ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ СМЕСИ ЛИМОННОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТ В МОДЕЛИ АУТОИММУННОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА У КРЫС

Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., Бадтиев А.К., Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г.

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, e-mail: medgenetika435@yandex.ru

Назначение токсичных препаратов, используемых в лечении ревматоидного артрита (РА), осуществляется после установления диагноза, на определение которого может потребоваться длительное время ввиду отсутствия специфических маркеров системного аутоиммунного заболевания. Своевременное начало комплексной терапии в свою очередь обеспечивает эффективность восстановления здоровья. В этой связи назначение пациентам безопасной профилактики на стадии диагностики может содействовать значительному прогрессу на этапе лечения. Целью работы являлось научное обоснование эффективности применения смеси лимонной и янтарной кислот для профилактики индуцированного аутоиммунного артрита в эксперименте на теплокровных животных. Согласно результатам проведенных исследований, введение смеси лимонной и янтарной кислот приводит к коррекции энергетического дефицита, развиваемого на фоне вызванного адьювантом Фрейнда аутоиммунного артрита, что проявилось достоверным ($p < 0,001$) повышением общей дегидрогеназной активности митохондрий на 42-50% относительно опытной (модельной) группы. Профилактика антиоксидантами также способствовала сохранению радиуса лимфоцитов в пределах нормы – 3,59-3,64 мкм на фоне относительного микроцитоза у модельных животных – 3,39 мкм. Высокая корреляционная связь между метаболической активностью митохондрий лимфоцитов и их линейными размерами (коэффициент корреляции 0,99) выявляет внутреннюю взаимозависимость между морфофункциональными характеристиками иммунокомпетентных клеток в условиях их патологической активации. Фенотипическим проявлением снижения воспалительного процесса в соединительной ткани у теплокровных, получавших сукцинат и цитрат, явилось уменьшение веретеновидного отека плюсны и пальцев стопы.

Ключевые слова: адьювант Фрейнда, антиоксидантная профилактика, аутоиммунный ревматоидный артрит, оксигеназная активность.

PREVENTIVE EFFECT OF CITRIC AND SUCCINIC ACIDS MIXTURE IN AUTOIMMUNE RHEUMATOID ARTHRITIS RAT MODEL

Skupnevskiy S.V., Pukhaeva E.G., Badtiev A.K., Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Z.G.

Institute of Biomedical Investigations - the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, e-mail: medgenetika435@yandex.ru

The prescription of toxic drugs are used in the treatment of rheumatoid arthritis (RA) is carried out after a correct diagnosis, which may take a long time to determine due to the absence of specific markers of systemic autoimmune disease. Timely start of complex therapy ensures the effectiveness of health recovery. In this regard prescribing prevention to patients during the diagnostic phase can lead to significant progress during the treatment phase. The aim of our work was scientific justification of the effectiveness of using a mixture of citric and succinic acids for the prevention of induced autoimmune arthritis in an experiment on warm-blooded animals. According to the results of the studies, the administration of a mixture of citric and succinic acids leads to a correction of the energy deficit developed against the background of autoimmune arthritis caused by Freund's adjuvant, which was manifested by a significant ($p < 0,001$) increase in the total dehydrogenase activity of mitochondria by 42-50% relative to the experimental (model) group. Prophylaxis with antioxidants also helped to maintain the radius of lymphocytes within the normal range - 3.59-3.64 microns against the background of relative microcytosis in model animals - 3.39 microns. The high correlation between the metabolic activity of the mitochondria of lymphocytes and their linear sizes (correlation coefficient 0.99) reveals the internal interdependence between the morpho-functional characteristics of immunocompetent cells under conditions of their pathological activation. A phenotypic manifestation of a decrease in the inflammatory process in the connective tissue in warm-blooded animals treated with succinate and citrate was a decrease in fusiform swelling of the metatarsus and toes.

Keywords: antioxidant prophylaxis, autoimmune rheumatoid arthritis, Freund's Complete Adjuvant.

Актуальность поиска средств профилактики ревматоидного артрита определяется высоким социально-экономическим бременем заболевания на общество, заключающимся в утрате профессиональной трудоспособности и инвалидизации, вовлеченностью относительно широких слоев населения в патологию – от 0,5 до 1,0% (при 5,8-6,8% в отдельных регионах мира [1]), увеличением рисков развития болезни после 60 лет [2]. Так, по оценкам экспертов, среднегодовые медицинские затраты, включая лечение, на одного пациента с диагнозом РА составляют от 2682 (Таиланд) до 4457 (Китай) долларов США [3; 4]. Общегосударственные затраты в двух наиболее экономически развитых регионах мира – США и Европе, составляют соответственно 41,6 и 45,3 млрд евро в год [5].

Эффективность лечения ревматоидного артрита напрямую зависит от сроков постановки клинического диагноза и начала базисной терапии. Отсутствие многопрофильных медицинских центров во многих регионах нашей страны и сложность диагностических процедур при ревматоидных заболеваниях обуславливают необходимость развития комплекса вспомогательных мер для реализации подхода T2T (Treat to Target – «Лечение до достижения цели») в лечении РА [6]. Для улучшения существующей ситуации авторами работы [7] предлагается ряд практических рекомендаций, включающих расширение междисциплинарного взаимодействия и обогащение опыта, накопленного ревматологами, за счет достижений других смежных медицинских специальностей. В этом аспекте представляется важным поиск и изучение эффективных и безопасных способов профилактики негативных проявлений ревматоидного артрита на начальных стадиях заболевания, ассоциированного с дисбалансом иммунной системы.

Основу механизмов развития РА составляет неинфекционный воспалительный процесс в соединительной ткани, одним из проявлений которого является оксидативный стресс, обусловленный активацией генерации свободных радикалов в результате избыточного патологического функционирования иммунитета [8; 9]. Изучение возможности коррекции антиоксидантного статуса и энергетического обмена в патогенезе аутоиммунного РА является актуальным вопросом современной медицины.

Цель исследования – научное обоснование эффективности применения смеси лимонной и янтарной кислот для профилактики индуцированного аутоиммунного артрита в эксперименте на теплокровных животных.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на крысах-самцах линии *Wistar* (n=29) массой 400-440 г в возрасте 24 месяца (ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская область). Животные содержались в стандартных условиях вивария при постоянной температуре, влажности и световом режиме 12:12 со

свободным доступом к пище и воде. В работе с лабораторными животными придерживались правил и этических норм содержания и ухода, описанных в руководстве National Research Council, 2011 г., и ГОСТ Р53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН. Эвтаназию крыс осуществляли в CO₂-затравочной камере. Животные были разделены на четыре группы. Манипуляции по введению растворов проводились под легким общим наркозом («Золетил», Франция). Крысам первой группы (негативный контроль (n=6)) вводили в правую заднюю конечность подкожно изотонический раствор натрия хлорида в объеме 0,1 мл на 200 г веса. Во второй группе крыс (позитивный контроль (n=7)) моделировали адьювантный артрит путем однократного введения в правую заднюю конечность адьюванта Фрейнда (АФ) DIFCO LABORATORIES (Detroit, Michigan, США) в объеме 0,1 мл на 200 г веса. Животным третьей и четвертой групп (по 8 животных в каждой) на фоне индуцированной патологии (0,1 мл на 200 г веса АФ) вводили однократно в день с едой смесь лимонной и янтарной кислот («Л» и «Я» соответственно) в массовом соотношении 1:4 на протяжении всего периода эксперимента (7 недель). Дозировка кислот (нейтрализованных до pH=7,5 минеральной водой) составляла: третья группа 17 мг/кг, четвертая – 88 мг/кг.

Суммарную оксигеназную активность митохондрий лимфоцитов периферической крови определяли цитобиохимическим методом. Для этого по истечении 7 недель с момента введения затравок под общим наркозом у животных из сердца отбирали кровь и наносили на обезжиренные смесью Никифорова стекла. Равномерность нанесения обеспечивалась использованием аппарата Microscopy Vision (Австрия). Мазки высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 30 минут, а затем их фиксировали забуференным (10 мМ HEPES) 60% раствором ацетона (pH 5,2-5,4) на бидистиллированной воде. После фиксации стекла ополаскивали дистиллированной водой и повторно высушивали на воздухе в течение 30 минут. Оценку оксигеназной активности осуществляли по реакции восстановления нитросинего тетразолия окисленного (НСТ) в среде, содержащей следующие реагенты: KCl - 125 мМ, HEPES – 10 мМ, НСТ – 1 мг/мл, pH 7,2±0,01 при температуре 37 °С.

Мазки инкубировали в водяном термостате 1 ТЖ-0-03 в течение 1 часа при температуре 37 °С и небольшом перемешивании. По окончании процесса стекла ополаскивали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре в течение 20 минут. Ядра клеток окрашивали 0,05% раствором водного нейтрального красного в течение 8 мин., затем предметные стекла промывали в течение 5-10 секунд в дистиллированной воде. Высушенные на воздухе мазки подвергали микроскопическому анализу не позднее чем за 1 месяц после получения. Клетки фотографировали и

обрабатывали в программах Blood Runner и BioImages (г. Пущино), используя тринокулярный микроскоп «Микромед-2» (Россия), увеличение 10x100 и цифровую камеру Tour Cam 9.0 MP (Китай). На каждую крысу анализировалось по 100 лимфоцитов, рандомизированно отбираемых из трех зон стекла: начальной, средней и финишной. Интенсивность восстановления НСТ и особенности морфологических признаков иммунных клеток (радиус) рассчитывали в соответствии с принципом работы программы, основанным на обсчете площадных характеристик клеток и их компартментов, сканирования гранул на разных уровнях плотности, что позволяло выявить интенсивность отложения формаза, вычислить количество образуемого маркера дыхательной активности митохондрий – диформаза (рис. 1). Биохимические исследования проведены в соответствии с протоколом, описанным в [10].

Рис. 1. Вариант профайла, полученный на основании цифровой обработки первичного снимка лимфоцита

У всех крыс в конце эксперимента проводили комплексное обследование, включающее общий осмотр, пальпацию и определение антропометрических показателей (размеры задних лапок).

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона (r_{xy}) в программе Excel 2016.

Результаты исследования и их обсуждение

Введение животным адьюванта Фрейнда, представляющего собой водно-масляную эмульсию термически обработанных микобактерий [11], привело к активации аутоиммунной реакции, вызывающей выраженные дистрофические изменения в костно-мышечном аппарате подопытных грызунов (рис. 2).

Рис. 2. Фотографии правых задних конечностей контрольных и опытных крыс: а – негативный контроль; б – позитивный контроль; в, г – животные, получавшие смесь лимонной и янтарной кислот в концентрациях 17 и 88 мг/кг веса соответственно

Из рисунка видно, что деформация суставов животных модельной группы (позитивный контроль (рис. 2б)) достигает максимальной степени выраженности; при пальпации у отдельных крыс выявляется анкилоз. В группах леченых животных припухлость суставов и отечность тканей проявляются в меньшей степени, свидетельствуя о профилактическом действии исследуемой антиоксидантной смеси из кислот (рис. 2 в, г).

Поскольку течение системных заболеваний сопровождается энергетическим дефицитом, нами изучены изменения суммарной оксигеназной активности митохондрий клеточного звена иммунной системы в ходе эксперимента (рис. 3).

Рис. 3. Общая оксигеназная активность митохондрий лимфоцитов у крыс
 (*- $p < 0,05$ относительно негативного контроля; ##- $p < 0,01$, ###- $p < 0,001$ относительно позитивного контроля)

Из рисунка 3 видно, что на поздних стадиях развития патологии метаболическая активность митохондрий достоверно снижается на 29% относительно контрольной группы. Включение в состав диеты животных основных субстратов цикла Кребса, обладающих антиоксидантными свойствами, приводит к коррекции энергетического статуса. Энергообмен в клетках леченых животных достоверно возрастает на 42-50% относительно модельной группы с индуцированной патологией. При этом видно, что применение смеси лимонной и янтарной кислот в дозировках 17 мг/кг способствует сохранению физиологической активности энергообеспечивающих органелл клетки на уровнях, отвечающих норме (контрольные животные).

На рисунке 4 представлены результаты измерения линейных размеров клеток лимфоидного роста.

Рис. 4. Радиус лимфоцитов

Из рисунка 4 видно, что дефицит энергии, выявленный для животных модельной группы (позитивный контроль), сказывается на морфологических признаках иммунных клеток. Относительно группы негативного контроля радиус клеток у крыс с адьювант-индуцированным аутоиммунным РА оказывается сниженным на 6%, в то время как

профилактика сукцинат-цитратной смесью приводит к сохранению размеров лейкоцитов в пределах нормы и составляет 3,59-3,64 мкм.

Одним из наиболее характерных клинических признаков ревматоидного артрита является симметричное поражение суставов, которое нами отмечено уже на 4-й неделе с момента индукции патологии. К окончанию эксперимента (7-я неделя) выраженность симптоматики неуклонно нарастала. Авторы работы [12] приводят схожие результаты, демонстрирующие воспаление и отек конечностей у крыс в условиях адъювант-индуцированного артрита.

Поскольку воспалительный процесс протекает с гиперактивацией процессов липопероксидации, непосредственное антиоксидантное действие применяемых веществ может быть дополнительно усилено за счет хелатирующей способности янтарной кислоты, которая образует малорастворимые соединения с переходными металлами переменной валентности, присутствующими в биосредах организма:

где Me^{2+} - ионы железа или меди. При этом растворимость сукцината железа составляет 0,36 г/100 мл, а меди – еще меньше: 0,04 г /100 мл. Указанные элементы являются катализаторами разложения перекиси водорода на высокореактивные интермедиаты – гидроксильные радикалы в реакции Фентона:

Реакция Фентона, составляющая основу процессов свободнорадикального биологического окисления в цикле Габера-Вейсса [13], служит движущей силой инициации процессов перекисного окисления липидов, являющих этиологическую основу оксидативного стресса и нарушения нормального функционирования биологических мембран. В этом аспекте можно рассматривать позитивный вклад в профилактический эффект исследуемой смеси органических кислот за счет мембраностабилизирующего действия.

Особого внимания заслуживают данные биохимического и морфологического изучения лейкоцитов животных. Высокая степень корреляции между суммарной

оксигеназной активностью митохондрий лимфоцитов и их радиусом, выявляемая значением $r_{xy}=0,99$, свидетельствует о недостаточности энергетического обеспечения клеток в условиях патологии и, как следствие, снижении пластического обмена в процессе митоза лимфобластов. Это может также сказываться на функциональной активности основных клеток иммунной системы, обеспечивающих гуморальный и клеточный иммунитет. Коррекция патологических изменений с помощью смеси лимонной и янтарной кислот благоприятствует поддержанию метаболической активности АТФ-продуцирующих органоидов на уровне животных контрольной группы и проявляется сохранением размеров клеток в диапазоне физиологической нормы.

Заключение

Применение цитрат-сукцинатной смеси обеспечивает сохранение морфофункциональных свойств лимфоцитов и способствует устранению некоторых патологических изменений вследствие адьювант-индуцированного ревматоидного артрита, что определяет целесообразность включения указанных компонентов в состав комплексной профилактики патологии соединительной ткани.

Список литературы

1. Silman A.J., Pearson J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002. Vol. 4. P. 265-272. DOI: 10.1186/ar578.
2. Murata K., Ito H., Hashimoto M., Nishitani K., Murakami K., Tanaka M., Yamamoto W., Mimori T., Matsuda S. Elderly onset of early rheumatoid arthritis is a risk factor for bone erosions, refractory to treatment: KURAMA cohort. *Int J Rheum Dis.* 2019. Vol. 22 (6). P. 1084-1093. DOI: 10.1111/1756-185X.13428.
3. Osiri M., Maetzel A., Tugwell P. The economic burden of rheumatoid arthritis in a developingnation: results from a one-year prospective cohort study in Thailand. *J Rheumatol.* 2007. Vol. 34 (1). P. 57-63.
4. Hu H., Luan L., Yang K., Li S.C. Burden of rheumatoid arthritis from a societal perspective: A prevalence-based study on cost of this illness for patients in China. *Int J Rheum Dis.* 2018. Vol. 21 (8). P. 1572-1580. DOI: 10.1111/1756-185X.13028.
5. Lundkvist J., Kastäng F., Kobelt G. The burden of rheumatoid arthritis and access to treatment: health burden and costs. *Eur J Health Econ.* 2008. Suppl 2. P. 49-60. DOI: 10.1007/s10198-007-0088-8.

6. Каратеев Д.Е., Лучихина Е.Л. Современные принципы ведения больных с ревматоидным артритом // Медицинский Совет. 2017. Т. 17. С. 92-100. DOI: 10.21518/2079-701X-2017-17-92-100.
7. Насонов Е.Л., Лиля А.М., Галушко Е.А., Амирджанова В.Н. Стратегия развития ревматологии: от научных достижений к практическому здравоохранению // Научно-практическая ревматология. 2017. Т. 55 (4). С. 339-343. DOI: 10.14412/1995-4484-2017-339-343.
8. Hussain T., Tan B., Yin Y., Blachier F., Tossou M.C., Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. P. 7432797. DOI: 10.1155/2016/7432797.
9. Choudhury G., MacNee W. Role of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathology of Ageing in COPD: Potential Therapeutic Interventions. *COPD.* 2017. Vol. 14 (1). P. 122-135. DOI: 10.1080/15412555.2016.1214948.
10. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И. Цитобioхимический способ определения активности сукцинатдегидрогеназы, окисления эндогенной янтарной кислоты, сигнального действия микромолярных концентраций янтарной кислоты, его применение для количественной оценки уровня адренергической регуляции в организме, среда и набор для осуществления // Патент РФ № 2364868. Патентообладатель Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), Кондрашова Мария Николаевна. Открытое акционерное общество «Диод»; опубликовано 20.08.2009.
11. Apostólico J. de S., Lunardelli V.A., Coirada F.C., Boscardin S.B., Rosa D.S. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J. Immunol Res.* 2016. P. 1459394. DOI: 10.1155/2016/1459394.
12. Abdel El-Gaphar O.A.M., Abo-Youssef A.M., Abo-Saif A.A. Effect of Losartan in Complete Freund's Adjuvant -Induced Arthritis in Rats. *Iran J. Pharm Res.* 2018. Vol. 17 (4). P. 1420-1430.
13. Xu D., Liu D., Wang B., et al. In Situ OH Generation from O_2^- and H_2O_2 Plays a Critical Role in Plasma-Induced Cell Death. *PLoS One.* 2015. Vol. 10 (6). e0128205. DOI: 10.1371/journal.pone.0128205.