

## КОРРИГИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ СМЕСИ ЛИМОННОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТ В МОДЕЛИ ИНДУЦИРОВАННОГО АУТОИММУННОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА У КРЫС

Бадтиев А.К., Скупневский С.В., Пухаева Е.Г., 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*

Вовлеченность широких слоев населения (от 5 до 10%) в патологию аутоиммунных заболеваний, включающих в себя более 100 нозологических форм, определяет актуальность поиска эффективных и безопасных методов коррекции клинических признаков нарушений здоровья населения. Целью работы являлось изучение эффективности коррекции патологических нарушений смесью лимонной и янтарной кислот в модели адьювантного аутоиммунного ревматоидного артрита у крыс. Согласно полученным результатам, позитивный эффект от применения смеси лимонной и янтарной кислот обеспечивается контролируемым увеличением процессов перекисного окисления липидов, способствующих выработке компонентов гуморального иммунитета, активацией ферментного звена антиоксидантной защиты, снижением дегенеративных изменений в суставном аппарате и, как следствие, увеличением двигательной активности животных. Достоверное увеличение содержания в крови леченых животных гидроперекисей на 13% (относительно группы с модельной патологией) скомпенсировано ростом каталазы на 7% ( $p < 0,01$ ), что служит позитивным диагностическим признаком. На фоне коррекции смесью органических кислот у подопытных животных снижалась отечность в синовиальной оболочке, сохранялась гистоархитектоника надхрящницы, гиалинового хряща и субхондральной кости. Позитивные изменения выражались также в виде дозозависимой нормализации поведенческих (актометрических) реакций в модели «открытое поле» – на 30-40% ( $p < 0,05$  относительно группы с модельной патологией). Включение доступных, действенных и безопасных антиоксидантов в схемы профилактики и лечения может способствовать значительному улучшению эффективности терапии аутоиммунных заболеваний, и в частности ревматоидного артрита (РА).

Ключевые слова: адьювант Фрейнда, адьювантная терапия, аутоиммунный ревматоидный артрит, лимфоциты, митохондрии, профилактика ревматоидного артрита, сукцинатдегидрогеназа.

## CORRECTIVE EFFECT OF CITRIC AND SUCCINIC ACIDS MIXTURE IN MODEL OF INDUCED AUTOIMMUNE RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS

Badtiev A.K., Skupnevskiy S.V., Pukhaeva E.G., 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 involvement of the General population – 5- 10% in the pathology of autoimmune diseases, which include more than 100 nosological forms, determines the relevance of the search for effective and safe methods for correcting clinical signs of public health disorders. The aim was to study the effectiveness of pathological disorders correction with a mixture of citric and succinic acids in a model of adjuvant autoimmune rheumatoid arthritis in rats. According to the results obtained, the positive effect of using a mixture of citric and succinic acids is provided by a controlled increase in the processes of lipid peroxidation that contribute to the development of humoral immunity components, activation of the enzyme link of antioxidant protection, reduction of degenerative changes in the articular apparatus and, as a result, an increase in the motor activity of animals. A significant increase in the blood content of hydroperoxides in treated animals by 13% (relative to the group with model pathology) compensated by a 7% increase in catalase ( $p < 0.01$ ). Against the background of correction with a mixture of organic acids in experimental animals, edema in the synovial membrane decreased, and the histoarchitectonics of the supra-cartilage, hyaline cartilage, and subchondral bone were preserved. Positive changes at the tissue level were detected in the form of dose-dependent normalization of behavioral (actometric) responses. The inclusion of affordable, effective and safe antioxidants in prevention and treatment regimens can significantly improve the effectiveness of treatment for autoimmune diseases and, in particular, rheumatoid arthritis.

Keywords: Freund's adjuvant, adjuvant therapy, autoimmune rheumatoid arthritis, lymphocytes, mitochondria, prevention of rheumatoid arthritis, succinate dehydrogenase.

Аутоиммунные заболевания представлены в современной популяции более чем 100 нозологическими формами и затрагивают порядка 8% жителей планеты [1]. Среди системных аутоиммунных патологий наиболее распространены ревматические заболевания, имеющие в основе этиопатогенеза сочетание генетически детерминированных и приобретенных дефектов иммунорегуляторных механизмов [2]. Патологический процесс обусловлен нарушением толерантности и развитием иммунного ответа на аутоиммунные антитела, размножением эффекторных Т-клонов, распознающих собственные антигены и инициирующих воспаление в отдельном органе или системе организма [3]. Сложность молекулярно-клеточных механизмов, лежащих в основе аутоиммунитета, обуславливает проблемность поиска и изучения новых эффективных методов лечения аутоиммунных заболеваний.

Современные схемы лечения основаны на использовании глюкокортикоидных гормонов, алкилирующих цитостатиков, иммуносупрессоров и экстракорпоральных (иммуносорбция и др.) способов терапии. К числу существенных недостатков базисных методов фармакотерапии относятся множественные побочные эффекты, связанные с развитием тяжелых осложнений, таких как синдром Иценко-Кушинга, нарушения водно-минерального обмена, стероидный диабет или стероидные язвы желудка и кишечника, психические расстройства и др. [4]. Это побуждает к непрерывному поиску новых способов коррекции нарушений здоровья – в первую очередь с помощью инновационных генетически модифицированных биологических препаратов – продуктов фарминг-технологий [5]. При этом вопросы, связанные с эффективной профилактикой и поиском адъювантных средств, снижающих токсичность препаратов базисной терапии, также сохраняют свою актуальность.

Целью работы являлось изучение эффективности коррекции патологических нарушений смесью лимонной и янтарной кислот в модели адъювантного аутоиммунного ревматоидного артрита у крыс.

**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 CO<sub>2</sub>-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 массы тела (м.т.). 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 м.т. Животным третьей и четвертой групп (по 8 животных в каждой) на фоне индуцированной патологии (0,1 мл на 200 г м.т. 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 м.т. По окончании эксперимента у животных под наркозом из сердца отбирали кровь, которую стабилизировали гепарином. После центрифугирования в отмытых холодным (t=4 °C) изотоническим раствором эритроцитах изучали активность каталазы по стандартной методике, основанной на спектрофотометрическом измерении кинетики распада перекиси водорода при длине волны 230 нм (Т. Beutler, [6]). В плазме определяли содержание гидроперекисей по Гаврилову, используя киты фирмы ООО «Агат-Мед» (Россия).

Двигательную активность животных измеряли по числу пересеченных квадратов в стандартной установке тест-системы «Открытое поле» производства ООО «НПК Открытая наука» (Россия). Видеорегистрацию поведения животных (3 мин.) осуществляли с помощью цифровой системы, подключенной к компьютеру по интерфейсу GigE Vision; полученные видеофайлы обрабатывали в программе RealTimer.

Для гистологических исследований у животных извлекали бедренную и берцовые кости, объектом исследования служил коленный сустав. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, срезы окрашивали раствором гематоксилин-эозина. Микроскопию проводили при увеличении 10x10 и 10x40.

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Стьюдента в программе Excel, входящей в пакет Microsoft Office 2016. Рассчитывали среднее (M) и стандартную ошибку среднего ( $\pm m$ ). Первичные данные оценивали по критерию Шапиро-Уилка на нормальность распределения. Все четыре выборки соответствовали нормальному распределению случайных величин и использовались для проверки равенства средних значений в двух сравниваемых выборках (позитивный и негативный контроли; группы леченых животных с позитивным контролем). Статистически значимыми считали значения  $p < 0,05$ .

## **Результаты**

Введение крысам адьюванта Фрейнда приводит к формированию аутоиммунного ревматоидного артрита, характеризующегося хроническим характером течения. На первой стадии заболевания протекает через фазу острого периартикулярного воспаления, в дальнейшем патологические изменения затрагивают и костную ткань [7]. Поскольку воспалительный процесс приводит к дисбалансу в системе перекисного окисления липидов (ПОЛ) [8], контроль первичных продуктов липопероксидации – гидроперекисей отражает динамику изменений в условиях модельной патологии (позитивный контроль) и ее коррекции антиоксидантами в виде лимонной и янтарной кислот (рис. 1).

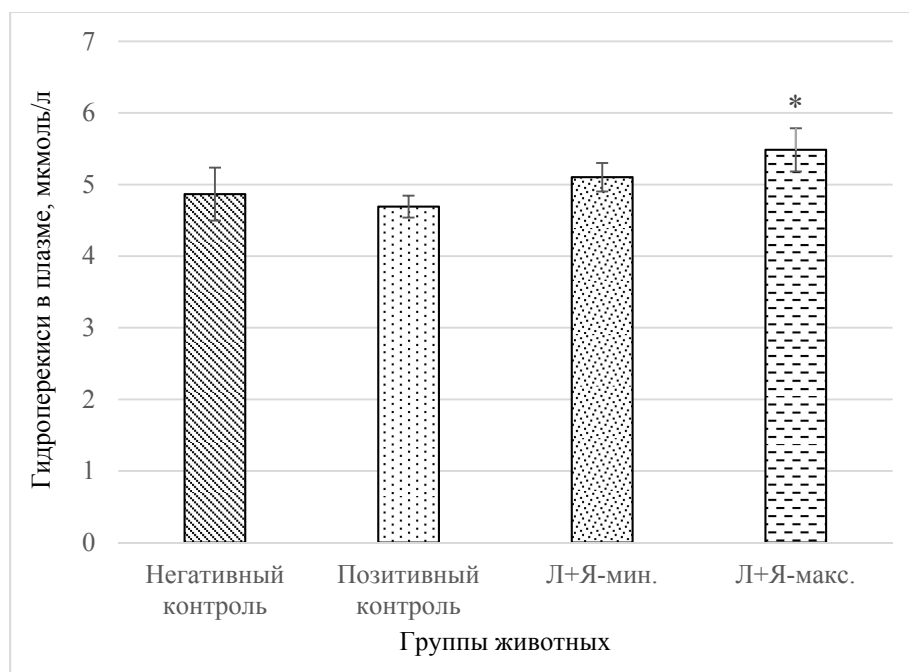


Рис. 1. Содержание гидроперекисей в плазме крови животных в условиях модельного аутоиммунного РА (\*- $p < 0,05$  относительно группы позитивного контроля; «Л+Я» - смесь лимонной и янтарной кислот в минимальной и максимальной дозировках, соответственно)

Из рисунка 1 видно, что к седьмой неделе с момента начала формирования патологии у животных, соответствующей четвертой стадии заболевания у людей, концентрация гидроперекисей у крыс с индуцированным РА достоверно и незначительно снижена (на 4% относительно группы негативного контроля). Коррекция антиоксидантного статуса смесью органических кислот приводит к достоверному дозозависимому повышению гидроперекисей в третьей и четвертой группах на 5-13% ( $p=0,04$  для четвертой группы). Учитывая то обстоятельство, что данные показатели находятся в пределах физиологической нормы, выявленная закономерность может служить позитивным диагностическим признаком, свидетельствующим о поддержании на высоком уровне синтеза простагландинов, лейкотриенов и др. биологически активных компонентов системы комплемента [9].

Реактивность ферментного звена антиоксидантной системы защиты организма представлена на рис. 2.

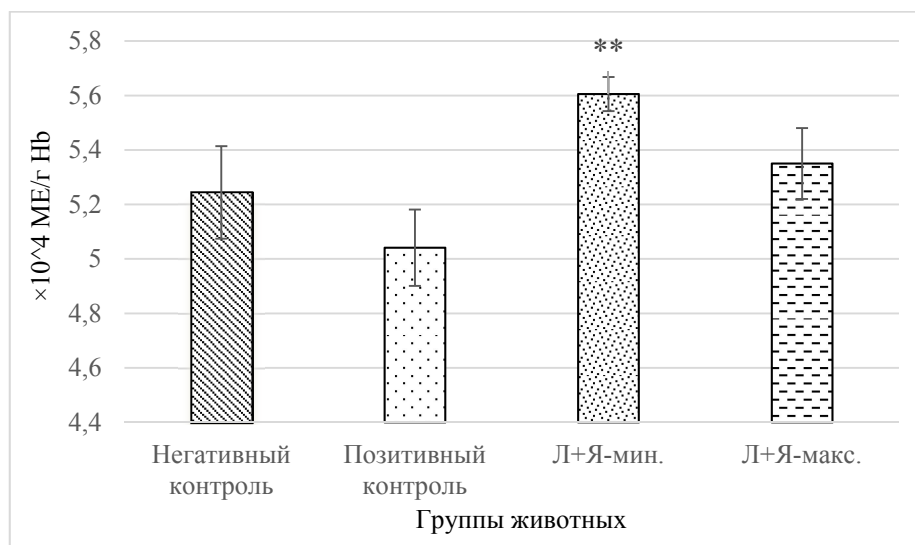
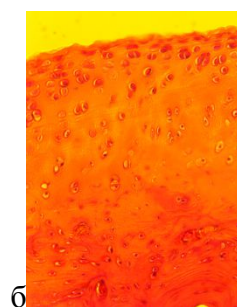
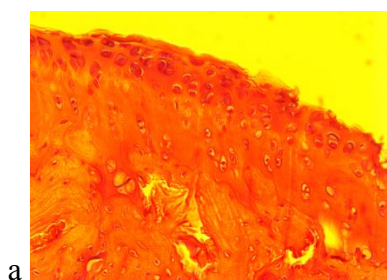
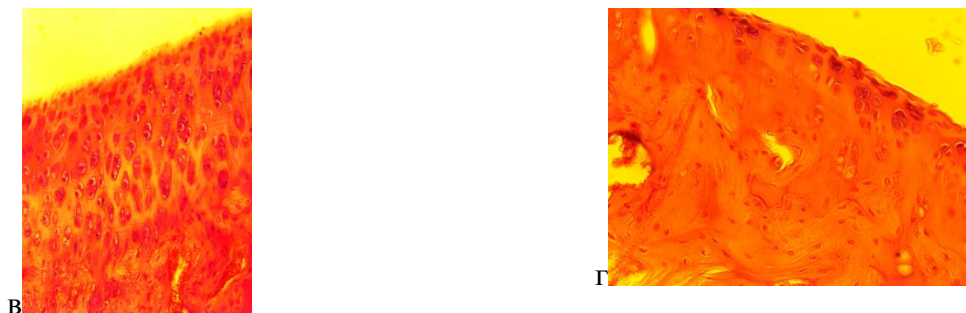


Рис. 2. Активность каталазы (\*\*- $p < 0,01$  относительно группы позитивного контроля; обозначения см. на рис. 1)

Результаты, представленные на диаграмме, свидетельствуют о снижении ферментативной активности в отношении токсичной эндогенной перекиси водорода у животных с модельным ревматоидным артритом на 4%. Уменьшение рисков инициации ПОЛ по реакции Фентона и развития окислительного стресса у крыс с антиоксидантной профилактикой демонстрируется двумя правыми столбцами на диаграмме: введение 17 мг/кг веса антиоксидантов приводит к достоверному росту ( $p=0,007$ ) активности каталазы на 7% относительно животных, составивших группу позитивного контроля.

Позитивные изменения на молекулярном уровне в условиях антиоксидантной модификации аутоиммунных нарушений проявились сохранением суставного аппарата у леченых животных (рис. 3).



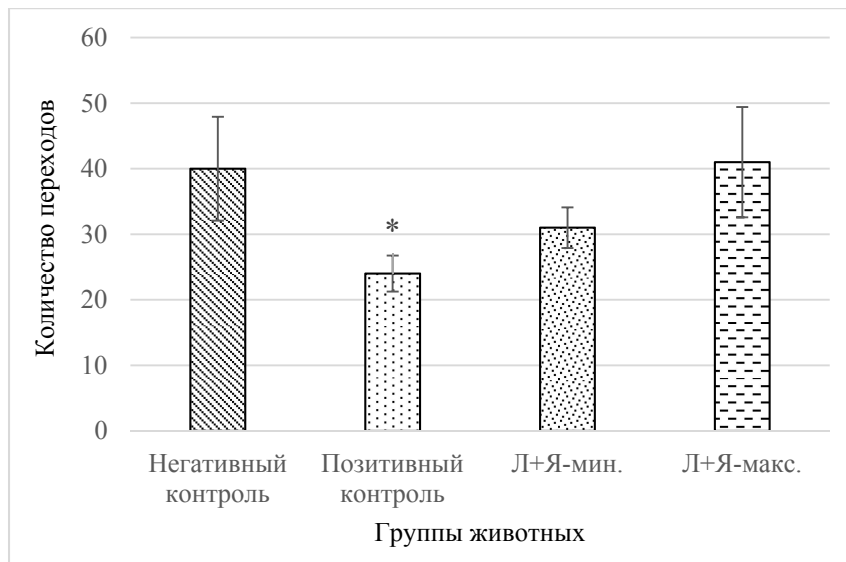


*Рис. 3. Морфология коленного сустава животных: а – негативный контроль; б – позитивный контроль; в, г – коррекция органическими кислотами в дозировках 17 и 88 мг/кг веса соответственно*

У всех животных модельной группы (3б) прослеживались изменения суставного аппарата различной степени тяжести. В синовиальной оболочке отмечалась пролиферация синовиоцитов, гиперплазия, отечность и утолщение слоев, в строме – очаги периваскулярного инфильтрата, представленного преимущественно лимфоцитами. Морфологическая картина надхрящницы свидетельствует о признаках дезорганизации соединительной ткани в виде истончения и разволокнения как наружного слоя рыхлой волокнистой соединительной ткани с умеренно выраженным периваскулярным отеком и единичными лимфоцитами в сосудистой стенке, фокусами кровоизлияний, так и внутреннего слоя с относительным уменьшением клеточного состава.

У животных, получавших в рационе смесь лимонной и янтарной кислот, патологические изменения выражены значительно слабее (3 в, г). Степень пролиферации синовиоцитов близка к норме (контрольным животным), покровный и коллагено-эластический слои синовиальной мембраны без видимых признаков гиперплазии, однако в отдельных местах у некоторых животных слои сливаются вместе и истончаются. Глубоко расположенные хондроциты имеют округлую форму и лежат в виде правильных вертикальных рядов. Хондроциты, расположенные поверхностно, имеют как овальную (веретенообразную), так и уплощенную форму и чаще не образуют групп. Гистоархитектоника у животных контрольной группы (3а) без видимых признаков патологических изменений.

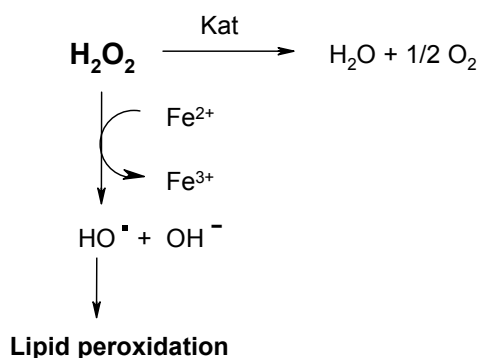
На организменном уровне эффективность введения животным веществ с восстановительным потенциалом проявилась увеличением двигательной активности в тест-системе «открытое поле» (рис. 4).



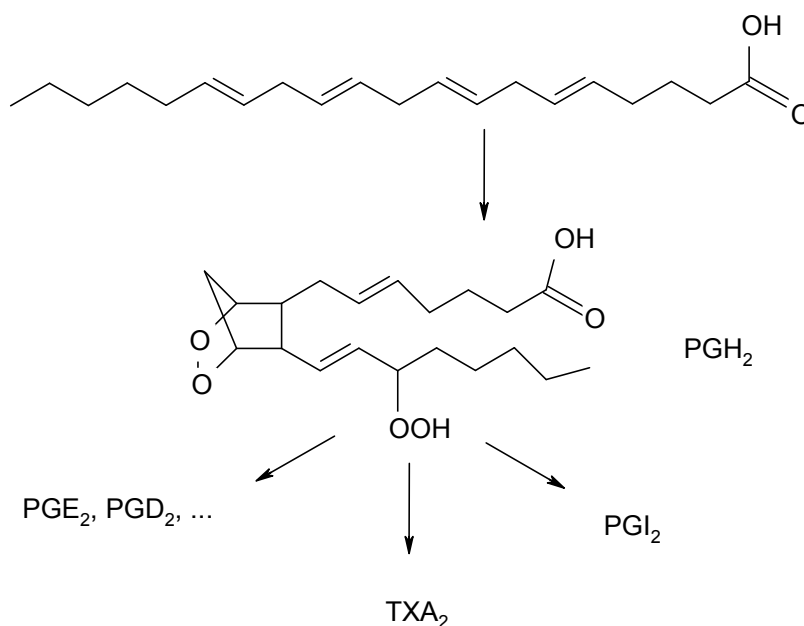
*Рис. 4. Количество пересеченных секторов за период наблюдения 3 мин. (обозначения см. на рис. 1)*

Из рисунка 4 видно, что протективный эффект исследуемых препаратов в отношении диартрозов проявился и на общей подвижности грызунов. Достоверные отличия между животными негативного и позитивного контроля выявляют характерные клинические признаки, свойственные для РА: болевой синдром, скованность и др., влияющие на поведение животных. Количество переходов между отдельными секторами в модельной группе снижается на 40% ( $p=0,046$ ), в то время как защитное действие кислот способствует дозозависимому купированию патологических признаков. Характерным является то обстоятельство, что у животных с максимальной дозировкой число пересеченных секторов совпадает с животными контрольной группы и составляет  $41 \pm 8,4$  и  $40 \pm 7,9$  соответственно.

Хронический характер многих системных заболеваний, к числу которых относится РА, сопровождается нарушением энергетического и пластического обмена в организме [10]. В этой связи введение в рацион основных субстратов цикла трикарбоновых кислот – лимонной и янтарной - способствует нормализации не только процессов катаболизма, но и антиоксидантного статуса, нарушение которого является неизбежным следствием воспалительного процесса, являющего патогенетическую основу аутоиммунных заболеваний. Согласно полученным результатам, профилактика сукцинат-цитратной смесью способствует достоверному повышению активности каталазы, что служит маркером снижения рисков эндогенной интоксикации за счет накопления активных форм кислорода [11]. В их числе наибольшую опасность окисления биологических субстратов представляют гидроксильные радикалы:



Последние, как следует из схемы, являются инициаторами процессов перекисного окисления липидов. Переокисление биологических мембран может приводить к ложно заниженным диагностическим показателям по отдельным продуктам ПОЛ. В этой связи контролируемый процесс генерации гидроперекисей, отмеченный у животных с антиоксидантами в режиме «доза - эффект» на фоне животных позитивного контроля, может служить признаком компенсаторной выработки медиаторов воспаления – простагландинов (PG), тромбоксанов (ТХА) и простациклинов (ТGI):



Дилатирующий эффект простагландинов, сочетанный со снижением образования и накопления гистамина и лимфокинов, может способствовать модификации воспалительного процесса. Это в свою очередь могло позитивно проявиться на клинике эрозивно-деструктивного полиартрита, развивающегося при аутоиммунных заболеваниях. Так, у животных с модельным адьювант-индуцированным РА, характеризующимся дегенеративными изменениями гиалинового хряща коленного сустава в виде истончения поверхностного слоя молодых хондроцитов, варьирующего от слабой до умеренной степени, очаговыми кровоизлияниями, ткани животных леченых групп сохраняют правильное строение. В промежуточной зоне хондроциты представлены изогенными группами, клетки округлой



формы, ядра не увеличены. Признаков дистрофических изменений в субхондральной кости леченых животных также не отмечено.

Объективным проявлением корригирующего эффекта явилось дозозависимое повышение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных, выявленное в модели «открытое поле». Сохранение на уровне контроля (негативного) количества двигательных актов у животных, получавших максимальную дозировку протекторов, свидетельствует о значительном облегчении симптомов и проявлений ревматоидного артрита.

### **Заключение**

Комплексный подход к оценке профилактического действия смеси лимонной и янтарной кислот, включающий в себя результаты биохимических, гистологических и поведенческих исследований, позволяет рекомендовать эффективные и безопасные препараты в качестве иммуномодуляторов при аутоиммунных заболеваниях.

### **Список литературы**

1. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Новиков А.А. Аутоиммунные ревматические заболевания: итоги и перспективы научных исследований // Научно-практическая ревматология. 2015. Т. 53 (3). С. 230-237. DOI: 10.14412/1995-4484-2015-230-237.
2. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Новиков А.А. Аутоиммунные ревматические заболевания – проблемы иммунопатологии и персонализированной терапии // Вестник Российской Академии медицинских наук. 2015. № 2. С. 169-182.
3. Lemke H. Immune Response Regulation by Antigen Receptors' Clone-Specific Nonsel Part. Front Immunol. 2018. Vol. 9. P. 1471. DOI:10.3389/fimmu.2018.01471.
4. Yasir M., Goyal A., Bansal P., Sonthalia S. Corticosteroid Adverse Effects. In: Stat Pearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing. 2020. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462> (дата обращения 15.12.2020).
5. Мазуров В.И., Трофимов Е.А. Инновационные методы лечения системных аутоиммунных заболеваний // Вестник РАМН. 2015. Т. 70 (2). С. 165–168. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1309.
6. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л. А. Даниловой. СПб.: Питер, 2003. 736 с.
7. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. J. Leukoc Biol. 2001. Vol. 70 (6). P. 849-60.

8. Biswas S.K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. 5698931. DOI: 10.1155/2016/5698931.
9. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. 360438. DOI: 10.1155/2014/360438.
10. Wang H., Ye J. Regulation of energy balance by inflammation: common theme in physiology and pathology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2015. Vol. 16 (1). P. 47-54. DOI: 10.1007/s11154-014-9306-8.
11. Безручко Н.В., Рубцов Г.К., Ганяева Н.Б. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза // *Вестник Томского государственного педагогического университета.* 2012. Т. 7. С. 94-98.