

УДК 616-092.18-092.9:616.72-002.77

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИКЕ АУТОИММУННОГО АРТРИТА У КРЫС

^{1,2}Скупневский С.В., ^{2,3}Пухаева Е.Г., ^{2,3}Бадтиев А.К., ²Руруа Ф.К.,
²Батагова Ф.Э., ²Фарниева Ж.Г.

¹ФБУН «Федеральный научный центр гигиены имени Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Мытищи;

²Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ;

³ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», Владикавказ

Ревматоидный артрит относится к хроническим заболеваниям, склонным к прогрессированию. Учитывая молекулярную гетерогенность и сложность клинических проявлений ревматоидного артрита, не до конца раскрытые этиологические причины его возникновения, изучение отдельных механизмов патогенеза данного заболевания продолжает оставаться актуальным для современной медицины. Целью настоящего исследования являлось изучение в динамике функциональных особенностей лимфоцитов крыс в модели адьювантного аутоиммунного артрита. Работа проведена на старых самцах крыс линии Вистар, разделенных на две равные группы, по 8 животных в каждой. Модель формировали введением опытным животным адьюванта Фрейнда. По истечении 1, 3 и 7 недель у крыс стандартным методом подсчитывали общее количество лейкоцитов. Об интенсивности дыхательных процессов в клетках судили по степени активности сукцинатдегидрогеназы, выявляемой цитобихимическим методом. Количество образуемого маркера дыхательной активности митохондрий – диформаза вычисляли при помощи программы Bio Images. Статистическую обработку результатов осуществляли по критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel. Воспалительный процесс протекал волнообразно с максимумом на третьей неделе. Количество лейкоцитов при этом возросло по сравнению с уровнем контрольных значений с 9,8 до 11,3 тыс/мкл, возвращаясь к нормальным показателям к седьмой неделе. Введение адьюванта Фрейнда к окончанию первой недели сопровождалось повышением дыхательной активности клеток на 13%, достигая максимума на 3-й неделе эксперимента – 18%. Достоверные различия с контролем у животных опытных групп получены к 7-й неделе. В это время фиксировался спад образования диформаза, чувствительного индикатора метаболической активности митохондрий, на 31%. Механизмы развития аутоиммунного артрита ассоциированы с гиперактивацией тканевого дыхания в остром периоде заболевания и снижением энергообеспечения клеток в стадии хронизации патологического процесса. Воспалительный процесс протекал волнообразно с максимумом на третьей неделе.

Ключевые слова: артрит адьювантный, воспалительный процесс, диформазан, сукцинатдегидрогеназа, тканевое дыхание

FUNCTIONAL FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN THE DYNAMICS OF AUTOIMMUNE ARTHRITIS IN RATS

^{1,2}Skupnevskiy S.V., ^{2,3}Pukhaeva E.G., ^{2,3}Badtiev A.K., ²Rurua F.K.,
²Batagova F.E., ²Farnieva Zh.G.

¹The FBEoS «Federal Scientific Center of Hygiene named after F.F. Erisman» of Rospotrebnadzor, Mytishchi, e-mail: dreammas@yandex.com;

²Institute of Biomedical Investigations – the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, e-mail: medgenetika435@yandex.ru;

³North-Ossetian State University, Vladikavkaz, e-mail: medgenetika435@yandex.ru

Rheumatoid arthritis refers to chronic diseases that are prone to progression. Given the molecular heterogeneity and complexity of clinical manifestations of rheumatoid arthritis, not fully disclosed etiological causes of its occurrence, the study of individual mechanisms of pathogenesis of this disease continues to be relevant for modern medicine. The aim of this study was to study the dynamics of functional features of rat lymphocytes in the model of adjuvant autoimmune arthritis. The work was carried out on old male rats of the Wistar line, divided into two equal groups, 8 animals in each. The model was formed by the introduction of the experimental animal adjuvant Freund. After 1, 3 and 7 weeks in rats, the standard method was calculated the total number of white blood cells. The intensity of respiratory processes in cells was judged by the degree of activity of succinate dehydrogenase detected by cytochemical method. The amount of mitochondrial respiratory activity marker-diformazan-formed was calculated using the Bio Images program. Statistical processing of the results was carried out according to the student's criterion in Microsoft Excel. The inflammatory process proceeded in waves with a maximum in the third week. The number of white blood cells in this case increased compared to the level of control values from 9.8 to 11.3 thousand/ μ l, returning to normal by the seventh week. The introduction of Freund adjuvant by the end of the first week was accompanied by an increase in respiratory activity of cells by 13%, reaching a maximum at the 3rd week of the experiment-18%. Significant differences with control in animals of experimental groups were obtained by the 7th week. At this time, a 31% decrease in the formation of diformazan, a sensitive indicator of mitochondrial metabolic activity, was recorded. The mechanisms of development of autoimmune arthritis are associated with hyperactivation of tissue respiration in the acute period of the disease and a decrease in the energy supply of cells at the stage of chronization of the pathological process. The inflammatory process proceeded in waves with a maximum in the third week.

Keywords: adjuvant arthritis, diformazan, the inflammatory process, tissue respiration the succinate dehydrogenase

Ревматоидный артрит (РА) по клинико-патогенетическим свойствам относится к хроническим заболеваниям, склонным к прогрессированию. Этиология РА остается до конца не раскрытой, но многочисленные исследования показывают, что генетическая предрасположенность, наличие инфекционных заболеваний и совокупность таких факторов, как переохлаждение, интоксикация, стрессы, последствия химического мутагенеза, нарушение эндокринного статуса организма и т.п., являются пусковым механизмом развития аутоиммунных реакций организма [1, 2].

Патогенетическая сложность РА заключается в наличии наследственной склонности к аутоиммунному ответу организма, вовлечению в патологический процесс синовиальной оболочки суставов, около-суставных тканей, дегенеративных поражений костей, нарушениям микроциркуляции и метаболизма. В тяжелых случаях развиваются сопутствующие патологии: ранние атеросклеротические изменения стенки артерий, поражения миокарда, инсульты, тромбозы сосудов, кератит, поражения почек, гранулема легких, что свидетельствует о мультиморбидности РА [3, 4]. Наличие выраженного болевого синдрома, прогрессирующее ограничение двигательной активности, часто приводящее к инвалидизации населения, необходимость эндопротезирования мелких и крупных суставов, длительное дорогостоящее лечение оказывают в совокупности отрицательное воздействие на качество жизни и трудоспособность больного [5]. Заболевание гетерогенно по половому и возрастному признакам: чаще встречается у женщин и пожилых пациентов, затрагивая от 0,5 до 1% населения в различных странах [6, 7]. Смертность от РА оказывается на 70% выше среднегопуляционной [5, 8]. В этой связи ранняя диагностика выступает в качестве ключевого фактора, способствующего достижению наиболее желательных результатов при терапевтическом воздействии, направленном на снижение процессов, ведущих к разрушению суставов. Эффективность лечения определяется максимально сжатыми сроками постановки диагноза и начала терапевтического воздействия [7]. Сложности ранней диагностики зависят от получения в достаточном объеме клинической информации, изучения и анализа истории болезни пациента, результатов лабораторных и рентгенологических исследований. Несмотря на достижения современной фармакологии, препаратов, способствующих полному излечиванию заболевания, к настоящему времени не существует [8]. С целью разработки

высокоэффективной терапии, активно изучаются механизмы патогенеза РА, реализуемого на различных моделях у лабораторных животных. Наибольшего распространения получили [9]:

- артриты, обусловленные неспецифическим воздействием на иммунную систему путем введения масляных растворов (адьюванта Фрейнда; пристана и др. масляных растворов);

- артриты, вызванные целенаправленным воздействием на хрящевую ткань (коллаген-, протеогликан-индуцированные РА);

- артриты, индуцированные инфекционными агентами или их токсинами (фрагменты клеточной мембраны стрептококков; антигены различной природы);

- трансгенные животные со спонтанным возникновением РА.

Исследования патогенеза РА на животных способствовали раскрытию механизмов патогенеза, что привело к разработке и апробированию препаратов, облегчающих симптоматику и создающих основу наступления длительных периодов ремиссии [10].

Учитывая молекулярную гетерогенность и сложность клинических проявлений ревматоидного артрита, не до конца раскрытые этиологические причины его возникновения, изучение отдельных механизмов патогенеза данного заболевания продолжает оставаться актуальным для современной медицины.

Цель исследования: изучение в динамике функциональных особенностей лимфоцитов крыс в модели аутоиммунного артрита, индуцированного введением адьюванта Фрейнда.

Материалы и методы исследования

Работа проведена на старых (более 400 г) самцах крыс линии Вистар, разделенных на две равные группы по 8 животных в каждой. Крысам контрольной группы под общим наркозом (Золетил) вводили в правую заднюю конечность п/к физиологический раствор в объеме 0,1 мл на 200 г веса. Опытным животным по той же схеме вводили адьювант Фрейнда (АФ).

По истечении 1, 3 и 7 недель у животных под общим наркозом из сердца отбирали кровь, которую с помощью прибора для нанесения мазков MicroscopyVision (Австрия) наносили на стекла. Препараты высушивали и фиксировали в 60% растворе ацетона в течение 30 с, ополаскивали дистиллированной водой. Затем стекла инкубировали при температуре 37°C в течение 1 часа в среде, содержащей 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/л нитроси-

неготетразолия окисленного, 5 ммоль/л молочной кислоты, 5 ммоль/л малоновой кислоты, 0,5 ммоль/л НАДН. Стекла промывали дистиллированной водой, высушивали и окрашивали в 0,05% растворе нейтрального красного, имеющего сродство к ядрам клеток [11]. Препараты микроскопировали при увеличении 10x100 под масляной иммерсией. На каждую крысу исследовалось по 100 клеток, которые для рандомизации отбирались из трех зон стекла: начальной, средней и финишной. Препараты фотографировали и обрабатывали в программе

пробы устанавливали отдельный таймер. Через 60 мин, по высоте прозрачного столба, подсчитывали скорость отделения эритроцитов от плазмы [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Введение крысам адьюванта Фрейнда, представляющего собой суспензию туберкулезных микобактерий, обусловило ответную иммунную реакцию, что проявилось изменением численности клеток белой крови (рис. 1).

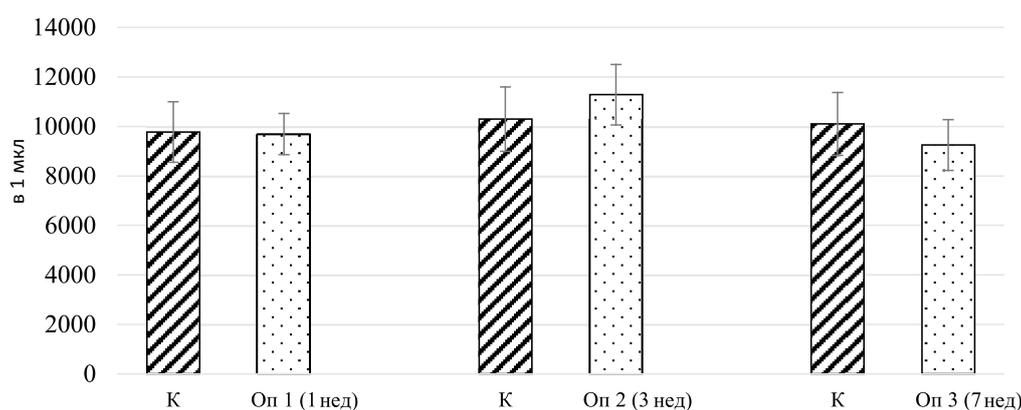


Рис. 1. Динамика общего количества лейкоцитов периферической крови у крыс в условиях индуцированного аутоиммунного артрита

Bio Images (г. Пущино), позволяющей рассчитывать площадные характеристики клеток и их компарментов, а также вычислять количество образуемого маркера дыхательной активности митохондрий – диформаза.

Статистическая обработка результатов осуществлялась по критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel.

Общее количество лейкоцитов подсчитывали под микроскопом, используя камеру Горяева, при малом увеличении 10x10. Препараты готовили стандартным способом, используя для окраски ядер лейкоцитов 100 мл 5% раствор уксусной кислоты и 1 мл 1% раствора метиленового синего. Скорость оседания эритроцитов измеряли по методу Панченкова. Использовали стандартный капилляр Панченкова со шкалой от 0 до 100 мм. Раствор цитрата натрия (5%) набирали до отметки «Р» и помещали его в пробирку. Затем производили еще два забора крови капилляром до буквы «К», переливая ее в ту же пробирку. Содержимое тщательно перемешивали и вновь набирали в капилляр до отметки «К». Капилляр фиксировали в штативе в строго вертикальном положении. Для каждой анализируемой

Из графика следует, что воспалительный процесс, обусловленный введением АФ, протекал волнообразно с максимумом на третьей неделе – количество лейкоцитов при этом возрастало от уровня контрольных значений 9,8 до 11,3 тыс/мкл. К седьмой неделе отмечался плавный спад и количество лейкоцитов возвращалось к норме. Однако общие наблюдения показали, что животные к этому времени становились малоподвижными, а пальпацией выявлялись начальные признаки деформации суставов.

Известно, что косвенным доказательством воспалительных реакций организма является тест на определение скорости оседания эритроцитов. В этой связи нами выявлена динамика изменений, затрагивающих в первую очередь белковый состав плазмы, определяющий способность к агрегации клеток красной крови (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что анализируемый клинический показатель характеризуется широкой вариабельностью у животных опытной и контрольной групп. Разброс показателей, определяющий величину стандартной ошибки среднего, не выявляет достоверных различий между сравниваемыми

выборками. Тем не менее во всех трех экспериментах очевидна тенденция к росту показателя СОЭ в опытных группах. В числе агломеринов, регулирующих объединение эритроцитов в крупные агрегатные комплексы, находятся белки острой фазы, выступающие маркерами воспалительного процесса. Из графика видно, что уже к окончанию первой недели с момента введения животным суспензии микобактерий, отмечается выраженная иммунная реакция, косвенно проявляемая повышенной склонностью красных кровяных телец к седиментации. Ее интенсивность возрастает к третьей неделе наблюдений и в дальнейшем сохраняется на отметке, превышающей контрольные показатели на 87–100%.

Сопоставление графиков на рис. 1 и 2 показывает, что в механизмах индуцированного аутоиммунного артрита принимают участие как клеточное, так и гуморальное звенья

иммунной системы. При этом если участие клеточного звена – визуализируемое общей численностью лейкоцитов, проходя через максимум, возвращается к норме, то интенсивность ответных гуморальных реакций остается выраженной и на стадиях перехода заболевания в хроническую форму.

Одновременно с клиническими наблюдениями осуществлялся контроль активности ферментов митохондрий лимфоцитов, участвующих в энергетическом обмене клеток. Выбор иммунокомпетентных клеток в качестве объекта исследования определялся их непосредственной вовлеченностью в патологический процесс и высокой скоростью пролиферации, дающей информацию о состоянии организма *in situ*. На рис. 2 показано, что интегральный профиль дегидрогеназной активности представителей клеточного иммунитета качественно воспроизводит характер течения патологии, отраженный на рис. 1.

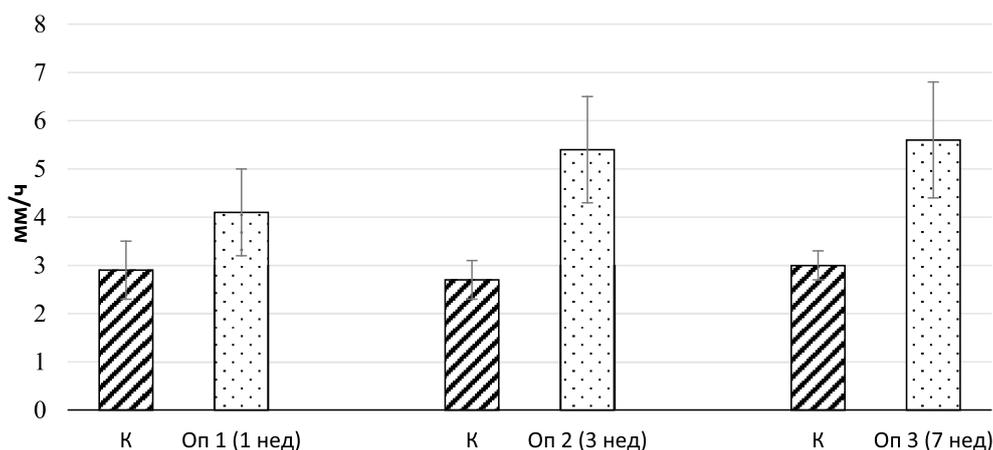


Рис. 2. Скорость оседания эритроцитов у крыс в условиях индуцированного аутоиммунного артрита

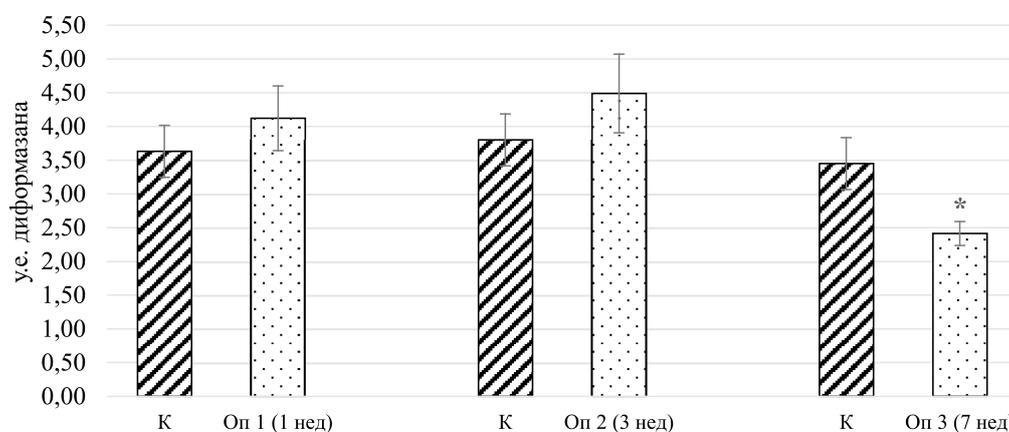


Рис. 3. Динамика метаболической активности митохондрий лимфоцитов периферической крови у крыс в условиях индуцированного аутоиммунного артрита (* – $P < 0,05$)

Введение АФ к окончанию первой недели сопровождалось повышением дыхательной активности клеток на 13%, максимум которой наблюдался на 3-й неделе эксперимента – 18%. Достоверные различия с контролем у животных опытных групп отмечались к 7-й неделе с момента индукции аутоиммунного артрита. В это время фиксировался спад (относительно контрольных животных) общего энергообеспечения, проявляемый снижением образования диформазана, выступающего в качестве чувствительного индикатора метаболической активности митохондрий на 31% [13].

Таким образом, динамика изменения численности клеток белой крови в процессе формирования адьювантного артрита представляла волнообразный процесс с максимумом на 3-й неделе и сохранением напряженности в гуморальном звене иммунной системы на всем этапе проведенных исследований. Механизмы развития аутоиммунного артрита ассоциированы с гиперактивацией тканевого дыхания в остром периоде заболевания и снижением энергообеспечения клеток в стадии хронизации патологии.

Список литературы

1. Frisell T., Holmgvist M., Kallberg H., Klareskog L., Alfredsson L., Askling J. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum.* 2013. vol. 65. P. 2773–2786.
2. Kuo C.F., Grainge M.J., Valdes A.M., See L.C., Yu K.H., Shaw SWS., Luo S.F., Zhang W., Doherty M. Familial aggregation of rheumatoid arthritis and co-aggregation of autoimmune diseases in affected families: a nationwide population-based study. *Rheumatology.* 2017. vol. 56. P. 928–933. DOI: 10.1093/rheumatology/kew500.
3. Кондратьева Л.В., Попкова Т.В., Насонов Е.Л. Инсулинорезистентность при ревматоидном артрите: взаимосвязь с нарушениями липидного обмена и метаболическим синдромом // *Научно-практическая ревматология.* 2019. № 57 (3). С. 280–283. DOI: 10.14412/1995-4484-2019-280-283.
4. Васильева Л.В., Лахин Д.И. Ревматоидный артрит и метаболический синдром – патогенетические взаимосвязи // *Российский семейный врач.* 2011. № 15 (1). С. 41–50.
5. Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е. Применение генно-инженерных биологических препаратов для лечения ревматоидного артрита: общая характеристика (лекция) // *Научно-практическая ревматология.* 2013. № 51 (2). С. 163–169. DOI: 10.14412/1995-4484-2013-645.
6. Bei Xu, Jin Lin. Characteristics and risk factors of rheumatoid arthritis in the United States: an NHANES analysis. *Peer J.* 2017. vol. 5. P.4035. DOI: 10.7717/peerj.4035.
7. Heidari B. Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. *Caspian J. Intern. Med.* 2011. vol. 2 (1). P. 161–170.
8. Guo Q., Wang Y., Xu D., Nossent J., Pavlos NJ., Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.* 2018. vol. 6. P. 15. DOI: 10.1038/s41413-018-0016-9.
9. Cuzzocrea S. Characterization of a novel and spontaneous mouse model of inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011. vol. 13 (5). P. 126. DOI: 10.1186/ar3434.
10. Громько М.В. Экспериментальные модели ревматоидного артрита // *Проблемы здоровья и экологии.* 2012. № 2 (32). С. 115–118.
11. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И. Цитобиохимический 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.
12. Справочник по лабораторным методам исследования // Под ред. Л.А. Даниловой. СПб.: Питер, 2003. 736 с.
13. Федотчева Н.И., Литвинова Е.Г., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Фадеев Р.С., Теплова В.В., Федотчева Т.А., Белобородова Н.В., Кондрашова М.Н. Субстрат-специфическое восстановление солей тетразолия в изолированных митохондриях, тканях и лейкоцитах // *Биохимия.* 2017. Т. 82. № 2. С. 309–322.