene expression profiles provides insight into the pathogenesis of Crohn's disease. *Mol. Med. Rep.*, 2018, Vol.18, no. 3, pp. 2643-2650.
4. Borecki K., Zawada I., Salkić N.N., Karakiewicz B., Adler G. Relationship between the IL23R SNPs and Crohn's disease susceptibility and phenotype in the polish and bosnian populations: a case-control study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2019, Vol. 16, no. 9, 1551. doi: 10.3390/ijerph16091551.
5. Burisch J., Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 50, no. 8, pp. 942-951.
6. Catana C.S., Neagoe I.B., Cozma V., Magdaş C., Tăbăran F., Dumitraşcu D.L. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 21, no. 19, pp. 5823-5830.
7. Corridoni D., Arseneau K.O., Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunol. Lett.*, 2014, Vol. 161, no. 2, pp. 231-235.
8. Gálvez J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflamm.*, 2014, Vol. 2014, 928461. doi: 10.1155/2014/928461.
9. Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis is mediated by IL13-producing NK-T cells. *Immunity*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 629-638.
10. Jiang W., Su J., Zhang X., Cheng X., Zhou J., Shi R., Zhang H. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Res.*, 2014, Vol. 63, no. 11, pp. 943-950.
11. Korolkova O.Y., Myers J.N., Pellom S.T., Wang L., M'Koma A.E. Characterization of serum cytokine profile in predominantly colonic inflammatory bowel disease to delineate ulcerative and crohn's colitides. *Clin. Med. Insights. Gastroenterol.*, 2015, Vol. 8, pp. 29-44.
12. Lai L.J., Shen J., Ran Z.H.. Natural killer T cells and ulcerative colitis. *Cell. Immunol.*, Vol. 335, pp. 1-5.
13. Lee S.H., Kwon J.E., Cho M.L. Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest. Res.*, 2018, Vol. 16, no. 1, pp. 26-42.
14. Omenetti S., Pizarro T.T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome/ S. Omenetti. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 639. doi: 10.3389/fimmu.2015.00639.
15. Singh U.P., Singh N.P., Murphy E.A. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients. *Cytokine*, 2016, Vol. 77, pp. 44-49.

Авторы:

Давыдова Е.В. – д.м.н., доцент, профессор кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Осиков М.В. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Бакеева А.Е. — ассистент кафедры фармакологии
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Bakeeva A.E., Assistant Professor, Department of
Pharmacology, South Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russian Federation

Кайгородцева Н.В. — ассистент кафедры
патологической физиологии ФГБОУ ВО «Южно-
Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск,
Россия

Kaigorodtseva N.V., Assistant Professor, the Department of
Pathological Physiology, South Ural State Medical University,
Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 20.05.2021
Принята к печати 17.06.2021

Received 20.05.2021
Accepted 17.06.2021