

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ДВОХ ВИДІВ КОНТРОЛЮ ПРИ ФОРМУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ХРОНІЧНОГО ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

©І. М. Васильєва, О. В. Бабенко, О. А. Наконечна, Л. Д. Попова, С. А. Войтенко

Харківський національний медичний університет

РЕЗЮМЕ. У статті проведено порівняльний аналіз двох видів контролю при ремодельованні хронічного виразкового коліту за допомогою 2,4-Dinitrobenzenesulfonic acid (DNBS) у 50 % розчині етанолу, на підставі якого автори не рекомендують використовувати тварин з інтраректальним введенням етанолу в якості єдиного контролю для запобігання некоректному трактуванню отриманих результатів.

Мета – порівняння двох видів контролю при відтворенні експериментальної моделі хронічного виразкового коліту для запобігання некоректному трактуванню отриманих результатів.

Матеріал і методи. На трьох групах статевозрілих лабораторних щурів обох статей популяції WAG (перша контрольна група – інтраректальне введення 0,9 % фізіологічного розчину; друга контрольна група – введення 50 % розчину етанолу; експериментальна група – введення DNBS у 50 % розчині етанолу) проведено аналіз наявності та ступеня вираження альтеративно десквамативних та запальних змін у товстій кишці морфологічним методом та визначення вмісту циклооксигенази-1 та циклооксигенази-2 імуноферментним методом.

Результати. Виявлено аналогічні морфологічні патерни та зміни вмісту циклооксигенази за умов впливу як DNBS, розчиненого в спирті, так і етанолу. Різниці за цими показниками між експериментальною та другою контрольною групами не виявлено.

Висновки. Група тварин з інтраректальним введенням етанолу не може бути єдиним контролем при моделюванні хронічного виразкового коліту, а може бути використана для виявлення ефектів, обумовлених саме гап-теном DNBS, а не «руйнівником» бар'єру кишечника етанолом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічний виразковий коліт; циклооксигеназа; етанол; dinitrobenzenesulfonic acid.

Вступ. Виразковий коліт та хвороба Крона є найпоширенішими серед хронічних запальних захворювань кишечника. При дослідженнях механізмів розвитку цих захворювань використовують як біопсійний матеріал, отриманий від пацієнтів під час операційного втручання, так і експериментальні моделі на тваринах. При відтворенні експериментальної моделі хронічного виразкового коліту та хвороби Крона зазвичай використовують дві групи контролю (0,9 % фізіологічний розчин та 50 % розчин етилового спирту) [1, 2] або тільки одну групу, тваринам якої вводять 50 % розчин етилового спирту [3]. При цьому автори не наводять у статтях мікрофотографії морфологічних досліджень товстої кишки тварин, яким інтраректально вводили спиртовий розчин, а різниця в показниках зазвичай є достовірною, порівняно з контролем, в якому використовували введення тільки фізіологічного розчину [1–3].

Мета – порівняння двох видів контролю (група щурів, яким вводили фізіологічний розчин та група щурів, яким інтраректально вводили 50 % розчин етанолу) при відтворенні експериментальної моделі хронічного виразкового коліту для запобігання некоректного трактування отриманих результатів.

Матеріал і методи дослідження. В роботі було використано 42 статевозрілих лабораторних щурів обох статей популяції WAG, вагою 190–240 г. Тварин утримували у стандартних умовах

віварію. Воду та повнораціонний гранульований корм експериментальні тварини отримували згідно нормативів *ad libitum*. Індукцію виразкового коліту викликали за допомогою інтраректального введення DNBS (10 мг DNBS, розчиненого у 250 мкл 50 % етилового спирту) [4] впродовж 14 днів [1, 4–6]. На п'ятнадцятий день тварин виводили з експерименту за допомогою гільйотинного ножа.

Згідно з умовами дослідження тварин було поділено на три групи, по чотирнадцять тварин у кожній: перша контрольна група складалася з інтактних тварин, яким вводили 0,9 % фізіологічний розчин; щурам другої контрольної групи вводили 50 % розчин етилового спирту; щурам експериментальної групи вводили DNBS у 50 % спиртовому розчині.

Експериментальна частина дослідження виконувалась відповідно до загальних етичних принципів, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001), положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986) та Директиви Ради Європи 86/609/EEC (1986), Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Отриманий експериментальний матеріал фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну (рН 7,4) протягом 24–48 годин, проводили за загальноприйнятою методикою і заливали у пара-

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення
 фін. З парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки $4-5 \times 10^{-6}$ м для забарвлення гематоксилином та еозином. Мікропрепарати вивчали на мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія) [7].

Вміст ЦОГ-1 та ЦОГ-2 у гомогенаті товстої кишки визначали імуноферментним методом за допомогою Rat Cyclooxygenase-1 та Rat Cyclooxygenase-2 ELISA Kit (MyBioSource) (USA) з використанням імуноферментного аналізатора Stat Fax 1904 з попередньою обробкою тканини згідно з інструкцією до набору.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми GraphPad Prism 5 software з ви-

користанням непараметричного критерію Mann-Whitney. Усі дані представлені у вигляді медіани з 25 та 75 перцентиліями. Різниця між групами вважалася статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. При оглядовій мікроскопії препаратів, забарвлених гематоксилином та еозином, як в експериментальній (введення розчину DNBS у спирт), так і в другій контрольній (введення етанолу) групах визначалися: альтеративно-десквамативні зміни поверхневого епітелію та епітелію кишкових залоз; дифузна поліморфна клітинна інфільтрація в слизовій оболонці, яка місцями поширювалася на підслизову основу (рис. 1).

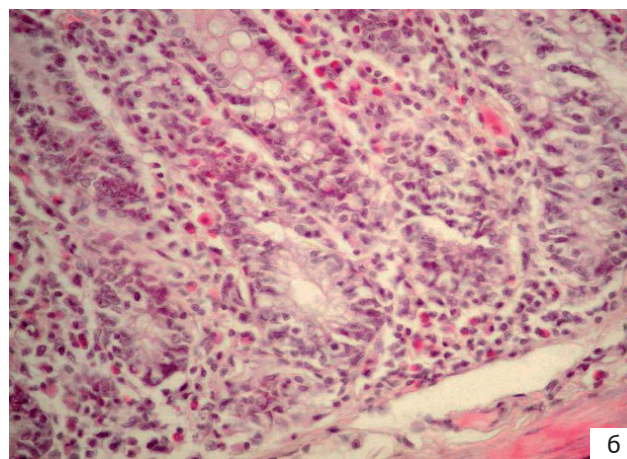
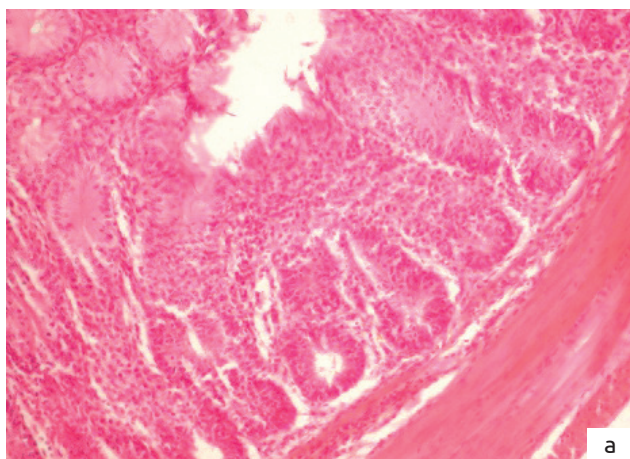


Рис. 1. Мікроскопічна будова товстої кишки щура другої контрольної групи (введення 50 % розчину етанолу ($\times 200$)) (а) та щура експериментальної групи (введення DNBS у 50 % розчині етанолу ($\times 400$)) (б). Забарвлення гематоксилином та еозином.

При дослідженні вмісту ЦОГ-1 та ЦОГ-2 у гомогенатах товстої кишки було виявлено значне зниження обох ізоферментних форм як в експериментальній групі тварин, так і в другій контрольній групі, порівняно з першою контрольною групою (табл. 1).

Циклооксигеназа є ключовим ферментом, залученим до синтезу простагландинів, що відіграють важливу роль у регуляції кровотоку, оновлення епітеліальних клітин, виділення слизу, перистальтики кишечника, запальної реакції [8]. Дані щодо експресії ізоферментів ЦОГ у кишечнику і ступеня їх залу-

Таблиця 1. Вміст циклооксигенази-1 та циклооксигенази-2 у гомогенатах товстої кишки щурів за умов впливу спиртового розчину DNBS порівняно з різними видами контролю

Група тварин	Циклооксигеназа-1 (пкг/г тканини)			Циклооксигеназа-2 (нг/г тканини)		
	Median	25 % Percentile	75 % Percentile	Median	25 % Percentile	75 % Percentile
Перша контрольна група (введення 0,9 % фізіологічного розчину)	1343	1324	1372	259,2	236,0	267,1
Друга контрольна група (введення 50 % розчину етанолу)	665,3 ***	639,2	700,6	71,82 ***	67,04	75,35
Експериментальна група (введення DNBS у 50 % розчині етанолу)	658,8 ***	640,2	696,0	70,27 ***	68,23	72,33

Примітка. *** – $p < 0,001$ порівняно з першою контрольною групою.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення чення до ураження товстої кишки є суперечливими. Раніше вважали, що ЦОГ-1 експресується у кишечнику конститутивно, а експресія ЦОГ-2 індукується запальними цитокінами і є основним джерелом простагландинів при запальних процесах [8]. Проте деякі автори вказують на конститутивну експресію ЦОГ-2 у кишечнику [9]. Тривала недостатність або гальмування ЦОГ-2 асоціюються з патологічними процесами у товстій кишці, незважаючи на нормальні рівні простагландину E2 (PGE2) у кишечнику, що свідчить про важливу роль ЦОГ-2 у підтриманні його цілісності [10]. При цьому щури експериментальної та другої контрольної груп за вмістом досліджуваних параметрів не відрізнялися (табл. 1).

Висновки. Щури експериментальної та другої контрольної груп не відрізнялися за ступенем

вираження загальнопатологічних процесів (альтеративно-десквамативних та запальних змін) у товстій кишці (при морфологічному дослідженні) і вмістом ЦОГ-1 та ЦОГ-2 у гомогенаті товстої кишки імуноферментним методом. Зважаючи на це, група тварин із інтраректальним введенням 50 % розчину етанолу не може слугувати контролем при моделюванні хронічного виразкового коліту, а може бути використана для виявлення ефектів, обумовлених саме гаптенем DNBS, а не «руйнівником» бар'єру кишечника етанолом.

Перспективи подальших досліджень. Порівняти експериментальну та другу контрольну групу за іншими біохімічними показниками, що зазвичай залучаються до патологічного процесу, та станом мікробіоти кишечника цих тварин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Sanovic S. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis / S. Sanovic, D. P. Lamb, M. G. Blennerhassett // *Am. J. Pathol.* – 1999. – Vol. 155 (4). – P. 1051–1057.

2. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model / A. R. Martin, I. Villegas, M. Sanchez-hidalgo, C. Alarcon de la Lastra // *Br. J. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 147 (8). – P. 873–885.

3. Antibodies to Interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice / M. F. Neurath, I. Fuss, B. L. Kelsall [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182 (5). – P. 1281–1290.

4. Hapten-induced chronic colitis in the rat: Alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid / J. L. Wallace, T. Le, L. Carter [et al.] // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* – 1995. – Vol. 33 (4). – P. 237–239.

5. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon / G. P. Morris, P. L. Beck, M. S. Herridge [et al.] // *Gastroenterology.* – 1989. – Vol. 96. – P. 795–803.

6. DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat / V. Morampudi, G. Bhinder, X. Wu [et al.] // *J. Vis. Exp.* – 2014. – Vol. 27 (84). – P. e51297.

7. Application of the computer vision system for evaluation of pathomorphological images / V. Gargin, R. Radutny, G. Titova [et al.] // *Proceedings 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2020*; – 2020. – P. 469–473. DOI: 10.1109/ELNANO50318.2020.9088898.

8. Maseda D. NSAID-Gut microbiota interactions / D. Maseda, E. Ricciotti // *Front. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 1153. DOI: 10.3389/fphar.2020.01153.

9. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways / N. S. Kirkby, M. V. Chan, A. K. Zaiss [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – Vol. 113 (2). – P. 434–439.

10. COX-1 and 2, intestinal integrity, and pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in mice / G. Sigthorsson, R. J. Simpson, M. Walley [et al.] // *Gastroenterology.* – 2002. – Vol. 122 (7). – P. 1913–1923.

REFERENCES

1. Sanovic, S., Lamb, D.P., & Blennerhassett, M.G. (1999). Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am. J. Pathol.*, 155(4), 1051-1057. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65207-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65207-8).

2. Martin, A.R., Villegas, I., Sanchez-hidalgo, M., & Alarcon de la Lastra, C. (2006). The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. *Br. J. Pharmacol.*, 147(8), 873-885. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706469.

3. Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., & Strober W. (1995). Antibodies to Interleukin 12 abrogate

established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.*, 182(5), 1281-1290. DOI: 10.1084/jem.182.5.1281.

4. Wallace, J.L., Le, T., Carter, L., Appleyard, C.B., & Beck, P.L. (1995). Hapten-induced chronic colitis in the rat: Alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 33(4), 237-239. DOI: 10.1016/1056-8719(95)00001-x.

5. Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R., & Wallace, J.L. (1989). Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 96, 795-803.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

6. Morampudi, V., Bhinder, G., Wu, X., Dai, C., Sham, H.P., Vallance, B.A., & Jacobson, K. (2014). DNBS/TNBS colitis models: providing insights into inflammatory bowel disease and effects of dietary fat. *J. Vis. Exp.* 84, e51297. DOI: 10.3791/51297.

7. Gargin, V., Radutny, R., Titova, G., Bibik, D., Kirichenko, A., & Bazhenov, O. (2020). Application of the computer vision system for evaluation of pathomorphological images. Proceedings of 2020 IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology, ELNANO 2020. (pp.469-473). DOI: 10.1109/ELNANO50318.2020.9088898.

8. Maseda, D., & Ricciotti, E. (2020). NSAID-Gut microbiota interactions. *Front. Pharmacol.*, 11, 1153.

DOI: 10.3389/fphar.2020.01153.

9. Kirkby, N.S., Chan, M.V., Zaiss, A.K., Garcia-Vaz, E., Jiao, J., Berglund, L.M., ..., & Mitchell, J.A., (2016). Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF-κB and NFAT transcriptional pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113(2), 434-439. DOI: 10.1073/pnas.1517642113.

10. Sigthorsson, G., Simpson, R.J., Walley, M., Anthony, A., Foster, R., Hotz-Behoftsitz, Ch., ..., & Bjarnason, I. (2002). COX-1 and 2, intestinal integrity, and pathogenesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in mice. *Gastroenterology*, 122(7), 1913-1923. DOI: 10.1053/gast.2002.33647.

COMPARATIVE ANALYSIS OF TWO TYPES OF CONTROL IN THE FORMATION OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC ULCERATIVE COLITIS

©I. M. Vasylyeva, O. V. Babenko, O. A. Nakonechna, L. D. Popova, S. A. Voitenko

Kharkiv National Medical University

SUMMARY. The article presents a comparative analysis of two types of control in the remodeling of chronic ulcerative colitis with 2,4-Dinitrobenzenesulfonic acid (DNBS) in 50 % ethanol solution, based on which the authors do not recommend the use of animals with intrarectal ethanol administration as the only control to prevent misinterpretation of the results.

The aim – to compare two types of control in the reproduction of an experimental model of chronic ulcerative colitis to prevent misinterpretation of the results.

Material and Methods. The analysis of the presence and severity of inflammatory pathological processes in the colon by morphological method and cyclooxygenase-1 and -2 content determination by enzyme immunosorbent assay have been carried out on three groups of sexually mature laboratory rats of both sexes of the WAG population (the first control group – intrarectal administration of 0.9 % saline; the second control group – administration of 50 % ethanol solution; the experimental group – administration of DNBS in 50 % ethanol solution).

Results. Similar morphological patterns and changes in the content of cyclooxygenases in the colon tissue were revealed under the influence of both DNBS dissolved in alcohol and ethanol. There was no difference in these parameters between the experimental and second control groups.

Conclusions. A group of animals with intrarectal administration of ethanol can not be the only control in the model of chronic ulcerative colitis, but can be used to identify effects due to DNBS as hapten and not ethanol as gut barrier “destroyer”.

KEY WORDS: chronic ulcerative colitis; cyclooxygenase; ethanol; dinitrobenzenesulfonic acid.

Отримано 07.09.2021

Електронна адреса для листування: vasilevaira@ukr.net