

МОДИФИЦИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ ПРИРОДНОЙ МИНЕРАЛЬНОЙ ВОДЫ «ТИБ-1» В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОГО АУТОИММУННОГО РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА У КРЫС

Скупневский С.В.

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

Ревматоидный артрит (РА) является одной из ведущих нозологий среди аутоиммунных заболеваний и приводит к ранней инвалидизации населения. Существующие комплексные схемы лечения не всегда способствуют достижению стойкой ремиссии, ввиду чего поиск эффективных и безопасных методов адъювантной терапии остается актуальным. Цель – экспериментальное изучение корригирующего эффекта минеральной воды Тиб-1 в модели индуцированного аутоиммунного ревматоидного артрита. Крысы линии *Wistar* были разделены на группы негативного контроля (введение растворителей), модельной патологии РА (субкутанное введение полного адьюванта Фрейнда (АФ)) и опытные (коррекция клинических признаков РА минеральной водой Тиб-1, разведенной в соотношении 1:3, – первые 2 недели эксперимента (1,57 мл/кг массы тела)). Общий анализ крови осуществляли на 3-й и 7-й неделях, после чего проводили морфологические исследования коленных суставов. Формирование РА сопровождалось воспалительным процессом и ростом лейкоцитов у модельных животных к 3-й и 7-й неделям на 65% и 43% соответственно (относительно контроля, $p < 0,001$); сдвигом в лейкоцитарной формуле: относительный лимфоцитоз на фоне нейтропении. У крыс фиксировалась отечность конечностей. В коленном суставе среди дегенеративных изменений различной степени тяжести преобладали: пролиферация синовиоцитов, гиперплазия тканей. Выявлены очаги лимфоцитарного периваскулярного инфильтрата. Для надхрящницы характерными явились истончение и частичное разволокнение наружного слоя соединительной ткани. На фоне приема Тиб-1 отмечено снижение воспаления в острой фазе (3-я неделя), проявляемое достоверным 41%-ным снижением лейкоцитов относительно модельной группы. Гистоархитектоника соединительной ткани у животных опытной группы имела менее выраженные дегенеративные изменения, что сопровождалось уменьшением или полным нивелированием местных отеков. Корригирующий эффект Тиб-1 может быть обусловлен активацией выделительных систем организма, улучшением обменных процессов, нормализацией баланса окислительно-восстановительных процессов, что отмечено в научной литературе для воды схожего минерального состава. Применение минеральной воды Тиб-1 приводит к снижению воспалительного процесса, способствует сохранению гистоархитектоники тканей, что обуславливает ее использование в качестве эффективного вспомогательного метода при лечении и профилактике заболеваний соединительной ткани.

Ключевые слова: аутоиммунные патологии, бальнеотерапия, дегенеративные изменения хряща, минеральная вода, ревматоидный артрит, синовиальная оболочка, соединительная ткань.

MODIFYING EFFECT OF NATURAL MINERAL WATER «TIB-1» BY INDUCED AUTOIMMUNE RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS

Skupnevskiy S.V.

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

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune disease that leads to progressive disability. Current treatment guidelines do not always contribute to achievement of stable remission, therefore the search for effective and safe methods of adjuvant therapy is actual. The objective was to study corrective effect of Tib-1 mineral water used experimental animal model of autoimmune RA. *Wistar* rats were divided into negative control groups (administration of solvents), model of RA (subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant), and experimental group (correction of medical symptoms of RA with mineral water Tib-1, diluted 1: 3 – during the two weeks since the beginning of the experiment (1.57 ml / kg of body weight)). A complete blood count was performed at the 3rd and 7th weeks, then morphological studies of the knee joints were carried out. The formation of RA was accompanied by an inflammatory process and rapid increase in the white blood cell counts in model animals by the 3rd and 7th weeks by 65% and 43%, respectively (relative to control, $p < 0.001$); a change of neutrophil-lymphocyte count ratio (lymphocytosis). A swelling of limbs was observed in rats. Among the degenerative changes in the knee joint prevailed: proliferation of synoviocytes, tissue hyperplasia varying degrees of severity. The foci of lymphocytic perivascular infiltrate were revealed. The perichondrium was characterized

by a thinning and partial dissociation of the outer layer of connective tissue. On the background of taking Tib-1, there was a decrease in inflammation in the acute phase (3rd week), manifested by a significant decrease in leukocytes relative to the model group – by 41%. The number of platelets was also reduced by 15%, $p=0.043$. The histoarchitectonics of connective tissue in animals of the experimental group had less pronounced degenerative changes, which was accompanied by a decrease or complete leveling of local edema. The corrective effect of Tib-1 may be due to the activation of the body's excretory systems, improvement of metabolic processes, normalization of the redox balance, which is noted in the scientific literature for water of similar mineral composition. The use of Tib-1 mineral water leads to a decrease in the inflammatory process, contributes to the preservation of tissue histoarchitectonics, which can be used as an effective auxiliary method in the treatment and prevention of connective tissue diseases.

Keywords: autoimmune pathologies, balneotherapy, connective tissue, degenerative changes in cartilage, mineral water, rheumatoid arthritis, synovium.

Ревматоидный артрит относится к числу хронических системных аутоиммунных заболеваний, имеющих выраженную гендерную и возрастную структуру (отношение женщины: мужчины составляет 3:1 [1]; коэффициент детерминации (R^2) в моделях «возраст – риск» 0,87–0,97 [2]). Заболевание характеризуется прогрессирующей инвалидностью и преждевременной смертностью. Проведение статистических исследований в глобальном масштабе позволило выявить, что по общему среднегодовому стандартизованному показателю заболеваемости РА имеет отчетливую тенденцию к росту: с 1990 по 2017 гг. на 7,4% [3].

Несмотря на высокие достижения современной фармакологии, лекарственных средств, излечивающих РА, к настоящему времени не существует и основное лечение базируется на использовании метотрексата и нестероидных противовоспалительных препаратов [4, 5], имеющих множество побочных эффектов. Поэтому ведутся активные исследования по поиску эффективных и безопасных средств адъювантной терапии, в числе которых находятся методы бальнеотерапии. Так, в работах отечественных исследователей [6, 7] отмечается, что после пребывания детей с ювенильным РА в условиях санаторно-курортного лечения, включающего использование лечебного фактора в виде хлоридных натриевых ванн, у пациентов выравниваются до нормы показатели клинико-лабораторных исследований, а сам подход может с успехом дополнять классические схемы лечения. В связи с этим представляется целесообразным научное обоснование терапевтического эффекта природной минеральной воды Тиб-1.

Цель работы – изучение корригирующего эффекта природной минеральной воды Тиб-1 в модели адъювант-индуцированного аутоиммунного ревматоидного артрита в эксперименте.

Материалы и методы исследования

В работе с лабораторными животными придерживались правил и этических норм содержания и ухода, описанных в руководстве National Research Council, 2011 г. и ГОСТ

P53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН.

Эксперимент проводился на белых крысах линии *Wistar* (самцы с массой тела (м.т.) 400–440 г), разделенных на 3 равные группы по 8 животных в каждой. Первая группа – негативный контроль, животные получали растворители по схеме и в объемах, как у животных модельной и опытной групп. Вторая группа – с модельным аутоиммунным ревматоидным артритом, вызванным субкутанным введением полного адьюванта Фрейнда DIFCO LABORATORIES (Detroit, Michigan, США) из расчета 0,1 мл на 200 г массы тела в заднюю конечность животного. Третья группа – опытные животные с коррекцией РА (формируемого по той же схеме, что и во второй группе) природной минеральной водой Тиб-1, которую дегазировали, разводили дистиллированной водой в соотношении 1:3 (по объему) и заливали в поилку. Свободный доступ к воде у животных осуществлялся на протяжении первых 2 недель с момента индукции РА, после чего вода заменялась на обычную водопроводную и животные содержались еще в течение 5 недель на стандартном корме и в стандартных условиях вивария. Мониторинг объема выпитой минеральной воды показал, что животные употребляли в среднем в пересчете на неразбавленную Тиб-1 1,57 мл на 1 кг м.т.

Забор крови для клинико-лабораторных исследований осуществляли на 3-й и 7-й неделях, для чего животных усыпляли (внутрибрюшинное введение раствора золетила, Франция) и из сердца отбирали кровь. В стабилизированной антикоагулянтом цельной крови определяли гематологические показатели на автоматическом анализаторе Mythic 22 (Польша). Лейкоцитарную формулу для большей точности подсчитывали микроскопией мазка. СОЭ определяли по Панченкову.

По окончании эксперимента животных усыпляли (СО₂-затравочный бокс) и извлекали коленный сустав, который очищали от мышечных волокон и фиксировали нейтральным 10%-ным раствором формалина. Окраску срезов производили гематоксилин-эозином и анализировали при увеличении на микроскопе 10x10 и 10x40. Задние лапки фотографировали цифровой фотокамерой.

На основании полученных результатов рассчитывали среднее (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm m$). Нормальность распределения случайных величин оценивали по W -критерию Шапиро–Уилка; в случае подтверждения нормальности выборки сравнение гипотез осуществлялось по t -критерию Стьюдента. В противном случае расчеты вели по U -критерию Манна–Уитни. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Введение животным АФ, представляющего собой тип эмульсии «вода в масле», содержащей термически инактивированные *M. tuberculosis*, сопровождается выраженным иммунным ответом и увеличением лейкоцитов в крови (табл. 1).

Таблица 1

Лейкограмма и СОЭ экспериментальных животных с модельным аутоиммунным ревматоидным артритом

Анализируемый параметр	Стат. показатели	Нег. контроль		Модель РА		Модель РА+ТиБ-1	
		3 недели	7 недель	3 недели	7 недель	3 недели	7 недель
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	M \pm m	15,78 \pm	13,68 \pm	26,12 \pm	19,59 \pm	15,40 \pm	20,28 \pm
		4,27	0,86	2,66**	1,40***	1,18 ^{##U}	2,33
П/я нейтрофилы, %	M \pm m	2,63 \pm	1,50 \pm	1,88 \pm	0,75 \pm	2,25 \pm	2,13 \pm
		0,73	0,42	0,46	0,27	0,45	0,88
С/я нейтрофилы, %	M \pm m	21,63 \pm	25,50 \pm	26,00 \pm	17,89 \pm	37,25 \pm	26,63 \pm
		0,68	1,38	3,59	1,84	3,54 ^{#U}	3,00
Эозинофилы, %	M \pm m	3,38 \pm	3,38 \pm	4,13 \pm	3,13 \pm	2,13 \pm	2,13 \pm
		1,29	0,78	1,53	0,51	0,61	0,65
Лимфоциты, %	M \pm m	69,88 \pm	66,75 \pm	63,75 \pm	76,25 \pm	54,63 \pm	65,00 \pm
		3,81	3,23	3,36	2,30	3,17	2,54 [#]
Моноциты, %	M \pm m	4,00 \pm	5,38 \pm	4,50 \pm	2,00 \pm	3,75 \pm	3,75 \pm
		1,12	0,50	0,68	0,42 ^{**U}	0,86	0,56 [#]
СОЭ, мм/ч	M \pm m	1,50 \pm	1,13 \pm	1,13 \pm	1,38 \pm	1,00 \pm	1,13 \pm
		0,27	0,13	0,13	0,18	0,00	0,13

*, ** – $p < 0,05$ и $0,01$, сравнение контрольных животных с модельными (3-я и 7-я неделя соответственно); #, ## – $p < 0,05$ и $0,01$, сравнение модельных животных с опытными (3-я и 7-я неделя соответственно); ^U – расчет p по критерию Манна–Уитни

Из таблицы 1 видно, что максимальной степени выраженности воспалительный процесс достигает к 3-й неделе после введения масляного адьюванта. Количество клеток белой крови у животных с РА по сравнению с негативным контролем статистически значимо повышается на 65%, выявляя острую фазу индуцированной патологии. К окончанию 7-й недели общее содержание лейкоцитов снижается, но по сравнению с контрольными цифрами остается повышенным на 43% ($p < 0,001$). У животных, получавших минеральную воду в течение первых 2 недель с начала формирования модельной патологии, начало течения менее острое и содержание лейкоцитов относительно модельной группы оказывается сниженным на 41% (3-я неделя). К моменту завершения эксперимента различия в общей численности клеток

белой крови нивелируются, и разница между сравниваемыми группами не превышает 3,5% ($p=0,774$).

Наиболее выраженными сдвигами в лейкоцитарной формуле являются относительные изменения в количестве нейтрофилов и, соответственно, лимфоцитов у животных с РА (табл. 1). Так, если у контрольных крыс вариативность численности нейтрофилов отмечается в пределах 17% (сравнение между 3-й и 7-й неделями), то на фоне сформированной патологии разброс значений оказывается шире: в модельной группе он составляет 45%, при профилактике минеральной водой – 39%. Введение индуктора воспалительного процесса приводит вначале к росту количества нейтрофилов (при сравнении с негативным контролем, 3-я неделя), после чего показатели снижаются до значений контрольной группы. Тем не менее, все отмеченные флуктуации находятся в пределах колебаний нормы.

Примечательным является то обстоятельство, что на фоне выраженного воспалительного процесса, фиксируемого ростом общей численности лейкоцитов, показатель СОЭ остается стабильным у животных модельной и опытной групп (табл. 1).

Другие исследуемые гематологические показатели белой крови колеблются незначительным образом, а выявленные межгрупповые отличия также не выходят за границы нормативных значений.

Развитию РА сопутствует субсиноввиальный отек, оценка степени которого используется в качестве диагностического маркера течения заболевания в эксперименте. На рисунке 1 представлены фотографии задних конечностей крыс, полученные на завершающем этапе исследований.



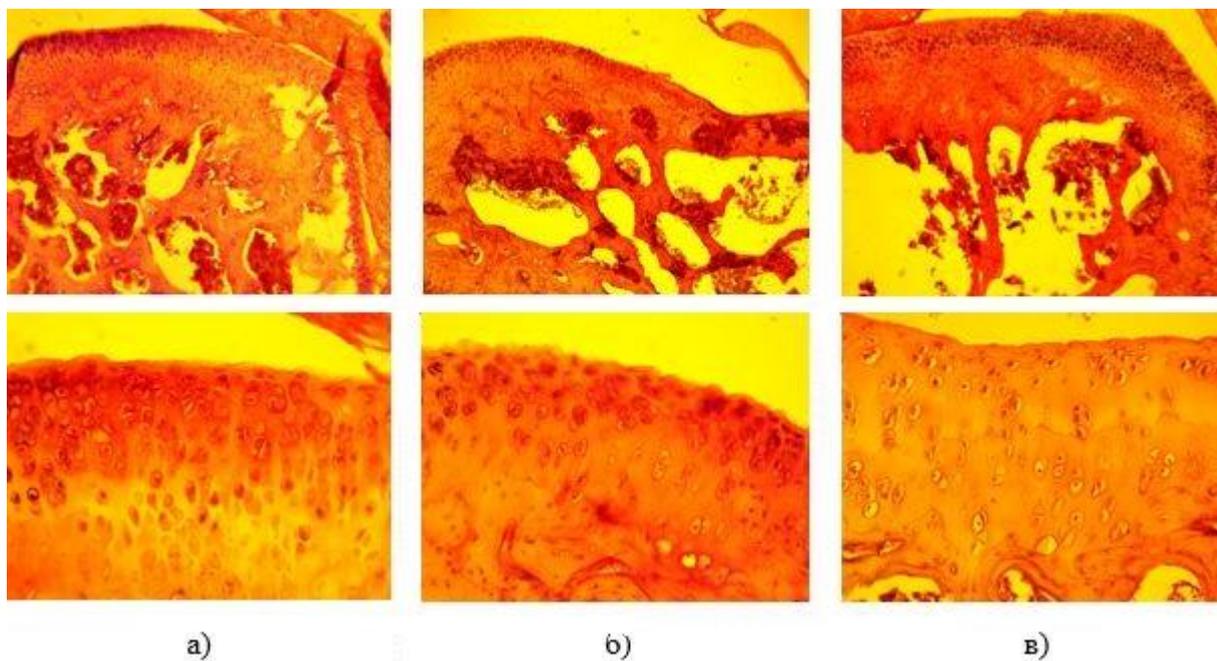
Рис. 1. Фотографии задних лап экспериментальных крыс (7-я неделя):

а – негативный контроль, б – модель РА, в – модель РА+Тиб-1

Из рисунка видно, что результатом системного воспалительного процесса, обусловленного введением АФ, является отечность конечностей (плюсны) у крыс с модельной патологией (рис. 1б). Двухнедельный курс приема минеральной воды способствует заметному

купированию данного клинического признака РА, что проявилось уменьшением или полным нивелированием местных отеков (рис. 1в). Лапы контрольных животных – без патологических признаков отечности (рис. 1а).

Результаты гистологических исследований суставного аппарата представлены на рисунке 2.



*Рис. 2. Морфология коленного сустава лабораторных животных:
а – негативный контроль, б – модель РА, в – модель РА+Тиб-1
(верхний ряд увеличение 10x10, нижний ряд 10x40)*

У всех животных модельной группы (рис. 2б) выявлены дегенеративные изменения сустава различной степени тяжести. Среди характерных признаков синовиальной оболочки следует отметить пролиферацию синовиоцитов, гиперплазию тканей, их отечность, очаги преимущественно лимфоцитарного периваскулярного инфильтрата. Для надхрящницы отмечены признаки дезорганизации соединительной ткани, проявляющиеся истончением и частичным разволокнением фиброзного слоя, а также относительным уменьшением клеточного состава камбиального слоя. Здесь также отмечается умеренно выраженный периваскулярный отек с инфильтрацией единичных лимфоцитов; присутствуют фокусы кровоизлияний. В единичных случаях отмечено истончение костной пластинки.

Для животных, получавших минеральную воду (рис. 2в), картина патологических изменений носит менее выраженный характер. Для тканей синовиальной оболочки также оказываются свойственными признаки гиперплазии и отечности. Покровный и коллагенно-

эластический слой синовиальной мембраны в отдельных местах у некоторых животных сливаются вместе и истончаются. Хондроциты базальной и промежуточной зон имеют округлую форму, образуют изогенные группы и лежат в виде правильных вертикальных рядов. Хондроциты, расположенные в поверхностной зоне, имеют веретенообразную форму и чаще не образуют групп. Признаки разволокнения и истончения внешних слоев перихондрия выражены в меньшей степени в сравнении с животными модельной группы.

Гистоархитектоника соединительной ткани у животных контрольной группы (рис. 3а) – без видимых признаков патологических изменений.

Начиная с 1950-х гг. адьюванты Фрейнда (полный и неполный) являются незаменимыми во многих протоколах испытаний, предполагающих моделирование патологий иммунной системы [8]. Эффект от введения АФ зависит от вида экспериментальных животных и может иметь орган-специфическую направленность [9, 10].

Результатом иммунизации являются высокий уровень циркулирующих антиген-специфических антител, активация Т-лимфоцитов с развитием гиперчувствительности замедленного типа. Следующий за этим сбой иммунной толерантности сопровождается воспалительным процессом, который приводит к развитию аутоиммунного артрита.

На фоне индуцированной патологии комплекс гематологических, клинических и гистологических исследований свидетельствует о модифицирующем действии природной минеральной воды Тиб-1 в отношении наиболее характерных признаков заболевания. Так, снижение воспалительного процесса, особенно проявляющееся в острой фазе (3-я неделя), может быть обусловлено повышением адаптивных резервов организма за счет восстановления баланса между процессами перекисного окисления липидов и антиоксидантной системой, активации детоксикационной и выводящей систем, что было выявлено авторами исследования [11] в условиях экспериментальной патологии органов пищеварения в отношении минеральной воды схожего с Тиб-1 химического состава.

В патенте [12] лечение заболеваний опорно-двигательной системы достигается за счет использования бальнеологических процедур, включающих применение пенно-минерально-вихревых ванн из сульфатно-хлоридных натриевых природно-минеральных вод. Как отмечают авторы, лечебный эффект достигается за счет транскутанной резорбции микроэлементов, входящих в состав минеральной воды и способствующих нормализации обменных процессов в организме, ускорению процессов репарации, иммуномодуляции и нормализации гормонального фона. Пользуясь общепринятым в курортологии и фармакологии принципом «по аналогии», логично предположить, что восстановительный эффект исследуемой природной воды может быть обусловлен биологическими свойствами микроэлементов, в первую очередь – кальция, играющего ключевую роль в обменных,

энергетических и пластических процессах организма и костно-мышечной системы в частности.

Заключение

Введение животным питьевой лечебно-столовой минеральной воды Тиб-1 сопровождается снижением генерализованного воспалительного процесса, сохранением гистоархитектоники суставного хряща, субхондральной кости и снижением степени дистрофических изменений суставного аппарата по сравнению с животными с модельной патологией аутоиммунного ревматоидного артрита, что обосновывает целесообразность использования бальнеологического подхода в качестве эффективного вспомогательного метода при лечении и профилактике заболеваний соединительной ткани.

Список литературы

1. Van Vollenhoven RF. Sex differences in rheumatoid arthritis: more than meets the eye. *BMC Med.* 2009. Vol. 7. P.12. DOI: 10.1186/1741-7015-7-12.
2. Wibetoe G., Sexton J., Ikdahl E., Rollefstad S., Kitas G.D. van Riel P., Gabriel S., Kvien T.K., Douglas K., Sandoo A., Arts E.E., Wållberg-Jonsson S., Dahlqvist S.R., Karpouzas G., Dessein P.H., Tsang L., El-Gabalawy H., Hitchon C.A., Pascual-Ramos V., Contreas-Yañes I., Sfikakis P.P., González-Gay M.A., Colunga-Pedraz I.J., Galarza-Delgado D.A., Azpiri-Lopez J.R., Crowson C.S., Semb A.G. Prediction of cardiovascular events in rheumatoid arthritis using risk age calculations: evaluation of concordance across risk age models. *Arthritis Res Ther.* 2020. Vol. 22. no.1. P. 90. DOI: 10.1186/s13075-020-02178-z.
3. Safiri S., Kolahi A.A., Hoy D., Smith E., Bettampadi D., Mansournia M.A., Almasi-Hashiani A., Ashrafi-Asgarabad A., Moradi-Lakeh M., Qorbani M., Collins G., Woolf A.D., March L., Cross M. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann Rheum Dis.* 2019. Vol. 78. no. 11. P. 1463-1471. DOI: 10.1136/annrheumdis-2019-215920.
4. Чичасова Н.В. Ревматоидный артрит: проблемы лечения на современном этапе // Современная ревматология. 2018. Т. 12 (4). С. 65–70. DOI: 10.14412/1996-7012-2018-4-65-70.
5. Насонов Е.Л. Фармакотерапия ревматоидного артрита: российские и международные рекомендации // Научно-практическая ревматология. 2016. Т. 54 (5). С. 557-571. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-557-571.
6. Гармаш О.И., Алиев Л.Л., Сколотенко Т С. Влияние санаторно-курортного лечения на некоторые показатели протеолиза у детей с ювенильным ревматоидным артритом,

получавших базисную терапию метотрексатом // Вестник физиотерапии и курортологии. 2016. Т. 4. С. 11-15.

7. Гармаш О.И., Алиев Л.Л., Яваева Т.Б. Изучение индекса протеолитической деструкции, как проявление синдрома эндогенной интоксикации, у детей с ювенильным ревматоидным артритом в процессе санаторно-курортного лечения // Вестник физиотерапии и курортологии. 2013. Том. 3. С. 31-33.

8. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J. Leukoc Biol.* 2001. Vol. 70. no. 6. P. 849-860.

9. Fontes J.A., Barin J.G., Talor M.V., Stickel N., Schaub J., Rose N.R., Čiháková D. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immun Inflamm Dis.* 2017. Vol. 5. no. 2. P. 163-176. DOI: 10.1002/iid3.155.

10. Navarro-Alvarez N., Gonçalves B.M.M., Andrews A.R., Sachs D.H., Huang C.A. A CFA-Induced Model of Inflammatory Skin Disease in Miniature Swine. *Int. J. Inflamm.* 2018. P. 6916920. DOI: 10.1155/2018/6916920.

11. Бабов К.Д., Гуща С.Г., Насибуллин Б.А., Калиниченко Н.В., Балашова И.В., Пузырьова И.В. Влияние маломинерализованной сульфатно-гидрокарбонатно-хлоридной кальциево-натриевой минеральной воды на крыс с экспериментальной патологией органов пищеварения // *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal)*. 2017. Т. 3-1(19). С. 35-41.

12. Старокошко Л.Е., Агранович Н.В., Лапина Л.М., Бондаренко А.А., Еременко М.С. Способ лечения заболеваний опорно-двигательной системы. RU 2586849. Оpubл. 10.06.2016. Бюл. № 16.