

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА МОДЕЛИ АДЬЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННОГО АРТРИТА КРЫС

Иманаева А.Я., Залялютдинова Л.Н., Цыплаков Д.Э.

ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Минздрава России», Казань, e-mail: a.y.imanaeva@gmail.com

Липоевая кислота является уникальным мощным антиоксидантом, обладающим выраженной противовоспалительной активностью. Целью исследования явилось изучение антиревматоидной активности липоевой кислоты в сравнении с диклофенаком натрия при пероральном применении на модели адьювантного артрита крыс. В диапазоне доз, соответствующих от 1/10 до 1/200 ЛД<sub>50</sub>, наиболее эффективной оказалась 1/100 ЛД<sub>50</sub>. Поэтому в сравнительном исследовании липоевая кислота применялась в дозе, соответствующей 1/100 ЛД<sub>50</sub>, диклофенак натрия – в среднеэффективной дозе. В качестве критериев оценки эффективности терапии были выбраны онкометрический метод и инфракрасная термография в динамике, а также патоморфологическое исследование голеностопных суставов в конце эксперимента. Нами было выявлено, что липоевая кислота при пероральном применении значительно уменьшает адьювант-индуцированный отек и гипертермию лап крыс и по эффективности достоверно превосходит препарат сравнения. Курсовое применение липоевой кислоты приводит к значительному подавлению патоморфологических проявлений адьювантного артрита, а именно разрастания синовиальной оболочки и околосуставного остеопороза. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности клинической фазы изучения липоевой кислоты в качестве потенциального препарата для лечения ревматоидного артрита.

**Ключевые слова:** липоевая кислота, адьювантный артрит, ИК-термография, патоморфология

## STUDY OF ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF LIPOIC ACID IN ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIC RATS

Imanaeva A.Y., Zalyalyutdinova L.N., Tsyplakov D.E.

Kazan State Medical University, Kazan, e-mail: a.y.imanaeva@gmail.com

Lipoic acid is a unique potent antioxidant with a pronounced antiinflammatory activity. We have designated this study to evaluate antirheumatoid activity of lipoic acid in comparison with sodium diclofenac at oral administration in rat adjuvant-induced arthritis. At lipoic acid doses ranging from 1/10 DL<sub>50</sub> to 1/200 DL<sub>50</sub>, a strongest effect was with 1/100 DL<sub>50</sub>. For this reason in a comparative study the dose used for lipoic acid was 1/100 LD<sub>50</sub>, and a mean effective dose for sodium diclofenac. The efficacy of therapy was evaluated by means of the following tests: oncometry for paw volume, infrared thermography for local surface temperature and pathomorphological staining of involved joints. We found that lipoic acid at oral administration down-regulates adjuvant-induced inflammation signs, i.e. paw oedema and hyperthermia in a higher extent than sodium diclofenac. Pathomorphological study showed that lipoic acid markedly down-regulates major features of adjuvant arthritis – synovial hyperplasia and bone destruction. These results prove the necessity of further clinical phase of studies of lipoic acid antirheumatoid activity in order to invent a new drug for rheumatoid arthritis with high efficacy and safety.

**Keywords:** lipoic acid, adjuvant arthritis, IR-thermography, pathomorphology

Роль оксидативного стресса в патогенезе РА не вызывает сомнений [5]. В настоящее время появляются данные о наличии антиревматоидных свойств различных антиоксидантов, в частности, селена, фуллеренов, витаминов А, С и Е, омега-3-полиненасыщенных жирных кислот [4, 7].

**Цель исследования** – изучение противовоспалительной активности антиоксиданта липоевой кислоты в сравнении с диклофенаком натрия на модели адьювантного артрита крыс при пероральном и местном применении.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования явилась субстанция липоевой кислоты, синтезированная в ОАО «ICN MAP-БИОФАРМ» [ФСП 420035029200]. Проведенные исследования антиревматоидной активности липоевой кислоты и препарата сравнения диклофенака натрия были представлены на экспертизу и одобрены Локальным этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета.

Оценка влияния липоевой кислоты на аутоиммунное воспаление проводилась на модели адьювантного артрита крыс, предложенной В.В. Newbould [6]. В экспериментах использовались 246 половозрелых нелинейных крыс массой 230 ± 15 г. Воспалительная реакция моделировалась путем субплантарного введения в правую заднюю лапу крыс 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда (Sigma). Исследуемые вещества (суспензия липоевой кислоты в диапазоне доз от 1/10 до 1/200 ЛД<sub>50</sub> в крахмальном растворе, водный раствор диклофенака натрия в среднеэффективной дозе) вводились внутривентрикулярно с помощью зонда ежедневно однократно с 12-го дня эксперимента в течение 14 дней. Выраженность воспалительной реакции оценивалась на 0, 3, 6, 10, 15, 20, 25-й дни эксперимента в динамике: степень воспалительного отека лап оценивалась в динамике онкометрически, а воспалительной гипертермии – в динамике с помощью ИК-термографии при комнатной температуре в закрытом помещении с применением компьютерного тепловизора ИРТИС-2000 С (г. Москва, сертификат № 29469 от 2007 г.). На термограммах в области, анатомически соответствующей области голеностопных суставов лап крыс, выделялся квадрат со стороны

5 мм, внутри которого программой IR Preview высчитывалась средняя температура.

Патоморфологическое исследование. Животные, ткани и органы которых должны были подвергнуться патоморфологическому исследованию, получали полноценный уход вплоть до момента эвтаназии, содержались в отдельном помещении и не были свидетелями умерщвления других животных. Забой осуществлялся под поверхностным эфирным наркозом в специальной камере в теплом помещении. Изготовление гистологических препаратов проводили по методике, разработанной для костных тканей [2, 3]. Для этого осуществлялась фиксация материала в 10% нейтральном формалине, затем следовала промывка в проточной водопроводной воде в течение 24 часов и декальцинация в смеси из 100 мл 90% муравьиной кислоты, 80 мл 40% соляной кислоты и 820 мл водопроводной воды. Жидкость меняли каждые 48 часов. Декальцинация продолжалась в среднем 10–15 дней. После промывки в течение 24 часов в водопроводной воде материал обезвоживали в батарее спиртов возрастающей концентрации 70% (3 порции), 96% (две порции), 100% (одна порция), где выдерживали 1 сутки в каждой порции. Обезвоженные образцы последовательно помещали в раствор спирта и хлороформа 1:1 (3–5 часов), две порции хлороформа (по 1 часу) и помещали в в термостат при 37°C в смесь хлороформа и парафина 1:1 (2–3 часа). Затем в термостате при 56°C материал пропитывался в двух порциях парафина (1 час в первой и 24 часа во второй). По окончании проводки осуществлялась заливка в парафин, охлаждение и изготовление срезов толщиной 7–10 мкм на микротоме. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, а также пикрофуксином по ван Гизону. Микроскопическое изучение объектов проводилось с использованием микроскопа Axioscop «Цейс».

Полученные результаты обрабатывались статистически с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows с вычислением средней арифметической, ошибки средней, t-критерия Стьюдента; критерием достоверности отличий являлось значение  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

В контрольной группе животных первичная воспалительная реакция – отек правой лапы – начинала формироваться на 3-й день после введения адьюванта и сохранялась до конца эксперимента. Вторичная иммунологическая реакция – воспаление контрлатеральной (левой) задней лапы – начинала формироваться на 11-й день эксперимента и достигала максимума к концу эксперимента (на 25-й день).

Введение в качестве плацебо дистиллированной воды и крахмального раствора животным с моделированным артритом не приводило к достоверному снижению отека лап. Прирост объема правой лапы по сравнению с исходным к концу эксперимента был принят за 100% первичной воспалительной реакции. Прирост объема левой лапы к концу эксперимента по сравнению с исходным был принят за 100% вторичной иммунологической реакции (табл. 1).

При изучении специфической активности липоевой кислоты в дозах, соответствующих от 1/10 до 1/200 ЛД<sub>50</sub>, было выявлено, что липоевая кислота наиболее эффективна в дозе, соответствующей 1/100 ЛД<sub>50</sub> [1].

При сравнении антиревматоидной активности липоевой кислоты и диклофенака натрия было выявлено, что на 25-е сутки диклофенак натрия достоверно снижал первичную воспалительную реакцию на 40%, вторичную иммунологическую реакцию – на 24%. Липоевая кислота достоверно уменьшала воспаление в правой лапе на 89%, а в контрлатеральной – лапе на 92%.

**Таблица 1**

Влияние липоевой кислоты и диклофенака натрия при пероральном применении на прирост объема правой и левой лап крыс с адьювантным артритом к концу эксперимента, мл

Группа	Контроль		Диклофенак натрия, 8 мг/кг		Липоевая кислота, 11 мг/кг	
	М ± m <sub>a</sub>	%	М ± m <sub>a</sub>	%	М ± m <sub>a</sub>	%
Правая лапа	1,78 ± 0,279	100	1,11 ± 0,154*	60	0,20 ± 0,035* **	11
Левая лапа	1,13 ± 0,124	100	0,86 ± 0,208*	76	0,09 ± 0,012* **	8

**Примечания:**

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контрольной группой;

\*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой животных, леченных диклофенаком натрия.

Методом ИК-термографии было выявлено, что на 3-й день после введения адьюванта отмечается повышение температуры лапы в области введения полного адьюванта Фрейнда в среднем на  $4,8 \pm 0,63^\circ\text{C}$  (рис. 1), на 11-й день эксперимента нами выявлена гипертермия в контрлатеральной

лапе и прирост средней температуры составил  $4,2 \pm 0,51^\circ\text{C}$  (рис. 2).

Курсовое применение липоевой кислоты в дозе 10 мг/кг и диклофенака натрия в дозе 8мг/кг привело к достоверному снижению адьювант-индуцированной гипертермии обеих лап. Так, курсовое применение ди-

клофенака натрия достоверно снизило среднюю температуру в правой задней конечности на 46%, в левой конечности – на 45%. Курсовое применение липоевой кислоты привело к уменьшению гипертермии, со-

провождавшей первичную воспалительную реакцию, на 70%, а гипертермии, сопровождающей вторичную иммунологическую реакцию, на 74%, что достоверно превосходило эффективность диклофенака натрия.

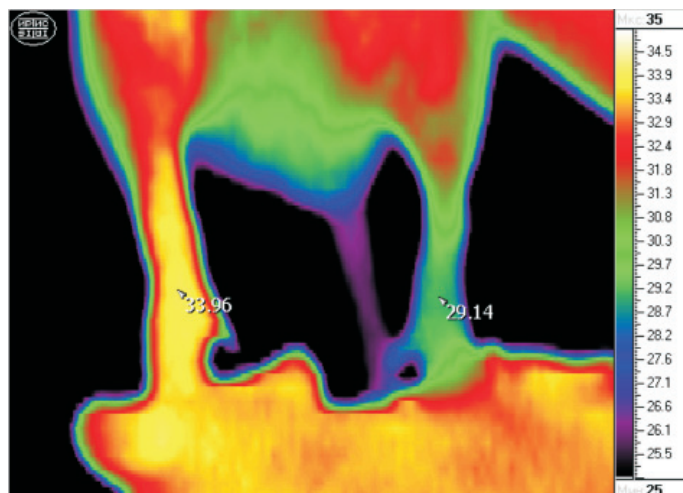


Рис. 1. ИК-термограмма лап крыс на 3-й день после введения полного адьюванта Фрейнда. Развитие первичной воспалительной реакции

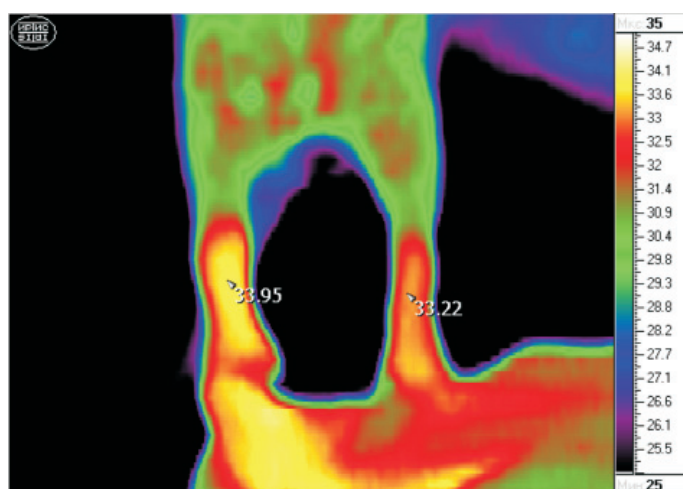


Рис. 2. ИК-термограмма лап крыс на 11-й день после введения полного адьюванта Фрейнда. Развитие вторичной иммунологической реакции

Таблица 2

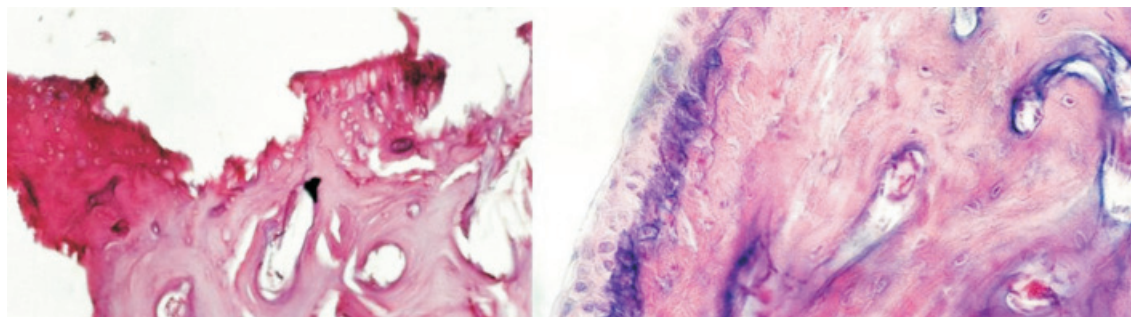
Влияние липоевой кислоты и диклофенака натрия при пероральном применении на прирост температуры правой и левой лап крыс с адьювантным артритом к концу эксперимента, °С

Группа	Контроль		Диклофенак натрия, 8 мг/кг		Липоевая кислота, 11 мг/кг	
	$M \pm m_a$	%	$M \pm m_a$	%	$M \pm m_a$	%
Правая лапа	$4,6 \pm 0,49$	100	$2,5 \pm 0,43 *$	54	$1,4 \pm 0,21 * **$	30
Левая лапа	$4,2 \pm 0,32$	100	$2,3 \pm 0,39 *$	55	$1,1 \pm 0,25 * **$	26

Патоморфологическое исследование показало, что введение адьюванта Фрейнда привело к развитию выраженной воспалительной реакции, захватывающей как сам сустав, так и периартикулярные ткани, включая кожный покров. В дерме и подлежащих тканях обнаруживались очаговые или диффузные лимфогистиоцитарные инфильтраты. Наблюдалась отслойка эпидермиса, а в тяжелых случаях – десквамация эпителия с некрозом дермы, включая ее железы и волосные фолликулы. Суставная поверхность кости имела неровную выстилку с наличием дефектов, образованных за счет деструкции хряща, которые чередовались с участками пролиферации хрящевой ткани (рис. 3). В ряде наблюдений, при наличии значительных эрозий хряща, в подлежащей кости имели место явления остеопороза и некротические изменения. Синовиальная оболочка была резко утолщена, отечна и гиперемирована. Структура ее, как правило, не определялась из-за тотальной инфильтрации ее лимфоцитами, плазмацитами и клетками макрофагального ряда. В некоторых случаях в воспалительном инфильтрате преобладали нейтрофилы вплоть до образования обширных лейкоцитарно-некротических масс с деструкцией синовиальной оболочки.

Пероральное применение диклофенака натрия существенно снижало воспалительную реакцию в суставе. Несмотря на отсутствие грубых изменений кожного покрова, в некоторых наблюдениях определялись очаги некроза в периартикулярных тканях.

Пероральное применение липоевой кислоты также приводило к уменьшению или отсутствию воспаления как в суставе, так и в периартикулярных тканях. Кожный покров имел обычную гистологическую структуру. Хрящевая поверхность была гладкой, с четко определяемыми зонами и наличием неизменных хондроцитов. Подлежащая костная ткань была представлена компактной костью с наличием небольших грубоволокнистых фрагментов балочного строения. В случаях деструкции кости в результате воспалительной реакции применение липоевой кислоты сопровождалось восстановлением костной ткани. Это реализовалось путем разрастания соединительной ткани, трансформации ее в хрящ, из которого в свою очередь образовывались новые костные балки. Синовиальная оболочка в целом имела нормальное гистологическое строение (рис. 3). Только в единичных случаях сохранялись явления умеренного отека и незначительная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация.



*Рис. 3. Слева – дефекты хрящевой выстилки: чередование зон деструкции и пролиферации хряща с оголением участков подлежащей кости в контрольной группе. Окраска гематоксилином и эозином. x200. Справа – нормальная трехслойная хрящевая выстилка и неизменная подлежащая костная ткань в группе животных, леченных липоевой кислотой. Окраска гематоксилином и эозином. x400*

### Заключение

Таким образом, нами было впервые показано, что липоевая кислота при пероральном применении на модели адьювант-индуцированного артрита крыс эффективно подавляет развитие как первичной воспалительной, так и вторичной иммунологической реакции, устраняет повреждение суставных тканей, в частности,

синовиальной оболочки, суставного хряща и костной ткани, вызванных введением адьюванта Фрейнда, и по эффективности превосходит эталонное противовоспалительное средство.

### Список литературы

1. Залялотдинова Л.Н., Сабирова (Иманаева) А.Я. Влияние липоевой кислоты на течение адьювантного артрита // Фармакология и токсикология фосфорорганических соеди-



нений и других биологически активных веществ, материалы Российской конференции, посвященной 75-летию И.А. Студенцовой. – 2008. – № 4. – С. 49–50.

2. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. – СПб.: Кроф, 2005. – С. 48.

3. Пахт А.В. Особенности обработки костной ткани // Библиотека патологоанатома (научно-практич. журнал) / А.В. Пахт, Н.М. Манизер. – СПб., 2008. – С. 6–11.

4. Canter P.H., Wider B. and Ernst E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials // *Rheumatology*. – 2007. – № 46. – С. 1223–1233

5. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis // *Arthritis Res Ther*. – 2004. – № 6. – С. 265–278.

6. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant // *Brit. J. Pharmacol.* – 1963. – № 21. – С. 127–136.

7. Rosenbaum C.C., O'Mathúna D.P., Chavez M., Shields K. // *Altern Ther Health Med*. – 2010. – № 316(2). – С. 32–40.

### References

1. Zalyalyutdinova L.N., Sabirova A.Ya. Vliyaniye lipovoy kisloty na techeniye adyuvantnogo artrita [Influence of lipoic acid on adjuvant arthritis]. *Farmakologiya i toksikologiya fosfororganicheskikh soedineniy I drugikh biologicheskikh aktivnykh veshchestv*. Mat. konf.; 2008; no. 4

2. Korzhevskiy D.E. *Kratkoe izlozhenie osnov gistologicheskoy tekhniki dlya vrachey I laborantov-gistologov* [Brief review of the basics of histological technics for doctors and laboratory assistant histologists]. Saint-Petersburg, Krof Publ., 2005; 48p.

3. Pakht A.V., Manizer N.M. *Osobennosti obrabotki kostnoy tkani*. Biblioteka patologoanatomata (nauchno-praktich. zhurnal). 2008; pp. 6–11.

4. Canter P.H., Wider B. and Ernst E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology* 2007;46:1223–1233

5. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004, 6:265–278

6. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Brit. J. Pharmacol.* (1963), 21, 127–136

7. Rosenbaum C.C., O'Mathúna D.P., Chavez M., Shields K. *Altern Ther Health Med*. 2010 Mar-Apr;16(2):32–40

### Рецензенты:

Гараев Р.Р., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии, ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ Минздрава России», г. Казань;

Семина И.И., д.м.н., профессор, заведующая ЦНИЛ, ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ Минздрава России», г. Казань.

Работа поступила в редакцию 02.04.2013.