

## МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ СРЫВА ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ 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», г. Владикавказ, Республика Северная  
Осетия – Алания, Россия

**Резюме.** Широкая распространенность аутоиммунных заболеваний, характеризующихся ранним дебютом и высокими рисками инвалидизации населения, определяет актуальность работы, цель которой заключалась в изучении метаболических особенностей лимфоцитов на фоне адьювант-индуцированной аутоиммунной патологии у крыс.

У крыс линии Wistar вызывали патологию субкутанным введением полного адьюванта Фрейнда, представляющего собой водно-масляную эмульсию, содержащую в качестве антигенов термически инактивированные микобактерии туберкулеза. Гематологические (общий анализ крови), биохимические (гидроперекиси, малоновый диальдегид (МДА), каталаза) и цитобиохимические изменения в лимфоцитах (лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа; ЛДГ, СДГ) наблюдали в динамике. Рентгенографию проводили по окончании эксперимента.

На начальной стадии (2 недели) формирования аутоиммунного артрита отмечается патологический лейкоцитоз ( $26,12 \pm 2,30 \times 10^9/\text{л}$ , что на 65% выше контроля,  $p < 0,01$ ), тромбоцитоз ( $675 \pm 30 \times 10^9/\text{л}$  на фоне контроля  $536 \pm 27 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,01$ ) и развивается окислительный стресс (увеличение гидроперекисей на 7% и МДА на 32%,  $p < 0,001$ ); энергетический статус лимфоцитов повышается за счет роста активности ЛДГ на 6,5% и СДГ на 49% относительно контроля. В хронической стадии (7 недель) на фоне снижения системного воспаления (общее количество лейкоцитов в опыте  $19,59 \pm 1,40 \times 10^9/\text{л}$ , в контроле  $13,68 \pm 0,86 \times 10^9/\text{л}$ ,  $p < 0,01$ ; правый сдвиг в лейкоцитарной формуле) сохраняется окислительный стресс (превышение МДА на 37% относительно контроля; активность каталазы снижается) и уменьшается активность ЛДГ (на 43%,  $p < 0,01$ ) в лимфоцитах, что сопровождается их микроцитозом (коэффициент корреляции между радиусом лимфоцитов и активностью ЛДГ  $r_{xy} = 0,87$ ). Наиболее характерные изменения затронули механизм энергетического обеспечения клеток: дыхательный коэффициент для контрольных животных (отношение ЛДГ/СДГ) варьирует в пределах 4,6–5,0, а на фоне формируемой патологии вклад процессов гликолиза существенно снижается до 3,2 ко 2-й неделе и 2,4 к 7-й неделе. На рентгенограмме к 7-й неделе у опытных животных отмечается неравномерное сужение суставных щелей, кистовидные образования и субхондральный склероз головок костей.

В условиях аутоиммунного ревматоидного артрита у крыс выявляются нарушения метаболического статуса лимфоцитов в виде общего энергетического дефицита и дисбаланса между процессами гликолиза и окислительного фосфорилирования, что позволяет глубже раскрыть патогенез и определяет направление поиска средств молекулярно-таргетной терапии и профилактики заболевания.

**Ключевые слова:** аутоиммунные заболевания, гликолиз, лимфоциты, метаболический статус лимфоцитов, окислительный стресс, оксигенная активность лимфоцитов, ревматоидный артрит

### Адрес для переписки:

Пушаева Елена Георгиевна  
Институт биомедицинских исследований  
362025, Россия, Республика Северная Осетия – Алания,  
г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 47.  
Тел.: 8 (928) 491-16-91.  
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

### Address for correspondence:

Pukhaeva Elena G.  
Institute of Biomedical Investigations  
362025, Russian Federation, Republic of North Ossetia –  
Alania, Vladikavkaz, Pushkinskaya str., 47.  
Phone: 7 (928) 491-16-91.  
E-mail: medgenetika435@yandex.ru

### Образец цитирования:

С.В. Скупневский, Е.Г. Пушаева, А.К. Бадтиев,  
Ф.К. Руруа, Ф.Э. Батагова, Ж.Г. Фарниева  
«Метаболические изменения лимфоцитов в условиях  
срыва иммунной толерантности у крыс» //  
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 247-256.  
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2408  
© Скупневский С.В. и соавт., 2022

### For citation:

S.V. Skupnevsky, E.G. Pukhaeva, A.K. Badtiev, F.K. Rurua,  
F.E. Batagova, Z.G. Farnieva "Metabolic changes  
of lymphocytes in a rat model of autoimmunity", *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,  
Vol. 24, no. 2, pp. 247-256.  
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2408  
DOI: 10.15789/1563-0625-MCO-2408

## METABOLIC CHANGES OF LYMPHOCYTES IN A RAT MODEL OF AUTOIMMUNITY

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

*Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia – Alania, Russian Federation*

**Abstract.** Autoimmune diseases are highly prevalent in humans, being characterized by early onset and high risks of disability, thus determining the relevance of the present work and its aim, i.e., studying metabolic characteristics of lymphocytes upon the adjuvant-induced autoimmune disorder in rats.

Modeling of the autoimmune process was performed in Wistar rats by subcutaneous administration of a Freund's complete adjuvant, i.e., water-oil emulsion with heat-killed *M. tuberculosis*. Hematology testing (complete blood counts), biochemical markers (hydroperoxides, malondialdehyde (MDA), catalase), and cytobiochemical changes in lymphocytes (lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase; LDH, SDH) were followed in dynamics. X-ray examination was performed at the end of the experiment.

At the initial stage of autoimmune arthritis (2 weeks), leukocytosis was registered ( $26.12 \pm 2.30 \times 10^9/L$ , i.e., 65% over the controls,  $p < 0.01$ ), thrombocytosis ( $675 \pm 30 \times 10^9/L$ , compared with  $536 \pm 27 \times 10^9/L$  in controls,  $p < 0.01$ ), and oxidative stress were also observed (hydroperoxides increased by 7%, and MDA, by 32%,  $p < 0.001$ ); energy levels of the lymphocytes increased due to activation of LDH by 6.5%, and SDH, by 49% against the controls. At chronic stage of the disorder (7 weeks), the systemic inflammation was milder (total WBC counts of  $19.6 \pm 1.40 \times 10^9/L$ , compared with  $13.68 \pm 0.86 \times 10^9/L$  in controls,  $p < 0.01$ , associated with shift to the right in differential counts), along with persisting oxidative stress (MDA exceeds the control levels by 37%; decrease in catalase activity), and lower LDH activity in lymphocytes (by 43%,  $p < 0.01$ ) associated by their decrease in size (the correlation quotient between the lymphocyte radius and LDH activity is  $r_{xy} = 0.87$ ).

Profound molecular changes were observed in the cell energy supply: the respiratory quotient for control animals (LDH/SDH ratio) varied within 4.6–5.0. Meanwhile, in autoimmune animals, metabolic contribution of glycolysis showed a significant decrease (the quotient of 3.2 by the 2<sup>nd</sup> week, and 2.4 by the 7<sup>th</sup> week). On the radiograph by 7<sup>th</sup> week, the experimental animals show uneven joint space narrowing, cyst-like formations and subchondral sclerosis of the bone heads.

Autoimmune rheumatoid arthritis in rats is characterized by metabolic disorders of lymphocytes manifesting as general energy deficiency, and imbalance between glycolysis and oxidative phosphorylation pathways. These findings allow of deeper insight into pathogenesis and suggesting further search for molecular targeted therapy and prevention of the disease.

**Keywords:** autoimmune diseases, glycolysis, lymphocytes, metabolic status, oxidative stress, oxygenase activity, rheumatoid arthritis

## Введение

Аутоиммунные заболевания включают в себя более 100 нозологических форм и относятся к числу наиболее распространенных и тяжелых патологий, охватывающих 8% человеческой популяции [25]. Триггерами срыва иммунной толерантности являются генетическая предрасположенность и факторы внешней среды — в первую очередь инфекции [4, 27]. В работах [12, 16, 19] высказывается гипотеза о высокой вероятности возникновения и развития аутоиммунных расстройств в связи массовым распространением коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, что может значительно увеличить первичную заболеваемость. О взаимосвязи вирусной инфекции и аутоиммунитета свидетельствует тот факт, что на фоне аутоиммунных патологий возрастает сте-

пень тяжести (в 1,21 раза) и смертности (в 1,31 раз) от COVID-19 [21].

Трудность в изучении генетических детерминант, управляющих механизмами иммунологической ауто толерантности, заключается в том, что только система HLA (Human Leukocyte Antigen) включает в себе более 9000 аллелей и относится к числу наиболее сложно устроенных структур организма [7]. Ряд авторов [10, 22] отмечает, что столь выраженный генный полиморфизм может быть обусловлен вспышками и эпидемиями инфекционных болезней известных в истории человечества, способствовавших наследственному закреплению аллелей с различной пептидсвязывающей способностью в реакциях с антигенами.

Не менее важную роль в реализации иммунных и аутоиммунных реакций играет метаболический

статус иммунокомпетентных клеток, в первую очередь — лимфоцитов [26]. В работе [8] отмечается, что активация лимфоцитов сопровождается резким нарастанием потребления и синтеза АТФ, который осуществляется преимущественно за счет процессов т.н. «аэробного гликолиза», обеспечивающего 100-кратный выигрыш в скорости наработки макроэргов по сравнению с процессом окислительного фосфорилирования, — доминирующего способа энергообеспечения в неактивированных клетках. Так, метаболическое перепрограммирование CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов с гликолиза на окислительное фосфорилирование является ключевым фактором, обеспечивающим систему долгоживущих клеток памяти [9, 18]; снижение энергетического потенциала влечет за собой апоптоз и истощение T-субпопуляционного пула иммунных клеток [15, 28]. Реактивированные лимфоциты характеризуются высокой экспрессией транспортера глюкозы 1 (GLUT 1), что сопровождается увеличением продукции цитокинов и пролиферацией клеток [24]. В условиях ограничения нутриентов или метаболического ингибирования отмечается инактивация T-лимфоцитов и неспособность их к пролиферации и дифференцировке [23]. В этой связи изучение процессов энергетического метаболизма лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях является актуальным, поскольку направлено на углубление знаний о патогенезе и способствует разработке эффективных таргетных мер лечения и профилактики.

**Цель работы** — изучении метаболических особенностей лимфоцитов на фоне адьювант-индуцированной аутоиммунной патологии у крыс.

## Материалы и методы

Исследования проводили на самцах крыс линии Wistar с массой тела (м.т.)  $400 \pm 20$  г (ФГУП «Питомник лабораторных животных "Рапполово"», Ленинградская область). Животные содержались в стандартных условиях вивария при постоянной температуре, влажности и световом режиме 12:12. Доступ к воде и пище — *ad libitum*. В работе с лабораторными животными придерживались правил и этических норм содержания и ухода, описанных в руководстве National Research Council, 2011 г. и ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» с разрешения этического комитета при Институте биомедицинских исследований РАН. Животные были разделены на две группы — контрольную и опытную. Манипуляции по введению растворов проводились под легким общим наркозом («Золетил», Франция). Крысам контрольной группы ( $n = 8$ ) вводили в правую заднюю конечность подкожно изотонический раствор хлорида

натрия в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. Животным опытной группы ( $n = 8$ ) вводили однократно в правую заднюю конечность полный адьювант Фрейнда Difco Laboratories (Detroit, Michigan, США) в объеме 0,1 мл на 200 г м.т. Забор крови осуществлялся под общим наркозом («Золетил») из сердца на 2-й и 7-й неделях. По окончании эксперимента (7 недель) осуществляли эвтаназию животных в CO<sub>2</sub>-затравочной камере.

Гематологические параметры определяли на автоматическом гематологическом анализаторе Mythic 22 (Польша). Для повышения точности лейкоцитарную формулу рассчитывали с помощью «ручной» микроскопии мазка.

Активность ферментов в лимфоцитах определяли цитобиохимическим методом [2], предложенным Кондрашовой М.Н. и соавт. Для этого 10 мкл крови наносили на предметные стекла и с помощью прибора Microscopy Vision (Австрия) готовили мазки. Полученные препараты высушивали и фиксировали в 60% растворе ацетона в течение 30 с и ополаскивали дистиллированной водой. Активность СДГ определяли как разницу показателей (№1 — №2) интенсивности окраски гранул, полученных при инкубировании клеток крови в растворах следующего состава (рН  $7,2 \pm 0,01$  при  $t = 37^\circ\text{C}$ ): №1 — 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/мл нитросинего тетразолия окисленного (НСТ) и 5 ммоль/л янтарной кислоты; №2 — 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/мл НСТ и 5 ммоль/л малоновой кислоты, используемой в качестве селективного ингибитора СДГ. Активность ЛДГ определяли путем инкубации мазков крови в среде следующего состава (рН  $7,2 \pm 0,01$  при  $t = 37^\circ\text{C}$ ): 125 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л HEPES, 1 мг/мл НСТ, 5 ммоль/л молочной кислоты, 5 ммоль/л малоновой кислоты, 0,5 ммоль/л НАДН. После инкубации (СДГ, ЛДГ) стекла промывали дистиллированной водой, высушивали и окрашивали в 0,05%-ном растворе нейтрального красного, имеющего сродство к ядрам клеток. 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 Bio Images (г. Пуццино), позволяющей рассчитывать линейные характеристики клеток и их компартментов, а также вычислять количество образуемого маркера дыхательной активности митохондрий — диформаза (у. е.).

Для биохимических исследований кровь центрифугировали и фракционировали. В плазме определяли содержание гидроперекисей по Гаврилову, используя наборы фирмы ООО «Агат-

Мед» (Россия), а в эритроцитах, отмытых холодным ( $t = 4^{\circ}\text{C}$ ) изотоническим раствором, оценивали стандартным методом содержание малонового диальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой [3] и изучали активность каталазы по методике, основанной на спектрофотометрическом измерении кинетики распада перекиси водорода при длине волны 230 нм (Beutler T. [6]).

Рентгеновские снимки получали на стационарном ветеринарном аппарате Escoray Ultra 300V (Корея).

Рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку среднего. Проверка нормальности распределения данных осуществлялась по критерию Шапиро–Уилка и при позитивном заключении сравнение гипотез проводилось по критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel. Значимыми считались различия при  $p \leq 0,05$ . Корреляционные коэффициенты ( $r_{xy}$ ) рассчитывались по Пирсону.

## Результаты

Введение животным адьюванта Фрейнда, представляющего собой водно-масляную эмульсию термически инактивированных *M. tuber-*

*culosis*, сопровождалось индукцией каскада иммунных реакций организма, в том числе в отношении собственных клеток и тканей. Клиническим проявлением указанного спектра событий явился воспалительный процесс, характер и степень выраженности которого могут быть выявлены на основе результатов анализа крови (табл. 1–4).

Из таблицы 1 видно, что общее количество лейкоцитов у животных контрольной группы колеблется незначительно и находится в пределах физиологической нормы. На фоне антигенной стимуляции число клеток белой крови у опытных животных достоверно увеличивается к окончанию второй недели с момента индуцированной патологии на 65%. К седьмой неделе отмечается снижение интенсивности системного воспалительного процесса, о чем свидетельствует 25% уменьшение ( $p < 0,05$ ) лейкоцитов в периферической крови. Достоверная динамика выявлена для палочкоядерных нейтрофилов у животных опытной группы: отмечено 2,5-кратное снижение их численности за период в пять недель (опыт 1 / опыт 2) и 3,5-кратное уменьшение относительно контрольной группы 1. Достоверное снижение общего количества сегментоядерных нейтрофи-

ТАБЛИЦА 1. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИВОТНЫХ: БЕЛЫЙ РОСТОК

TABLE 1. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ANIMALS: WHITE BLOOD CELLS

Изучаемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ White blood cells, $10^9/\text{L}$	15,83±1,28	26,12±2,30**	13,68±0,86	19,59±1,40 <sup>##</sup> ^
П/я нейтрофилы, % Rod-shaped neutrophils, %	2,63±0,50	1,88±0,39	1,50±0,42	0,75±0,22^
С/я нейтрофилы, % Segmented neutrophils, %	20,13±0,44	25,25±1,29	23,50±2,89	17,89±1,84 <sup>##</sup>
Эозинофилы, % Eosinophils, %	3,38±0,82	4,13±1,33	3,38±0,65	3,13±0,44
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	69,88±2,34	63,75±2,91	66,75±3,23	76,25±2,30 <sup>#</sup> ^^
Средний радиус лимфоцитов, мкм Mean radius of lymphocytes, $\mu\text{m}$	3,78±0,09	4,13±0,05**	3,83±0,07	3,57±0,08 <sup>#</sup> ^^^
Моноциты, % Monocytes, %	4,00±1,12	4,50±0,68	5,38±0,50	2,00±0,42 <sup>###</sup> ^^

Примечание. \* – опыт 1 по отношению контролю 1; # – опыт 2 по отношению контролю 2; ^ – опыт 1 по отношению к опыту 2 (\*, #, ^ –  $p < 0,05$ ; \*\*, ##, ^^ –  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ###, ^^^ –  $p < 0,001$ ).

Note. \*, experience 1 in relation to control 1; #, experience 2 in relation to control 2; ^, experience 1 in relation to experience 2 (\*, #, ^,  $p < 0.05$ ; \*\*, ##, ^^,  $p < 0.01$ ; \*\*\*, ###, ^^^,  $p < 0.001$ ).



лов и моноцитов к окончанию эксперимента у животных опытной группы привело к изменениям в лейкоцитарной формуле и увеличению доли лимфоцитов на 14% (при сравнении с контрольной группой 2).

Радиус лимфоцитов, измеренный рандомизированно без разделения на субпопуляции, также отражает внутренние изменения в системе лимфопоэза: при снижении общей численности лимфоцитов (2-я неделя, опытная группа 1) он возрастает относительно контрольной группы 1 на 7% (достоверно), а на фоне относительного лимфоцитоза (7-я неделя, опыт 2) — наоборот, снижается на 9% (также достоверно). О качественных изменениях в исследуемой популяции клеток иммунной системы в процессе развития патологии свидетельствуют различия между двумя опытными группами в 16% ( $p < 0,001$ ).

В системе эритрона значимых изменений под воздействием иммунотоксиканта не выявлено (табл. 2).

Количество клеток красной крови к окончанию эксперимента увеличивается в обеих группах, при этом во второй опытной — достоверно на 10% (опыт 1 / опыт 2). Как следствие — отмечается достоверное увеличение гемоглобина и гематокрита у животных, сами же эритроциты в сравниваемых группах и сериях значительно не различаются по своим морфологическим признакам и пигментному составу.

Изменения, затронувшие систему тромбоцитов под воздействием адьюванта Фрейнда, представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что аутоиммунная патология сопровождается стойким увеличением тромбоцитов в крови — на 18-25% (относительно контроля, отличия достоверные). В качествен-

**ТАБЛИЦА 2. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИВОТНЫХ: КРАСНЫЙ РОСТОК**

TABLE 2. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ANIMALS: RED BLOOD CELLS

Исследуемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Эритроциты, $10^{12}/л$ Red blood cells, $10^{12}/L$	8,30±0,36	8,55±0,21	9,03±0,19	9,44±0,15 <sup>^^</sup>
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	143,50±2,55	142,00±2,46	143,13±6,12	153,25±2,37 <sup>^^</sup>
Гематокрит, л/л Hematocrit, L/L	0,396±0,018	0,427±0,007	0,425±0,018	0,460±0,008 <sup>^^</sup>
Средний объем эритроцита, фл Mean corpuscular volume, fl	48,56±0,70	49,47±0,59	45,93±1,15	48,83±0,61
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг Mean corpuscular hemoglobin, pg	16,18±0,23	16,43±0,16	15,71±0,44	16,30±0,16
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л Mean corpuscular hemoglobin concentration, g/L	334,38±1,51	332,50±1,10	337,50±0,76	333,63±1,27 <sup>#</sup>
Ширина распределения эритроцитов по объему, % Red cell distribution width, %	15,53±0,09	15,91±0,39	16,23±0,56	15,74±0,26

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ном отношении форменные элементы у опытных животных характеризуются микроцитозом — их объем снижается на 13-18% по сравнению с грызунами контрольной группы. Снижение среднего объема кровяных пластинок сопровождается также уменьшением коэффициента их анизотропии на 30-58% относительно группы сравнения.

Биохимические изменения, затрагивающие систему крови в условиях формируемой патологии, отражены в таблице 4.

Согласно представленным в таблице 4 результатам исследований, системные нарушения иммунитета проявляются патобиохимическими сдвигами в клетках крови. Прежде всего это проявляется активацией процессов перекисного окисления липидов: содержание первичных продуктов перекисной деструкции мембран (гидроперекисей) увеличивается на 7% (2-я неделя), а вторичных (МДА) — на 32-37% (2-я и 7-я недели соответственно). Компенсаторное повышение активности каталазы ко второй неделе на 10% не позволяет купировать наступление оксидативного стресса, а к 7-й неделе стрессорные нагрузки приводят к истощению резервов организма и спаду энзиматической активности хромопротеида относительно контрольных животных (опыт 2 и контроль 2 соответственно).

Активность ключевых ферментов, отвечающих за энергообеспечение лимфоцитов, в условиях патологии претерпевает значительные изменения: ЛДГ к окончанию второй недели увеличивается на 6,5%, а затем снижается на 43% относительно контроля; активность СДГ на протяжении всего периода наблюдений остается повышенной относительно контрольных животных на 49-51%.

Рентгенографически выявлено, что суставный аппарат животных опытной группы к окончанию 7-й недели эксперимента характеризуется неравномерным сужением суставных щелей, кистовидными просветлениями в головках костей и их субхондральным склерозом (рис. 1).

Костно-мышечный аппарат животных контрольной группы без видимых патологических изменений.

## Обсуждение

Использование полного адьюванта Фрейнда в практике лабораторного моделирования широкого спектра аутоиммунных патологий: ревматоидного артрита, миокардита, увеита, энцефаломиелита и др. [11, 14, 17], обусловлено смещением баланса в сторону Th1-клонов, потенцирующих реакции гиперчувствительности замедленного типа в организме. Реализованная в данной работе схема введения полного адьюванта Фрейнда способствовала преимущественному формированию ревматоидного артрита, имеющего в основе патогенеза воздействие эпитопов микобактериального белка теплового шока *hsp65* на артритогенные клоны Т-лимфоцитов [13], провоцирующих острое околосуставное воспаление. Согласно полученным результатам, у животных опытной группы оказались сформированными клинические признаки нарушений в соединительной ткани — развитие склеротических изменений в головках костей.

В работе [20] отмечается, что адьювант-индуцированный ревматоидный артрит у крыс протекает в две фазы: первая (10-18 дни) — острое периартикулярное воспаление, синовит, отечность суставов; вторая (30 и более дни) — хроническое

ТАБЛИЦА 3. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЖИВОТНЫХ: МЕГАКАРИОЦИТАРНЫЙ РОСТОК

TABLE 3. HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF ANIMALS: MEGAKARYOCYTIC LINEAGE

Изучаемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л Platelets, 10 <sup>9</sup> /L	536±27	675±30**	509±29	605±26 <sup>#</sup>
Средний объем тромбоцита, фл Mean platelet volume, fl	6,75±0,16	6,00±0,07**	7,16±0,36	6,06±0,05 <sup>##</sup>
Тромбокрит, % Plateletcrit, %	0,359±0,016	0,407±0,063	0,335±0,017	0,369±0,015
Относительная ширина распределения тромбоцитов по объему, % Platelet distribution width, %	19,29±2,22	14,84±0,77	25,60±3,52	16,15±0,90 <sup>#</sup>

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 4. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ

TABLE 4. BIOCHEMICAL PARAMETERS OF BLOOD

Изучаемый параметр Tested parameter	2 недели 2 weeks		7 недель 7 weeks	
	Контроль 1 Control 1	Опыт 1 Experience 1	Контроль 2 Control 2	Опыт 2 Experience 2
Гидроперекиси, мкмоль/л Hydroperoxides, mmol/L	4,84±0,13	5,20±0,19	5,73±0,59	4,68±0,13 <sup>^</sup>
МДА в эритроцитах, мкмоль/л Malondialdehyde in red blood cells, mmol/L	30,17±0,85	48,18±1,66***	26,40±1,88	44,20±1,10###
Каталаза в эритроцитах, МЕ/г Нб × 10 <sup>4</sup> Catalase in red blood cells, IU/g Hb × 10 <sup>4</sup>	3,93±0,11	4,34±0,10*	5,25±0,15	5,04±0,12 <sup>^^^</sup>
ЛДГ лимфоцитов, у. е. Lactate dehydrogenase, c. u.	5,20±0,44	5,54±0,28	4,87±0,41	3,41±0,35 <sup>## ^^^</sup>
СДГ лимфоцитов, у. е. Succinate dehydrogenase of lymphocytes, c. u.	1,13±0,30	1,71±0,32	0,97±0,26	1,45±0,19

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

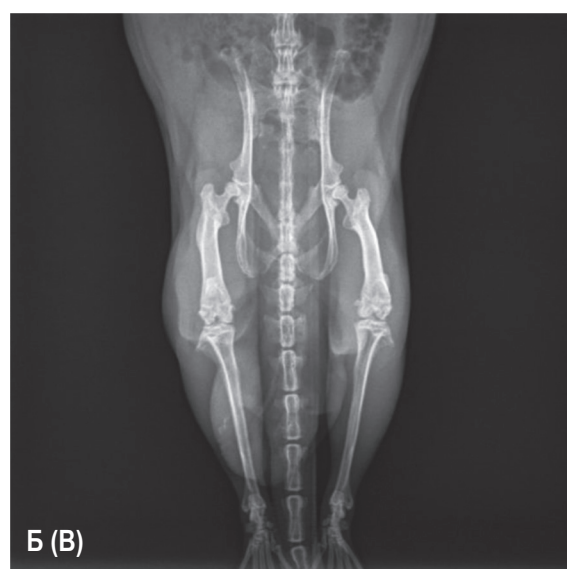
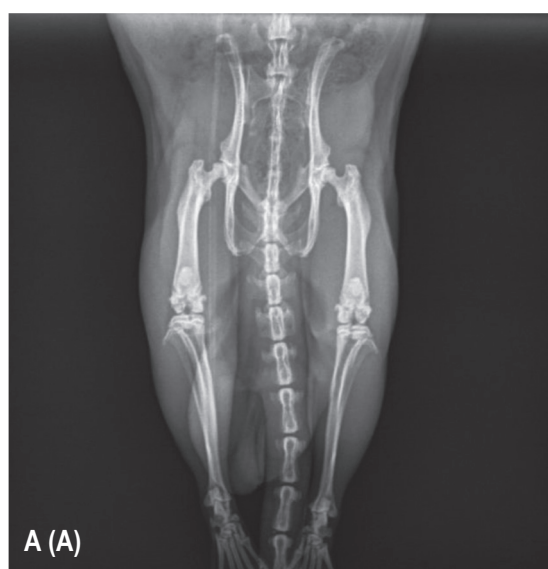


Рисунок 1. Рентгенографические исследования лабораторных животных (А – экспериментальное животное, Б – контрольное животное)

Figure 1. Radiological studies of laboratory animals (A, experimental animal; B, intact animal)

воспаление мягких околосуставных тканей, периостит и остеолитиз, анкилоз, что диагностируется инструментальными (МРТ), биохимическими и гистологическими методами исследований. Результаты наших исследований совпадают с описанной картиной и позволяют раскрыть ее более детально: на первом этапе выявлен острый воспалительный процесс, характеризующийся повышением общего количества лейкоцитов в крови, тромбоцитозом, окислительным стрессом на фоне активации ферментного звена антиоксидантной системы и усилением процессов энергообеспечения лимфоцитов; на втором этапе отмечается правый сдвиг в лейкоцитарной формуле, снижение признаков тромбоцитоза, сохраняющийся окислительный стресс с относительным ингибированием каталазы, уменьшение общей энергопродукции в лимфоцитах.

Высокая степень корреляции  $r_{xy} = 0,87$  между радиусом лимфоцитов и активностью в них ЛДГ свидетельствует о морфо-функциональных преобразованиях иммунокомпетентных клеток, которые в силу нарушенного метаболического профиля и последовавшего за ним микроцитоза могут оказываться несостоятельными и способствовать усилению патологических реакций аутоиммунитета.

Моделирование патологий на лабораторных животных позволяет глубже вскрыть механизмы развития аутоиммунных заболеваний, однако необходимо принимать во внимание межвидовые особенности. Так, в нашей работе выявлены изменения в лейкоцитарной формуле в процессе развития индуцированной патологии, в частности наблюдалось достоверное ( $p < 0,001$ ) снижение относительного содержания моноцитов: с 5,38% в контроле до 2,0% в опытной группе. Авторы работы [5] отмечают, что у детей с ювенильным артритом единственно фиксируемым изменением в лейкоцитарной формуле является увеличение количества моноцитов с 4,5% до 6,4% ( $p < 0,05$ ). Другой особенностью ревматоидного артрита у людей является сопутствующая заболеванию анемия, которая встречается у 36-65%

пациентов [1]. В наших исследованиях установлена обратная тенденция: развитие адъювант-индуцированного аутоиммунного ревматоидного артрита сопровождалось у подопытных крыс усилением эритропоэза и, как следствие, ростом содержания в крови гемоглобина, концентрация которого увеличивалась не только относительно контрольной группы, но и возрастала по мере прогрессирования заболевания (сравнение групп «опыт 1» и «опыт 2»).

При естественных колебаниях активности СДГ у животных контрольной группы (контроль 1, контроль 2), оцениваемых в 16%, у крыс опытной группы (2-я и 7-я недели) отмечено константное превышение скорости субстратного окисления сукцината на 50% (опыт/контроль), что может отражать внутренние закономерности энергообеспечения лимфоцитов при патологии. Расчет соотношений ЛДГ/СДГ показывает, что для контрольных крыс дыхательный коэффициент варьирует незначительно — от 4,6 до 5,0, в то время как для опытной группы расчетные значения составляют 3,2 (2-я неделя) и 2,4 (7-я неделя). Следовательно, по мере развития заболевания доля процессов гликолиза в общей биоэнергетике клетки значительным образом снижается, что неизбежно отражается на росте, пролиферации и дифференцировке лимфоцитов.

## Заключение

Нарушение механизмов иммунологической аутоотолерантности приводит к прогрессирующему снижению энергообеспечения в центральном эффекторном звене иммунной системы — лимфоцитах и сопровождается их микроцитозом. Патология протекает на фоне оксидативного стресса и осложняется рисками тромбообразования вследствие повышенного содержания в крови тромбоцитов. В этой связи в схемы лечения и профилактики аутоиммунных заболеваний целесообразно включать препараты, устраняющие энергодефицит и способствующие коррекции антиоксидантного статуса и системы гемостаза организма.

## Список литературы / References

1. Ватутин Н.Т., Калинкина Н.В., Смирнова А.С. Анемия при ревматоидном артрите // Вестник Харьковского национального университета. Серия «Медицина», 2010. Т. 19, № 898. С. 76-82. [Vatutin N.T., Kalinkina N.V., Smirnova A.S. Anemia in rheumatoid arthritis. *Vestnik Kharkovskogo natsionalnogo universiteta. Seriya "Meditsina" = Bulletin of the Kharkiv National University. Series "Medicine"*, 2010, Vol. 19, no. 898, pp. 76-82. (In Russ.)]
2. 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»; опубликована



но 20.08.2009. [Kondrashova M.N., Zakharchenko M.V., Khunderiyakova N.V., Maevsky E.I. Cytobiochemical method of determining activity of succinate dehydrogenase, endogenic succinic acid oxidation, signal action of micromolecular concentrations of succinic acid, its application for quantitative evaluation of level of adrenergic regulation in organism, medium and set for method realisation. Patent RU 2364868 C1].

3. Методы клинических лабораторных исследований / Под ред. В.С. Камышникова. 8-е изд. М.: МЕД-пресс-информ, 2016. 736 с. [Methods of clinical laboratory research. Ed. V.S. Kamyshnikov. 8<sup>th</sup> ed.]. Moscow: MEDpress-inform, 2016. 736 p.

4. Москалец О.В. Роль инфекций в развитии аутоиммунных заболеваний // Казанский медицинский журнал, 2017. Т. 98, № 4. С. 586-591. [Moskalets O.V. Role of infections in autoimmune disease development. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2017, Vol. 98, no. 4, pp. 586-591. (In Russ.)]

5. Пашнина И.А., Криволапова И.М., Козлова Е.С., Скоробогатова О.В. Иммунологические параметры у детей с артритом различной этиологии // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 4-5. С. 369-370. [Pashnina I.A., Krivolapova I.M., Kozlova E.S., Skorobogatova O.V. Immunological parameters in children with arthritis of various etiologies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 4-5, pp. 369-370. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-4-5-369-370.

6. Справочник по лабораторным методам исследования / Под ред. Л.А. Даниловой. М.: Питер, 2003. 733 с. [Handbook of laboratory research methods. Ed. L.A. Danilova]. Moscow: Piter, 2003. 733 p.

7. Трошина Е.А., Юкина М.Ю., Нуралиева Н.Ф., Мокрышева Н.Г. Роль генов системы HLA: от аутоиммунных заболеваний до COVID-19 // Проблемы эндокринологии, 2020. Т. 66, № 4. С. 9-15. [Troshina E.A., Yukina M.Yu., Nuralieva N.F., Mokrysheva N.G. The role of HLA genes: from autoimmune diseases to covid-19. *Problemy endokrinologii = Endocrinology Problems*. 2020, Vol. 66, no. 4, pp. 9-15. (In Russ.)]

8. Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю. Биохимическая гетерогенность Т-лимфоцитов // Вестник витебского государственного медицинского университета, 2018. Т. 17, № 6. С. 7-17. [Sheibak V.M., Pavlyukovets A.Yu. Biochemical heterogeneity of T lymphocytes. *Vestnik vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Vitebsk State Medical University Bulletin*, 2018, Vol. 17, no. 6, pp. 7-17. (In Russ.)]

9. Almeida L., Lochner M., Berod L., Sparwasser T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 5, pp. 514-524.

10. Anaya J.M., Shoenfeld Y., Rojas-Villarraga A., Levy R.A., Cervera R., editors. Autoimmunity: from bench to bedside [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press. 2013. 856 p.

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, Vol. 2016, 1459394. doi: 10.1155/2016/1459394.

12. Askanase A.D., Khalili L., Buyon J.P. Thoughts on COVID-19 and autoimmune diseases. *Lupus Sci. Med.*, 2020, Vol. 7, no. 1, 000396. doi: 10.1136/lupus-2020-000396.

13. 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, pp. 849-860.

14. Cui X., Wang R., Bian P., Wu Q., Seshadri V.D.D., Liu L. Evaluation of antiarthritic activity of nimbolide against Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2019, Vol. 47, no. 1, pp. 3391-3398.

15. Domblides C., Lartigue L., Faustin B. Metabolic Stress in the immune function of t cells, macrophages and dendritic cells. *Cells*, 2018, Vol. 7, no. 7, 68. doi: 10.3390/cells7070068.

16. Ehrenfeld M., Tincani A., Andreoli L., Cattalini M., Greenbaum A., Kanduc D., Alijotas-Reig J., Zinserling V., Semenova N., Amital H., Shoenfeld Y. COVID-19 and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 8, 102597. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102597.

17. 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, pp. 163-176.

18. Gerriets V.A., Rathmell J.C. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 168-173.

19. Halpert G., Shoenfeld Y. SARS-CoV-2, the autoimmune virus. *Autoimmun. Rev.*, 2020, Vol. 19, no. 12, 102695. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102695.

20. Jacobson P.B., Morgan S.J., Wilcox D.M., Nguyen P., Ratajczak C.A., Carlson R.P., Harris R.R., Nuss M. A new spin on an old model: in vivo evaluation of disease progression by magnetic resonance imaging with respect to standard inflammatory parameters and histopathology in the adjuvant arthritic rat. *Arthritis Rheum.*, 1999, Vol. 42, no. 10, pp. 2060-2073.

21. Liu M., Gao Y., Zhang Y., Shi S., Chen Y., Tian J. The association between severe or dead COVID-19 and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.*, 2020, Vol. 81, no. 3, pp. 93-95.

22. Lorente L., Martín M.M., Franco A., Barrios Y., Cáceres J.J., Solé-Violán J., Perez A., Ramos J.A.M.Y., Ramos-Gómez L., Ojeda N., Jiménez A., Working Group on COVID-19 Canary ICU; Annex. Members of the BIOMEPOC group. HLA genetic polymorphisms and prognosis of patients with COVID-19. *Med. Intensiva (Engl. Ed.)*, 2021, Vol. 45, no. 2, pp. 96-103.

23. Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G., Michalek R.D., Rudolph M.C., Deoliveira D., Anderson S.M., Abel E.D., Chen B.J., Hale L.P., Rathmell J.C. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 61-72.

24. Maciver N.J., Jacobs S.R., Wieman H.L., Wofford J.A., Colloff J.L., Rathmell J.C. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 84, no. 4, pp. 949-957.
25. Nasonov E., Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Autoimmune rheumatic diseases: results and prospects for esearches. *Rheumatol. Sci. Pract.*, 2015, Vol. 53, no. 3, pp. 230-237.
26. Yang Z., Matteson E.L., Goronzy J.J., Weyand C.M. T-cell metabolism in autoimmune disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2015, Vol. 17, no. 1, 29. doi: 10.1186/s13075-015-0542-4.
27. Zhang P., Lu Q. Genetic and epigenetic influences on the loss of tolerance in autoimmunity. *Cell. Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 15, no 6, pp. 575-585.
28. Zheng Y., Collins S.L., Lutz M.A., Allen A.N., Kole T.P., Zarek P.E., Powell J.D. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 4, pp. 2163-2170.

---

**Авторы:**

**Скупневский С.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

**Пухова Е.Г.** — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

**Бадтиева А.К.** — к.б.н., научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

**Рурба Ф.К.** — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

**Батагова Ф.Э.** — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

**Фарниева Ж.Г.** — младший научный сотрудник Института биомедицинских исследований — филиал ФГБУН «Федерального научного центра “Владикавказский научный центр Российской академии наук”», г. Владикавказ, Республика Северная Осетия — Алания, Россия

---

**Authors:**

**Skupnevsky S.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

**Pukhaeva E.G.**, Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

**Badatiev A.K.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

**Rurba F.K.**, Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

**Batagova F.E.**, Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation

**Farnieva Z.G.**, Junior Research Associate, Institute of Biomedical Investigations, Affiliation of Vladikavkaz Research Centre, Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia — Alania, Russian Federation