

## РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

### РЕГЕНЕРАЦИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОВУСНЫХ СТРУКТУР МЛЕКОПИТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ

С. В. Белова, И. А. Норкин, Д. М. Пучиньян<sup>1</sup>

Изучено действие антиоксидантов альфа токоферола ацетата и церулоплазмينا в условиях экспериментального артрита у кроликов. Альфа токоферола ацетат при ежедневном введении внутрь в дозе 4 мг вызывал изменение метаболических процессов в организме кролика (уменьшение скорости оседания эритроцитов, общего количества лейкоцитов, их палочко- и сегментоядерных форм, повышение количества эритроцитов; снижение содержания гликозаминогликанов, определяемых по концентрации уроновых кислот и гексоз ( $p < 0,05$ ); снижение активности церулоплазмينا ( $p < 0,05$ ) и уровня малонового диальдегида ( $p < 0,05$ ) в сыворотке крови), способствуя снижению общей активности воспалительного процесса по данным гематологического и биохимического исследования. Церулоплазмин при введении в сустав в дозе 1,5 мг/кг 1 раз в неделю оказывал выраженное влияние на состояние суставных структур в пораженных коленных суставах животных: снижение активности церулоплазмينا с  $5,28 \pm 0,06$  до  $3,94 \pm 0,01$  усл. ед. ( $p < 0,05$ ) и уровня малонового диальдегида с  $0,18 \pm 0,02$  до  $0,08 \pm 0,01$  мкмоль/л ( $p > 0,05$ ) в суставном содержимом. Изученные препараты действуют, вероятно, за счет устранения несостоятельности антиоксидантной системы в синовиальной среде, тем самым предотвращая воспалительную деструкцию суставных тканей, препятствуя развитию паннуса и способствуя активации процессов регенерации соединительнотканых структур.

**Ключевые слова:** экспериментальный артрит; кролики; антиоксидантный комплекс; регенерация соединительнотканых структур.

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется вопросам регенерации суставных тканей при нарушениях метаболизма протеогликанов [1, 12]. Особый интерес представляет ревматоидный артрит [2, 10, 16], который сопровождается такими системными проявлениями, как интенсификация процессов перекисного окисления липидов и несостоятельность антиоксидантной системы защиты [13]. Данные изменения встречаются как в эксперименте, так и в клинике [1, 13]. Учитывая имеющуюся интенсификацию процессов перекисного окисления липидов и относительную несостоятельность антиоксидантной системы у животных с экспериментальным артритом, логично предположить, что препараты антиоксидантного спектра действия окажут положительное влияние на репаративную регенерацию пораженных суставных тканей.

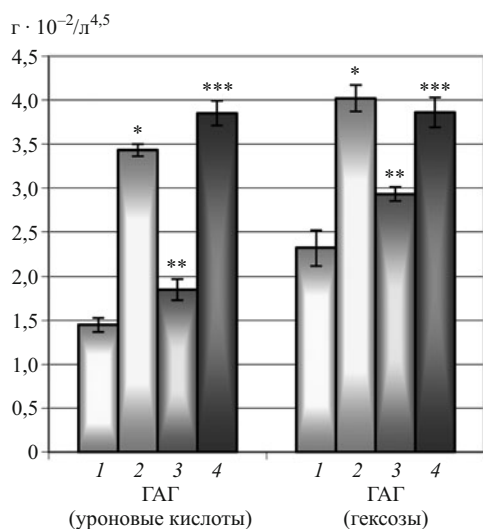
Цель работы — оценка влияния комбинированного применения альфа токоферола ацетата системно и церулоплазмينا местно на регенерацию соединительнотканых структур пораженных коленных суставов у кроликов с экспериментальным артритом.

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под наблюдением находилось 36 половозрелых самцов кроликов массой 3 – 3,6 кг породы шиншилла русская (зверосовхоз “Анисовский”), которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все исследования на животных проводили согласно международным актам Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. с дополнениями 2008 г.

Модель экспериментального аутоиммунного артрита у кроликов формировали по методу E. R. Pettipher, et al. (1988) [14]. Все экспериментальные животные были разделены на: группу контроля (10 интактных кроликов), опытную группу (17 кроликов с экспериментальным артритом, для лечения которых применяли церулоплазмин (“Ceruloplasminum”, ФГУП НПО “Микроген”, порошок) и альфа токоферола ацетат (10 % масляный раствор, ОАО “ИНС Марбиофарм”). Введение церулоплазмينا осуществляли 1 раз в неделю внутрисуставно в дозе 1,5 мг/кг в 1 мл изотонического 0,9 % раствора хлорида натрия, общим курсом 4 недели, введение альфа токоферола ацетата проводили ежедневно внутрь по 0,1 мл 4 недели. Группу сравнения составили 9 кроликов с экспериментальным артритом, которым внутрисуставно вводили 1 мл изотонического 0,9 % раствора хлорида натрия в те же сроки, что и препараты в опытной группе. Забор крови для проведения лабораторных тестов осуществляли из

<sup>1</sup> ФГБУ “Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии” Минздрава России, 410002, г. Саратов, ул. им. Н. Г. Чернышевского, 148.



Показатели метаболизма соединительной ткани у животных (ГАГ — гликозаминогликаны):

1 – интактные кролики; 2 – кролики с артритом; 3 – кролики опытной группы; 4 – кролики группы сравнения.

краевой вены уха. Все манипуляции выполняли с соблюдением правил асептики. Сыворотку крови получали путем центрифугирования с последующим определением в ней изучаемых показателей. Исследования проводили до начала иммунизации животных, после формирования модели экспериментального артрита и перед введением препаратов (22 сут) и после применения препаратов (50 сут).

Все эксперименты на животных осуществляли согласно общепринятым правилам [7].

Формирование модели экспериментального артрита и эффективность проводимой терапии подтверждали разными методами исследования. Проводили осмотр клиническими, инструментальными и лабораторными методами. Клинические методы включали: осмотр, оценку состояния и поведения животных, пальпацию и измерение окружности и объема движений в обоих коленных суставах, определение массы тела. Посредством тепловизионной термографии оценивали наличие и степень выраженности воспалительного процесса в тканях коленных суставов. Лабораторные исследования включали гематологические (определение СОЭ, содержание лейкоцитов и эритроцитов на анализаторе Micros 60 ABX, Франция); цитологические (определение общего цитоза и клеточного состава содержимого сустава); биохимические и гисто-морфометрические методы. С помощью биохимических методов проводилась оценка состояния процессов перекисного окисления липидов по уровню малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой [5] в сыворотке крови и суставном содержимом, а состояние антиоксидантной системы — по активности церулоплазмينا, определяемой по степени окисления раствора парафенилендиамина [4] в сыворотке крови и суставном содержимом, выраженной в условных

единицах (усл. ед.). Кроме того, проводили оценку метаболизма соединительной ткани по входящим в ее структуру биополимерам — протеогликанам и, в частности, по общему содержанию гликозаминогликанов, определяемому по концентрации уроновых кислот и гексоз в сыворотке крови. Принцип метода основан на ферментативном протеолизе протеогликанов, депротеинизации гидролизата, осаждении гликозаминогликанов с помощью уксуснокислых солей в этаноле с последующим количественным определением гликозаминогликанов по входящим в их состав уроновым кислотам и гексозам [3].

Гисто-морфометрическое исследование включало в себя морфологические методы оценки состояния макро- и микроструктуры тканей коленного сустава: параартикулярные ткани (связки, синовиальная оболочка, сухожилия), мениски, суставной хрящ, субхондральная кость, и гистологическое изучение тканей коленных суставов животных с помощью окраски гематоксилин-эозином, выявляющей структуру тканей, толуидиновым голубым при различных значениях рН для выявления гликозаминогликанов, пикрофуксином по Ван Гизон для выявления коллагеновых волокон и оценки их внеклеточной деградации [6], окраски по методу С. П. Шуенинова для обнаружения фибрина, являющегося одним из признаков экссудативного характера воспаления [7], окраски по Браше для выявления рибонуклеопротеидов, показателя биосинтетической функции клеток [8].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ “Medstat” с вычислением средней арифметической ( $M$ ), среднеквадратического отклонения ( $\sigma$ ), средней ошибки средней арифметической ( $m$ ), критерия достоверности ( $t$ ), показателя вероятности ( $p$ ). Результаты считали достоверными при  $p < 0,05$ , что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После окончания применения антиоксидантных препаратов у кроликов опытной группы отмечали улучшение общего состояния, что проявлялось увеличением массы тела, повышением аппетита, увеличением активных и пассивных движений в области коленных суставов. Кроме того, наблюдали уменьшение выраженности отека пораженного сустава, снижение местной температуры по результатам тепловизионного исследования, показавшего отсутствие температурной асимметрии между опытным и интактным суставом, по сравнению с группой животных без лечения, у которых имелась выраженная разница температур в симметричных суставах, составляющая  $1 - 1,7$  °С, а у отдельных особей достигающая  $2 - 2,3$  °С. Отмечались положительные сдвиги в результатах лабораторных показателей (таблица). У животных наблюдали снижение общей активности воспалительного процесса по

данным гематологического исследования: уменьшение скорости оседания эритроцитов, общего количества лейкоцитов, их палочко- и сегментоядерных форм, повышение количества эритроцитов. Цитологическое исследование характеризовалось снижением и местной активности воспалительного процесса. Уровень общего цитоза понизился до  $(0,42 \pm 0,08) \cdot 10^9/\text{л}$ , по сравнению с исходным  $(2,20 \pm 0,07) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,05$ ) и с уровнем у кроликов без лечения  $(2,60 \pm 0,06) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p < 0,05$ ), при этом отмечалось изменение качественного состава клеточных элементов в содержимом опытного коленного сустава кроликов: снижалась частота встречаемости нейтрофилов с  $56,70 \pm 0,72$  до  $21,90 \pm 1,54 \%$  ( $p < 0,05$ ), макрофагов с  $43,63 \pm 0,45$  до  $0,53 \pm 0,07 \%$  ( $p < 0,05$ ) и отсутствовали рагоцитоподобные клетки — маркеры воспалительного процесса в синовиальной среде сустава. В условиях экспериментального артрита у кроликов имелась повышенная активность антиоксидантного фермента церулоплазмينا, однако при этом уровень малонового диальдегида не только не снижался, а нарастал, что свидетельствовало о продолжающейся интенсификации процессов перекисного окисления липидов, т.е. имеющегося повышения активности эндогенного церулоплазмина оказывалось недостаточно для нормализации процессов, указанных выше. Возможно, что при данной патологии происходят качественные изменения молекулы эндогенного церулоплазмина (конформационные изменения активных центров фермента, изменение молекулярной массы и т.д.), следствием чего является нарушение функциональных свойств эндогенного церулоплазмينا. Поэтому введение церулоплазмينا в сустав и применение альфа токоферола ацетата внутрь оказывало благоприятное воздействие на процессы перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы и заключалось в снижении уровня малонового диальдегида и активности церулоплазмينا, причем и в сыворотке крови, и в содержимом пораженного коленного сустава (таблица). Кроме того, отмечали улучшение показателей метаболизма протеог-

ликанов в сыворотке крови (рисунок). Положительное действие сочетанного применения антиоксидантных препаратов на регенерацию тканей коленных суставов кроликов подтверждал гисто-морфометрический анализ: параартикулярные ткани макроскопически были без видимой патологии, микроскопически из признаков поражения выявлялась слабо выраженная пролиферация пиронинофильных фибробластов. Синовиальная оболочка макроскопически была слегка разрыхлена, кровоизлияний на ее поверхности не было, суставной выпот отсутствовал. Микроскопически имелась слабо выраженная гиперплазия ворсин и пролиферация синовиальных клеток. Отложения фибрина имели очаговый характер и располагались как на поверхности, так и между синовиоцитами. Признаков склероза практически не было, выявлялся лишь умеренный периваскулярный фиброз. Мениски макро- и микроскопически — без патологии на всем протяжении имели нормальный вид. Суставной хрящ макроскопически — без патологии. Микроскопически поверхностный слой был сохранен на всем протяжении, имелись лишь незначительные участки разволокнения. Хондроциты не имели признаков дистрофии. Матрикс хряща был гомогенен и метакроматичен, ослабление метакромазии выявляли лишь на некоторых участках верхних слоев средней зоны. Субхондральная кость макро- и микроскопически — без патологии. Таким образом, по данным гистоморфометрического исследования на фоне выраженного улучшения состояния животных и данных лабораторных исследований имелись слабо выраженные проявления неспецифического хронического продуктивного воспаления.

В группе сравнения отмечали прогрессирование воспалительной деструкции в суставных тканях, дальнейшую активацию процессов перекисного окисления липидов и несостоятельность антиоксидантной системы (таблица).

Уже на ранних сроках развития ревматоидного воспаления в патологический процесс практически одновременно с синовиальной оболочкой вовлекаются и

**Влияние антиоксидантной терапии (внутрисуставное введение церулоплазмينا 1 раз в неделю в дозе 1,5 мг/кг массы тела, общим курсом 4 недели с альфа токоферола ацетатом ежедневно внутрь в дозе 0,1 мл 4 недели) на некоторые биохимические показатели у кроликов с экспериментальным артритом ( $M \pm m$ )**

Показатель	Группа			
	интактные ( $n = 10$ )	с артритом до введения препаратов ( $n = 26$ )	опытная ( $n = 17$ )	сравнения ( $n = 9$ )
Церулоплазмин в сыворотке крови, усл. ед.	$24,45 \pm 0,50$	$42,62 \pm 0,52^*$	$35,64 \pm 0,32^{**}$	$35,51 \pm 0,56$
Малоновый диальдегид в сыворотке крови, мкмоль/л	$3,79 \pm 0,07$	$4,19 \pm 0,10^*$	$4,93 \pm 0,15^{**}$	$5,12 \pm 0,29$
Церулоплазмин в суставном содержимом, усл. ед.	$3,47 \pm 0,11$	$5,28 \pm 0,06^*$	$3,94 \pm 0,01^{**}$	$5,78 \pm 0,17^{***}$
Малоновый диальдегид в суставном содержимом, мкмоль/л	$0,06 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,02^*$	$0,08 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,01^{***}$

\* — Достоверная разница ( $p < 0,05$ ) между показателями интактных кроликов (норма) и кроликов с артритом, \*\* — достоверная разница показателей ( $p < 0,05$ ) до и после лечения в опытной группе, \*\*\* — достоверная разница показателей ( $p < 0,05$ ) после лечения между опытной группой и группой сравнения.

остальные соединительнотканые структуры, формирующие элементы коленных суставов [9]. Хрящевая ткань имеет большие возможности по регенерации своего матрикса, как за счет своего собственного потенциала, хондроцитов и продуцирующих их хондробластов, так и за счет деятельности клеток других ее видов, в качестве которых могут выступать клетки синовиальной оболочки, костной ткани. Активация процессов перекисного окисления липидов и несостоятельность антиоксидантной системы нарушают регенераторные процессы в суставе. Внутрисуставное введение препарата церулоплазмин оказывало положительное влияние на состояние суставных структур в пораженных коленных суставах животных и на весь организм в целом, вероятно, благодаря его полифункциональным свойствам и, в частности, его способности связывать ионы металлов переменной валентности и способности инактивировать высокореакционные гидроксильные радикалы. Введение альфа токоферола ацетата внутрь приводило к нормализации метаболических процессов, способствуя снижению общей активности воспалительного процесса. Таким образом, использование 2 антиоксидантов оказывает положительное влияние на проявления экспериментального артрита и репаративную регенерацию соединительнотканых структур.

## ВЫВОДЫ

1. Комбинация церулоплазмينا при внутрисуставном введении 1 раз в неделю в дозе 1,5 мг/кг общим курсом 4 недели с альфа токоферола ацетатом ежедневно внутрь в дозе 0,1 мл (4 недели) оказывала положительное влияние на процессы регенерации соединительной ткани коленных суставов животных по данным гисто-морфометрического исследования за счет улучшения метаболизма протеогликанов в соединительнотканых структурах.

2. Сочетанное применение выше приведенных препаратов оказывало выраженное антиоксидантное действие на локальные и системные проявления экспериментального артрита за счет устранения относительной несостоятельности антиоксидантной системы, что предотвращало воспалительную деструкцию суставных тканей, препятствуя развитию паннуса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Белова, Ю. С. Белова, *Вестник новых мед. технологий*, № 4(18), 285 – 287 (2011).
2. Д. В. Бестаев, Д. Е. Каратеев, Е. Л. Насонов, *Научно-практич. ревматол.*, № 1, 76 – 80 (2013).
3. Е. В. Карякина, Д. В. Косягин, *Лаб. дело*, № 10, 591 – 593 (1982).
4. В. Г. Колб, В. С. Камышников, *Клиническая биохимия (пособие для врачей-лаборантов)*, Минск, Беларусь (1976).
5. Э. Н. Корабейникова, *Лаб. дело*, № 7, 8 – 10 (1989).
6. Г. А. Меркулов, *Курс патологогистологической техники*, Медгиз, Ленинград (1961), сс. 141 – 144.
7. Г. А. Меркулов, *Курс патологогистологической техники*, Медгиз, Ленинград (1961), с. 222.
8. Г. А. Меркулов, *Курс патологогистологической техники*, Медгиз, Ленинград (1961), сс 215 – 218.
9. Е. Л. Насонов, *Мед. вестник*, № 13, 9 – 10 (2006).
10. Р. А. Осипянц, Д. Е. Каратеев, Е. Ю. Панасюк и др., *Научно-практич. ревматол.*, № 1, 38 – 43 (2013).
11. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К, Москва (2012).
12. Т. В. Русова, В. С. Байтов, *Гений ортопедии*, № 3, 41 – 44 (2009).
13. А. М. Elbarbary, M. A. Khalek, A. M. Elsalawy, S. M. Hazaa, *Egypt. Rheumatol.*, 33(4), 179 – 185 (2011).
14. E. R. Pettipher, B. Henderson, S. Moncada, G. A. Higgs, *Br. J. Pharmacol.*, № 95, 169 – 176 (1988).
15. С. Н. Sarithakumari, G. L. Renju, G. M. Kurup, *Inflammopharmacology*, 21(3), 261 – 268 (2013).
16. S. P. Young, S. R. Kapoor, M. R. Viant, et al., *Arthritis Rheum.*, 65(8), 2015 – 2023 (2013).

Поступила 21.10.14

## REPARATIVE REGENERATION OF CONNECTIVE TISSUE STRUCTURES OF MAMMALS UNDER ANTIOXIDANT THERAPY CONDITIONS

S. V. Belova, I. A. Norkin, and D. M. Puchin'yan

Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Chernyshevskogo 148, Saratov, 410002 Russia

The influence of administration of the antioxidant complexes consisting of nonenzymatic antioxidants (alpha-tocopherol acetate preparation) and enzymatic antioxidants (ceruloplasmin) has been studied in rabbits with experimental arthritis. The introduction of alpha-tocopherol acetate (at a daily dose of 4 mg) improved metabolic processes in the organism (decreased in the rate of erythrocyte precipitation, total leukocytes and their stub and segmental forms; increased in erythrocyte count; reduced the glycosaminoglycan content as determined from uronic acid and hexose level; decreased ceruloplasmin activity and malonic dialdehyde level in blood serum, all at  $p < 0.05$ ), thus favoring reduction in the total activity of the inflammatory process as judged from hematological and biochemical data. Intra-articular introduction of ceruloplasmin (1.5 mg/kg, once per week) positively influenced the state of joint structures in damaged knee joints of the animals: decreased the activity of ceruloplasmin (from  $5.28 \pm 0.06$  to  $3.94 \pm 0.01$  AU), and malonic dialdehyde level ( $0.18 \pm 0.02$  to  $0.08 \pm 0.01$  μM) in the articular fluid (all at  $p < 0.05$ ). These effects are probably related to the elimination of inefficiency of the antioxidant system in the synovial medium, thus preventing inflammatory destruction of articular tissues, hindering the development of pannus, and assisting the activation of reparative regeneration of connective tissue structures.

**Keywords:** experimental arthritis; rabbits; antioxidant complex; reparative regeneration of connective tissue structures.