

ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В МОДЕЛИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

МАКАЛИШ ТАТЬЯНА ПАВЛОВНА, ORCID ID: 0000-0003-1884-2620, Scopus Author ID 57204727287, Researcher ID ABC-8226-2020, RSCI Author ID 891400, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Республика Крым, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7, корп.5. Тел. +7 978 7853919. E-mail: makalisht@mail.ru

ГОЛОВКИН ИЛЬЯ ОЛЕГОВИЧ, ORCID ID: 0000-0002-3578-5130, Scopus Author ID 57212007931, Researcher ID ABA-5305-2020, RSCI Author ID 1099671, младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Республика Крым, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7, корп.5. Тел. +7 978 9970396. E-mail: golovkin.io.1996@gmail.com

МАСЛОВА ГАЛИНА ВЛАДИМИРОВНА, ORCID ID: 0000-0002-2538-4309, лаборант-исследователь Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Республика Крым, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7, корп.5. Тел. +7 978 5777135. E-mail: nonstop2791@yandex.ru

ПИЛЯВСКИЙ НИКОЛАЙ НИКОЛАЕВИЧ, ORCID ID: 0009-0004-4541-5776, лаборант-исследователь Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Республика Крым, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7, корп. Тел. +7 978 1439992. E-mail: kolyapilyavsky@gmail.com

МАРУЛОВА АЛИНА ВЛАДИМИРОВНА, ORCID ID: 0009-0000-4570-2848, лаборант-исследователь Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», Республика Крым, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7, корп.5. Тел. +7 978 5153379. E-mail: alina.marulova@gmail.com

Реферат. Введение. Несмотря на обширное количество лекарственных препаратов против ревматоидного артрита, до сих пор ведутся поиски новых методов и мишеней для лечения этого заболевания. Помимо изменений в суставах, при ревматоидном артрите существенно страдает и костная ткань. **Цель.** Изучить гистологические особенности костной ткани в модели адьювант-индуцированного артрита, а также экспрессии матриксных металлопротеиназ 1 и 3 после применения антисмысловых олигонуклеотидов. **Материалы и методы.** Модель ревматоидного артрита получили путем введения полного адьюванта Фрейнда в основание хвоста лабораторных крыс. Для терапии полученного заболевания использовали тоцилизумаб и антисмысловые олигонуклеотиды, блокирующие синтез фактора некроза опухоли и интерлейкина 6 как по отдельности, так и вместе. Изучали морфологические изменения в хвостовых позвонках крыс, методом иммуногистохимии определяли активность матриксных металлопротеиназ в различных популяциях клеток. Для выявления статистически значимых отличий между группами использовали методы Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. **Результаты и их обсуждение.** В модели ревматоидного артрита выявлены существенные эрозии костной и хрящевой ткани, обильный воспалительный инфильтрат вокруг кости и в костномозговой полости, замедление роста костей. Применение антисмысловых олигонуклеотидов существенно затормозило развитие болезни. Уровень металлопротеиназ в костной ткани оказался ниже в некоторых экспериментальных группах по сравнению с группой без лечения. **Заключение.** Применение антисмысловых олигонуклеотидов замедляет развитие воспаления, а также препятствует резорбции костной ткани в поврежденных костях. Наиболее эффективны в этом оказались инъекции олигонуклеотида, блокирующего синтез интерлейкина-6. Комбинация двух олигонуклеотидов показала себя наиболее эффективной в снижении активности матриксных металлопротеиназ, реорганизующих внеклеточный матрикс кости при артрите, а также снижение синтеза фактора некроза опухоли.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, антисмысловые олигонуклеотиды, костная ткань.

Для ссылки: Макалиш Т.П., Головкин И.О., Маслова Г.В., [и др.]. Особенности ремоделирования костной ткани при применении антисмысловых олигонуклеотидов в модели ревматоидного артрита // Вестник современной клинической медицины. – 2024. – Т. 17, вып. 6. – С.146–153. DOI: 10.20969/VSKM.2024.17(6).146-153.

FEATURES OF BONE REMODELING DURING THE USE OF ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES IN A RHEUMATOID ARTHRITIS MODEL

MAKALISH TATYANA P., ORCID ID: 0000-0003-1884-2620, Scopus Author ID 57204727287, Researcher ID ABC-8226-2020, RSCI Author ID 891400, Cand. sc. biol., Associate Professor, Senior Researcher at the Central Research Laboratory, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 5/7 Lenina Ave., 295051 Simferopol, Russia. Tel. +7 978 7853919. E-mail: makalisht@mail.ru

GOLOVKIN ILYA O., ORCID ID: 0000-0002-3578-5130, Scopus Author ID 57212007931, Researcher ID ABA-5305-2020, RSCI Author ID 1099671, Junior Researcher at the Central Research Laboratory, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 5/7 Lenina Ave., 295051 Simferopol, Russia. Tel.: +7 978 9970396. E-mail: golovkin.io.1996@gmail.com

MASLOVA GALINA V., ORCID ID: 0000-0002-2538-4309, Assistant Professor at the Central Research Laboratory, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 5/7 Lenina Ave., 295051 Simferopol, Russia. Tel.: +7 978 5777135. E-mail: nonstop2791@yandex.ru

PILYAVSKY NIKOLAY N., ORCID ID: 0009-0004-4541-5776, Assistant at the Central Research Laboratory, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 5/7 Lenina Ave., 295051 Simferopol, Russia. Tel.: +7 978 1439992.

E-mail: kolyapilyavsky@gmail.com

MARULOVA ALINA V., ORCID ID: 0009-0000-4570-2848, Assistant at the Central Research Laboratory, V.I. Vernadsky Crimean Federal University, 5/7 Lenina Ave., 295051 Simferopol, Russia. Tel.: +7 978 5153379.

E-mail: alina.marulova@gmail.com

Abstract. Introduction. Despite the vast number of drugs against rheumatoid arthritis, new methods and targets are still being searched for to treat this disease. In addition to changes in the joints, bone tissue also suffers significantly from rheumatoid arthritis. **Aim.** To research the histological features of bone tissue in the adjuvant-induced arthritis model, as well as the expression of matrix metalloproteinase 1 and 3 after the use of antisense oligonucleotides. **Materials and Methods.** Rheumatoid arthritis model was obtained by introducing the complete adjuvant Freund into the base of the tail of laboratory rats. For the therapy of the resulting disease, Tocilizumab and antisense oligonucleotides were used, which block the synthesis of the factor of tumor necrosis and interleukin 6, both separately and together. The morphological changes in the tails of rats and the activity of matrix metalloproteinase in various cell populations were investigated. To identify statistically significant differences between the groups, the Kruskal — Wallis test and Mann–Whitney U test were used. **Results and Discussion.** In the rheumatoid arthritis model, significant erosion of bone and cartilage tissue, abundant inflammatory infiltrate around the bone and in the bone marrow cavity, and slower bone growth were revealed. The use of antisense oligonucleotides significantly slowed down the progression of the disease. Levels of metalloproteinases in bone tissue were lower in some experimental groups compared to the untreated group. **Conclusions.** The use of antisense oligonucleotides slows down the inflammation development and prevents bone tissue resorption in damaged bones. The most effective were injections of oligonucleotide, which blocks interleukin-6. Combination of two oligonucleotides proved to be most effective in reducing the activity of matrix metalloproteinases that reorganize the extracellular matrix of bone in arthritis, as well as reducing the synthesis of tumor necrosis factor.

Keywords: rheumatoid arthritis, antisense oligonucleotides, bone tissue.

For reference: Makalish TP, Golovkin IO, Maslova GV, et al. Features of bone remodeling during the use of antisense oligonucleotides in a rheumatoid arthritis model. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2024; 17 (6): 146-153.

DOI: 10.20969/VSKM.2024.17(6).146-153.

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – системное аутоиммунное заболевание, поражающее суставы и приводящее к их полной иммобилизации. Распространенность РА в мире и России достаточно высока (до 1% населения), особенно среди женщин. Этиология заболевания окончательно не выяснена. Среди факторов развития заболевания присутствуют генетическая предрасположенность, инфекционные заболевания, дисбактериозы и проч. Клиническое течение РА протекает в несколько стадий. При начальной стадии ревматоидного артрита на рентгеновских снимках видны утолщения и уплотнения в мягких тканях вокруг суставов, истончения костной ткани и наличия в ней нескольких просветлений в виде кист. Характерен околосуставный остеопороз, при котором субхондральная кость становится рыхлой, пористой. При второй стадии происходит прогрессирование заболевания в виде увеличения числа кист, выраженности околосуставного остеопороза. Развиваются краевые эрозии кости около крепления к ней связок, по краям суставных хрящей. Третья стадия характеризуется множественными (не менее 5) эрозиями и появлением оссификатов в прилежащих мягких тканях. На четвертой стадии такие оссификаты появляются по краям суставных поверхностей, постепенно приводя к полному костному анкилозу суставов.

Ведущая роль в реорганизации костной ткани при РА принадлежит матриксным металлопротеиназам (ММП). Они участвуют в разрушении костей, связанном с РА, главным образом посредством трех механизмов: 1) деградация коллагена и последующее повреждение хряща и прилежащей кости; 2) регуляция воспалительных цитокинов и хемокинов, приводящая к дисбалансу гомеостаза в пораженном суставе и активации воспалительных сигнальных пу-

тей, способствующих дифференцировке остеокластов и резорбции кости; 3) стимулирование миграции клеток и инвазивного ангиогенеза, инициирование сигналов баланса остеобластов и остеокластов и ускорение разрушения кости [1].

Различные типы ММП экспрессируются хондроцитами, остеокластами, фибробластами синовиальной оболочки, эндотелиальными клетками, макрофагами, что приводит к каскаду реакций, способствующих перестройке внеклеточного матрикса для перемещения клеток воспаления, формирования новых сосудов, разрастания паннуса и его фиброза и дальнейшей оссификации. Экспрессия ММП стимулируется рядом провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли альфа (ФНОα) и интерлейкина 1в (ИЛ-1в). В последнее время рассматривается критическая роль ИЛ-6 и ФНОα в развитии РА [2].

На сегодняшний день лечение РА осуществляется нестероидными противовоспалительными препаратами, цитостатиками, а также генно-инженерными биологическими препаратами. Среди последних прошли клинические испытания и широко применяются антитела к фактору некроза опухоли альфа (адалимумаб) и интерлейкину 6 (тоцилизумаб). Активно исследуются различные соединения на предмет ингибирования матриксных металлопротеиназ, чтобы снизить степень повреждения костной ткани при РА. Мы в своем исследовании предлагаем использовать антисмысловые олигонуклеотиды, блокирующие транскрипцию ФНОα и ИЛ-6 в области пораженного сустава, избегая системных эффектов. Поскольку ФНОα является одним из индукторов остеокластогенеза и активации ММП, ожидается, что использование такого препарата приведет к снижению активность ММП в области повреждения и соответственно сохранит костную ткань.

Целью исследования стало изучение гистологических особенностей костной ткани в модели адьювант-индуцированного артрита, а также экспрессии матричных металлопротеиназ 1 и 3 после применения антисмысловых олигонуклеотидов (АСО).

Материалы и методы. Эксперимент был поставлен на 88 самках крыс линии Вистар. На момент начала эксперимента их возраст составлял 2 месяца, а вес в среднем 120 гр. Путем подкожного введения полного адьюванта Фрейнда в область на 1,5 см ниже основания хвоста в течение 21 дня моделировали ревматоидный артрит. Через три недели после последней инъекции гистологический анализ образцов кости показал развитие устойчивого воспаления в области инъекций с эрозией костной и хрящевой ткани, что соответствовало первой стадии РА. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

После формирования модели всех животных случайным образом разделили на несколько экспериментальных групп: 1) с моделью артрита без лечения; 2) с моделью артрита и инъекциями анти-ИЛ-6-олигонуклеотида; 3) с моделью артрита и инъекциями тоцилизумаба; 4) с моделью артрита и введением анти-ИЛ-6-олигонуклеотида методом электрофореза; 5) с моделью артрита и электрофоретическим введением анти-ФНО-олигонуклеотида; 6) с моделью артрита и введением инъекционным способом комбинации двух олигонуклеотидов; 9) с моделью артрита и электрофоретическим введением комбинации олигонуклеотидов. Группы 7 и 8 составили здоровые контрольные животные, которые получали инъекции и электрофорез с водой для инъекций. Олигонуклеотиды вводили в дозировке 0,04 мл при концентрации 30 мг/мл. Аналогичную дозировку использовали при электрофоретическом способе введения. Электрофорез выполняли на аппарате Поток-1 с силой тока 10 мА в течение 10 минут.

Раз в неделю в течение трех месяцев производили замеры диаметра хвостов в области повреждения штангенциркулем. Один раз в месяц выводили по 3 животных из каждой группы для взятия материала на гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Под изофлурановым наркозом отсекали хвост выше области повреждения, накладывая лигатуру на культю. В течение трех дней после операции животные получали с водой обезболивающее и антибиотики. Фрагмент хвоста фиксировали в 10-м нейтральном забуференном формалине в течение 48 часов, после чего декальцинировали в растворе ЭДТА в течение 14 суток. Далее образцы дегидратировали и пропитывали парафином в гистологическом процессоре карусельного типа (SLEE, Германия), изготавливали парафиновые блоки, с которых получали срезы толщиной 4 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления активности матричных металлопротеиназ и фактора некроза опухоли альфа использовали метод иммуногистохимии. Стекла окрашивали в автоматическом иммуногистостейнере Bond-MAX (Leica, Австралия) с антителами к ММП-1, ММП-3 и ФНОα и диаминбензидиновой системой детекции на

основе полимера. Окрашенные стекла сканировали на сканере гистопрепаратов Aperio CS2, полученные изображения описывали, оценивали степень интенсивности иммуногистохимического окрашивания при увеличении 40x не менее чем в 5 полях зрения. Оценивали интенсивность окрашивания хондроцитов метафизарной пластинки, пульпозного ядра межпозвоночных дисков, остеокластов, клеток костного мозга, подсчитывали число позитивных клеток инфильтрата в поле зрения.

Числовые данные подвергали статистической обработке в программе STATISTICA 10.0. Поскольку данные имели категориальный характер, а распределение числа позитивных клеток было отличным от нормального в результате проверки по методу Шапиро-Уилка, в описательной статистике высчитывали медиану (Me) и верхний и нижний квартили (Q1;Q3). С учетом вида данных и большого числа независимых выборок для их сравнения по уровню выраженности переменных применяли H-метод Краскала-Уоллиса и U-метод Манна-Уитни. Достоверными считали отличия при величине достигнутого уровня значимости $p \leq 0,05$. Для решения проблемы множественных сравнений применялась поправка Бонферрони по формуле $p_{Adjusted} = p \times m$, где p – полученное по результатам сравнения значение p ; $p_{Adjusted}$ – скорректированное значение p ; m – число сравнений (7 при сравнении экспериментальных групп со здоровыми животными и 6 при сравнении групп животных с лечением с группой без лечения). Для выявления связей между экспрессией фактора некроза опухоли и металлопротеиназ выполняли корреляционный анализ Спирмана.

Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования оборудованием «Молекулярная биология» Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского». Исследование одобрено комитетом по этике ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского», протокол №7 от 23.06.2023 г и выполнялось с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Результаты. Систематические измерения диаметра хвостов в течение всего эксперимента выявили следующие закономерности. Во-первых, поскольку животные взяты в эксперимент в молодом возрасте, рост их продолжался в течение эксперимента и потому прирост диаметров наблюдался даже в контрольной группе, особенно выраженный в первые два месяца (*рисунок 1*). Во-вторых, во всех группах с моделью артрита прирост в диаметре был замедлен, и обуславливался в первую очередь степенью отека и обилием инфильтрации в области повреждения. Примечательно, что в группах, получавших инъекции тоцилизумаба, а также все варианты олигонуклеотидов методом электрофореза, скорость прироста была ниже, чем в других экспериментальных группах. Статистической достоверности, однако, данные показатели не имели.

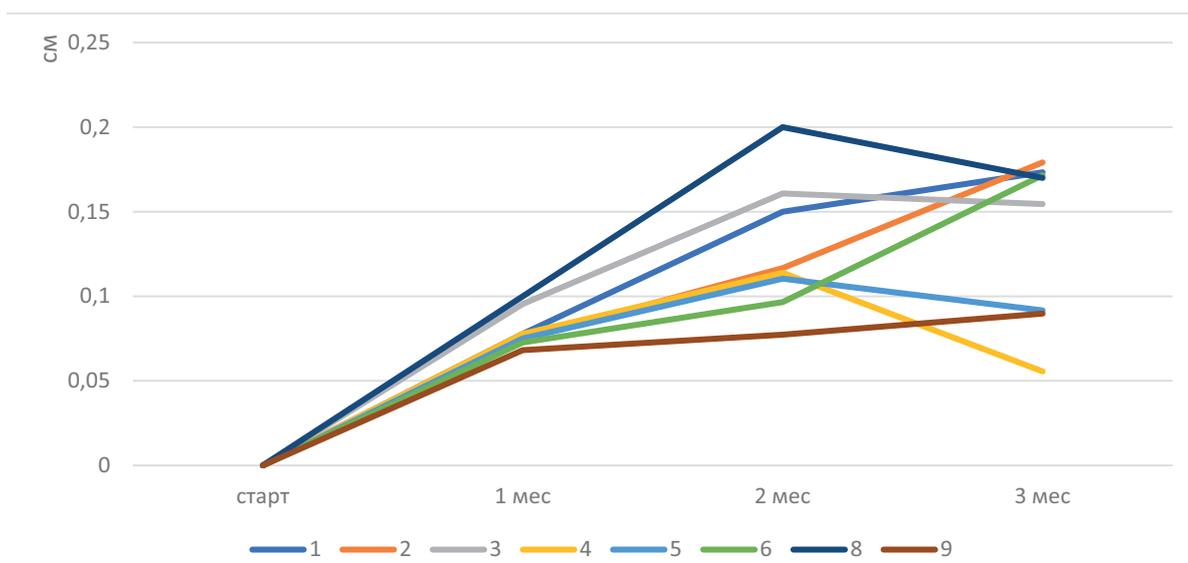


Рисунок 1. Прирост диаметра хвостов подопытных крыс в течение 3-х месяцев эксперимента
 1 – контрольная группа с моделью артрита, не получавшая лечения; 2 – группа с моделью артрита и лечением инъекциями анти-интерлейкин-6 олигонуклеотидами; 3 – группа с моделью артрита, получавшая стандартное лечение тоцилизумабом; 4 – группа с моделью артрита, получавшая анти-интерлейкин-6 олигонуклеотид методом электрофореза; 5 – группа с моделью артрита, получавшая олигонуклеотид против фактора некроза опухоли методом электрофореза; 6 – группа с моделью артрита, получавшая смесь двух олигонуклеотидов инъекционным способом; 8 – контрольная группа без модели артрита, которым вводили воду для инъекций инъекционным и электрофоретическим способом; 9 – группа с моделью артрита, получавшая смесь двух олигонуклеотидов методом электрофореза.

Figure 1. Increase in the tail diameters of rats during 3 months of the experiment

- 1 - Treatment-naïve arthritis-model control group; 2- Arthritis-model group treated with anti-IL-6 oligonucleotides; 3 - Arthritis model group, standard treatment with tocilizumab; 4- Arthritis model group treated with anti-IL-6 oligonucleotide by electrophoresis; 5 - Arthritis model group treated by electrophoresis with oligonucleotide against the TNF α ; 6 - Arthritis model group treated by injecting a mixture of two oligonucleotides; 8 - Arthritis model control group; 9 - Arthritis model group treated by electrophoresis with a mixture of two oligonucleotides.

Строение хвостовых позвонков крыс таково, что дуги с отростками редуцированы, а соединение позвонков осуществляется главным образом за счет синхондрозов в виде межпозвоночных дисков. Их пульпозное ядро представлено сетью ретикулярных клеток, между которыми расположились хондроциты, а внеклеточный матрикс представлен протеогликанами. Ядро окружено фиброзным кольцом из плотной волокнистой соединительной ткани, коллагеновые тяжи которой вплетаются в гиалиновый хрящ, покрывающий верхнюю и нижнюю поверхности позвонка. Несколько ниже суставной поверхности тела позвонка залегает пластинка активного метафизарного хряща, что подтверждает продолжающийся рост животных. Тело позвонка представлено губчатой костной тканью с редкими трабекулами, пространство между которыми заполнено желтым костным мозгом. В отдельных местах, ближе к суставным хрящам и редуцированным суставным отросткам, ячейки между трабекулами заполнены красным костным мозгом.

На момент начала лечения гистологическая картина позвонков соответствовала первой стадии артрита. Вокруг позвонков в подфасциальном пространстве наблюдалась обильная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация, муфтой охватывающая также и межпозвоночные диски (рисунк 2). Наблюдалось изменения в строении суставного хряща и межпозвоночных дисков: выраженная деформация пульпозного ядра и фиброзного кольца, проникновение воспалительного инфильтрата в волокнистую хрящевую

ткань, дезорганизация хряща и костной ткани. Через три месяца состояние кости в отсутствие лечения соответствовало артриту третьей стадии. Появились эрозии как в области суставного хряща, так и в костной ткани тела позвонка со стороны покровной пластинки. В межпозвоночных дисках встречались участки некроза. Желтый костный мозг изобилывал лимфоидными компонентами, возникшими либо как адаптивная активация лимфопоеза, либо как распространявшаяся лимфоидная инфильтрация. Применение различных схем лечения существенно затормозило развитие болезни.

В группе с применением тоцилизумаба, как и во всех других группах, сохранялась незначительная лимфоидная инфильтрация в подфасциальном пространстве и в мягких тканях, окружающих позвонок. Признаков эрозии костной ткани не наблюдается, желтый костный мозг без изменений (рисунк 3). Заметны дистрофические изменения в хондроцитах пульпозного ядра и гиалинового хряща в месте соединения позвонка с диском. При инъекциях олигонуклеотида, блокирующего синтез ИЛ-6, принципиальных отличий от предыдущей группы выявлено не было, лишь объем инфильтрации был несколько больше и в костном мозге обнаруживались незначительные очаги лимфопоеза. Позвонки крыс из группы, получавшей блокатор ИЛ-6 методом электрофореза, характеризовались сохранностью межпозвоночных дисков и относительной стабильностью гиалинового хряща. Также сохранялась инфильтрация по периферии позвонков. Единично

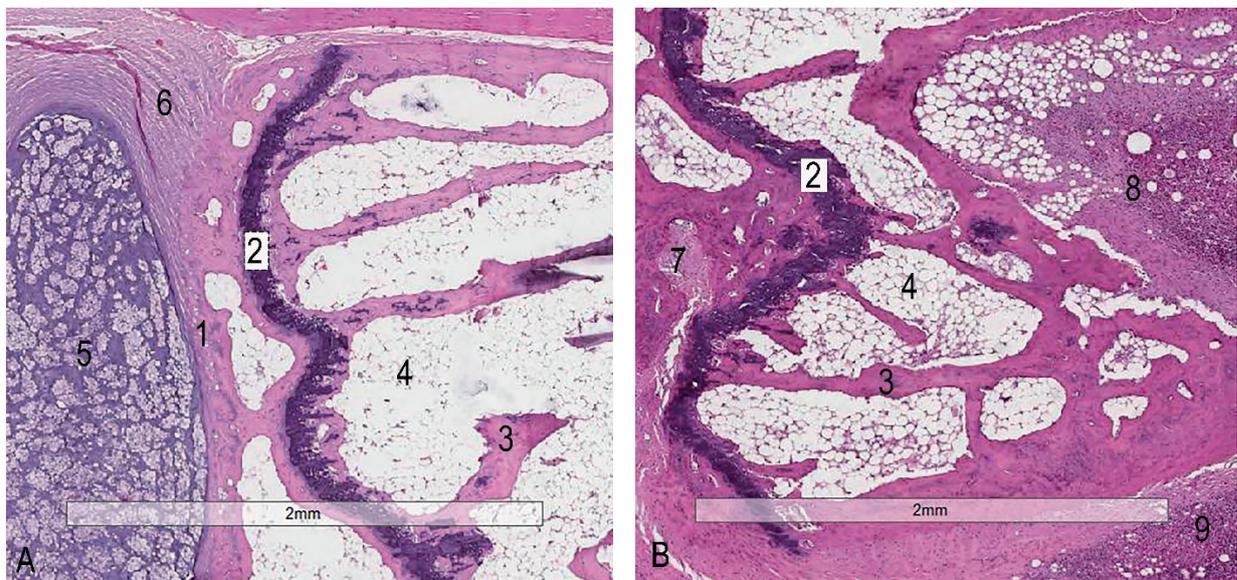


Рисунок 2. Хвостовой позвонок здоровой крысы (А) и крысы с моделью артрита на 3-й месяц болезни (В). Гематоксилин-эозин. Увеличение 2х.

1 – гиалиновый суставной хрящ, 2 – метафизарный хрящ, 3 – костная балка, 4 – желтый костный мозг, 5 – пульпозное ядро межпозвоночного диска, 6 – фиброзное кольцо межпозвоночного диска, 7 – эрозия костной ткани, 8 – лимфоидная инфильтрация костномозгового промежутка, 9 – лимфоидная инфильтрация вокруг позвонка.

Figure 2. Tail vertebra of a healthy rat (a) and of a rat with an arthritis model in the 3rd month of the disease (c). Hematoxylin-Eozin. 2x.

1 - hyaline joint cartilage, 2 - metaphyseal cartilage, 3 - bone trabecula, 4 - yellow bone marrow, 5 – nucleus pulposus of the intervertebral disc, 6 - fibrous ring of the intervertebral disc, 7 - bone erosion, 8 - lymphoid infiltration in bone marrow, 9 - lymphoid infiltration around the vertebra.

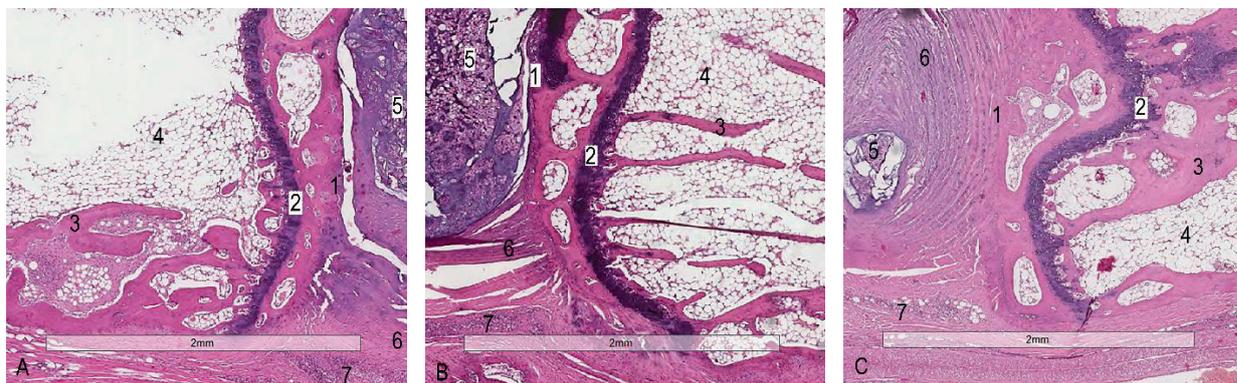


Рисунок 3. Хвостовой позвонок крысы, получавшей лечение тоцилизумабом (А), антисмысловым олигонуклеотидом против интерлейкина 6 (В) и комбинацией двух олигонуклеотидов (С). Гематоксилин-эозин. Увеличение 2х.

1 – гиалиновый суставной хрящ, 2 – метафизарный хрящ, 3 – костная балка, 4 – желтый костный мозг, 5 – пульпозное ядро межпозвоночного диска, 6 – фиброзное кольцо межпозвоночного диска, 7 – лимфоидная инфильтрация вокруг позвонка.

Figure 3. A tail vertebra of a rat treated with tocilizumab (a), an antisense oligonucleotide against interleukin 6 (c), and a combination of two oligonucleotides (C). Hematoxylin-Eozin. 2x.

1 - hyaline articular cartilage, 2 - metaphyseal cartilage, 3 - bone trabecula, 4 - yellow bone marrow, 5 – nucleus pulposus of the intervertebral disc, 6 - fibrous ring of the intervertebral disc, 7 - lymphoid infiltration around the vertebra.

встречались фрагменты красного костного мозга в пространствах между костными трабекулами. Аналогичное состояние костной ткани обнаруживалось у всех крыс, получавших блокатор ФНОα методом электрофореза. Состояние хрящевой ткани и объем инфильтрата мало отличались от группы с блокатором ИЛ-6. Инъекции комбинации олигонуклеотидов, как и электрофорез с ними, также приостановили процесс резорбции кости, сохранив при этом некоторое количество инфильтрата по периферии позвонка. В единичных случаях наблюдались при-

знаки эрозии костной ткани и разрастание красного костного мозга.

Экспрессия матричных металлопротеиназ 1 и 3 в клетках хрящей и инфильтрата отражала активность перестройки костной и хрящевой ткани поврежденных позвонков. Экспрессия ММП-3 хондроцитами глубоких слоев метафизарной пластинки была слабо выражена во всех группах включая здоровых животных (таблица 1). В остеокластах во всех экспериментальных группах активность ММП-3 была выше нормы, за исключением двух

**Степень экспрессии ММП и ФНОα в тканях позвонков
при коррекции модели ревматоидного артрита (Ме [Q1; Q3], n=3)**

Table 1

MMP and TNFα expression degrees in the vertebral tissues in the rheumatoid arthritis model (Me [Q1; Q3], n = 3)

Группа	8	1	2	3	4	5	6	9
ММП3								
хондроциты метафизарной пластинки	1[1;1]	2[1;2]	1[1;1]	1[1;1]	2[1;2]	1[1;1]	1[1;2]	1[1;1]
остеокл субхонд-ральные	1[1;1]	3[2;3]	2[2;2]	1[1;2]	2[1;2]	2[2;2]	1[1;1]	1[1;1]
хондроциты межпозвоночных дисков	0[0;1]	3[2;3]	3[2;3]	2[2;22]	3[3;3]	2[2;2]	2[2;2]	1[0;1] #0,05
инфильтрат ККМ	0	3[2;3] *0,04	3[2;3] *0,04	0	0 #0,05	3[2;3] *0,04	2[2;2] *0,04	0 #0,05
инфильтрат субфасциальный	0	146[143;156] *0,05	136[124;138] *0,05	24[18;29]	37[36;43] *0,05	126[118;128] *0,05	29[26;39] *0,05	23[22;23] *0,05
ММП1								
хондроциты метафизарной пластинки	1[1;1]	1[1;2]	1[1;1]	1[1;1]	2[2;2]	1[1;1]	1[1;1]	1[1;1]
остеокл субхондральные	1[1;1]	2[2;3]	2[2;2]	2[2;2]	2[2;3]	2[2;2]	2[2;2]	1[1;1] #0,05
хондроциты межпозвоночных дисков	1[1;0]	2[1;2]	0	1[1;1]	2[2;2]	0	1[1;1]	1[1;1]
инфильтрат ККМ	0	2[2;3] *0,05	2[2;2] *0,04	2[2;2] *0,04	2[2;2] *0,04	2[2;2] *0,04	2[2;2] *0,04	1[1;1] #0,05
инфильтрат субфасциальный	0	30[20;30] *0,05	29[26;35] *0,05	25[23;28] *0,05	109[80;112] *0,05	18[15;18] *0,05	42[41;70] *0,05	25[22;78] 0,05
ФНОα								
хондроциты метафизарной пластинки	0	1[1;2]	1[0;1]	1[1;1]	0	0	0	1[1;1]
остеокл субхондральные	1[1;1]	1[1;1]	2[1;2]	2[2;2]	1[0;1]	3[2;3]	3[3;3] *0,05	2[2;2]
хондроциты межпозвоночных дисков	0	1[1;2]	1[1;1]	2[1;2]	1[1;1]	1[1;1]	1[1;1]	1[1;1]
инфильтрат ККМ	0	2[2;2] *0,04	1[1;1] *0,04	1[1;1] *0,04	1[1;1] *0,04	2[2;2] *0,05	2[2;2] *0,04	1[1;1] *0,04
инфильтрат субфасциальный	0	27[22;30] *0,05	19[15;26] *0,05	10[6;10] *0,05	24[18;26] *0,05	21[18;22] *0,05	16[13;25] *0,05	53[41;56] *0,05

Примечание: * - уровень статистической значимости различий при сравнении с группой здоровых животных (группа 8)

- уровень статистической значимости различий при сравнении с группой животных с моделью артрита без лечения (группа 1)

Note: # - the level of statistical significance of differences when compared with a group of animals with an arthritis model without treatment (group 1)

* - the level of statistical significance of differences when compared with a group of healthy animals (group 8)

групп с применением тоцилизумаба и электрофоретическим введением комбинации олигонуклеотидов. Аналогичной была экспрессия ММП-3 в хондроцитах межпозвоночных дисков. Наиболее выраженной оказалась разница в количестве экспрессирующих ММП-3 лейкоцитах костного мозга и окружающего инфильтрата. В группе без лечения среднее число позитивно окрашенных клеток на поле зрения составило 47,6, близкие результаты оказались в группах с электрофоретическим введением анти-ИЛ-6-олигонуклеотида и инъекциями комбинации олигонуклеотидов. Наименьшее число позитивных

на ММП-3 клеток было выявлено в группах с применением тоцилизумаба и электрофорезом с комбинацией АСО.

Экспрессия ММП-1 имела схожий характер в метафизарном хряще и остеокластах. Хондроциты межпозвоночных дисков практически не экспрессировали ее. Лейкоциты костного мозга оказались позитивными на ММП-1 во всех экспериментальных группах с наилучшим результатом в группе с электрофоретическим введением комбинации АСО. При этом в окружающем кость инфильтрате количество позитивных клеток оказалось достаточно высоким.

ФНО-а наиболее активно экспрессировали остеокласты экспериментальных групп, а также лейкоциты костного мозга и окружающего позвонки инфильтрата. Здесь наилучшие показатели оказались в группах с инъекциями тоцилизумаба и комбинации олигонуклеотидов.

Обсуждение. Скелетно-мышечные проявления РА не ограничиваются суставами. Заболевание обычно поражает мышечные и костные компартменты, в частности, развивается остеопороз и саркопения [3]. Нами был проведен анализ изменений костной ткани при моделировании артрита на органном, тканевом и молекулярном уровнях. Изменения в диаметрах хвостов на протяжении эксперимента указали на наличие воспаления в области моделирования артрита, а также на изменения в метаболизме костной ткани поврежденных позвонков в сторону торможения роста и ремоделирования кости в местах эрозий. Гистологически мы получили тому подтверждение, отметив наличие костных и хрящевых эрозий, изменения в межпозвоночных дисках, обильное воспаление как вокруг позвонка, так и в теле кости а также повышение экспрессии металлопротеиназ.

Воздействие воспаления на кость при ревматоидном артрите является исключительно разрушительным. Повышенная резорбция костной ткани, а также замедление процесса костеобразования приводят к эрозии и деминерализации [3]. Нормальное ремоделирование костной ткани зависит от равновесия в активности остеокластов и остеобластов. При РА клетками паннуса вырабатывается множество различных цитокинов, стимулирующих резорбцию кости посредством активации дифференцировки остеокластов, одновременно ингибируя созревания остеобластов и замедляя костеобразование [4].

Недавние исследования показали, что блокирование ИЛ-6 в терапевтических целях при РА приводит не только к приостановлению деструкции костной и хрящевой ткани, но также и к частичному ее восстановлению. Уровни ИЛ-6 в сыворотке крови до лечения ассоциировались с прогрессированием костной эрозии и репарации, что выявлялось с помощью магнитно-резонансной томографии и рентгенографии [5]. На животных такой эффект был подтвержден у трансгенных мышей: хроническая гиперэкспрессия ИЛ-6 индуцировала у них изменения в кортикальной и трабекулярной микроархитектуре кости и препятствовала нормальному развитию костной ткани. ИЛ-6 и его растворимый рецептор способны индуцировать экспрессию рецепторного активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL) фибробластоподобными синовиоцитами, что приводит к активации остеокластов и резорбции костной ткани. В недавних исследованиях было показано, что применение блокаторов ИЛ-6 ассоциировалось с увеличением маркера формирования костной ткани N-концевого пропептида проколлагена 1-го типа, повышением минерализации кости и снижением маркера резорбции кости C-концевого сшивающего тело пептида коллагена I типа [2].

В нашей работе блокирование синтеза ИЛ-6 путем введения в область повреждения антисмысловых олигонуклеотидов привело к прекращению развития эрозии костной ткани при моделировании ревматоидного артрита. Блокирование провоспалительных цитокинов приостановило остеокластогенез, во-первых, путем снижения синтеза активирующего его ИЛ-6, а во-вторых, вследствие снижения активации матриксных металлопротеиназ, посредством которых осуществляется резорбция экстрацеллюлярного матрикса кости и хрящей, что проявилось снижением их экспрессии в кости.

Экстрацеллюлярный матрикс представляет собой высокодинамическую межклеточную среду, тесно связанную с клеточным статусом. Процесс ремоделирования внеклеточного матрикса состоит из деградации и производства его элементов, которые регулируют различное клеточное поведение [6]. В области сустава ММП-1, 8 и 13 являются основными гидролазами, ответственными за расщепление тканевых компонентов, а ММП-9 может дополнительно разрушать фрагменты коллагена типа II с образованием иммунодоминантного эпитопа [7]. Сообщалось, что при РА компоненты неколлагенового матрикса суставов могут разрушаться из-за повышенного уровня ММП-2, 3 и 9 [8], а также из-за деградации агрекана и белка хрящевого олигомерного матрикса. MMP1 и 13, по-видимому, преобладают при РА из-за их способности ограничивать скорость деградации коллагена [1].

При РА продукция металлопротеиназ осуществляется несколькими типами клеток, такими как фибробластоподобные синовиоциты, остеокласты, эндотелиальные клетки, хондроциты и нейтрофилы. Синовиоциты могут экспрессировать почти все ММП, за исключением ММП-8 и ММП-20. Паннус обладает способностью проявлять инвазивные свойства за счет экспрессии ММП-1, ММП-3 или ММП-10 и может продуцировать ММП-2 и индуцировать ММП-9 для дальнейшего расщепления коллагена хрящевого типа II и коллагена I костного типа в аутоиммунодоминантный эпитоп, таким образом, поддерживает агрессивный фенотип прогрессирующего паннуса [1]. Остеокласты могут высвобождать ММП-3, 9, 10, 12, 14, вызывая разрушение кости [9]. Отмечено, что существует сильная корреляция между уровнями ММП-1, 3, 10 и деструкцией костей у больных РА [1].

В нашем исследовании нами было отмечено повышение экспрессии ММП-1 и 3 в остеокластах в субхондральной области позвонков. Их снижение отмечалось в группах с применением блокаторов ИЛ-6 и ФНОа. Это объясняется тем, что повышенная экспрессия ММП связана с участием цитокинов в воспалительном процессе при РА. Ранее было обнаружено, что ФНОа индуцирует экспрессию ММП-2, 3, 8 и 9 через каскадный сигнальный путь киназ [1]. Анализируя полученные нами данные, мы заметили некоторую зависимость между силой экспрессии ФНОа и ММП-3, которая лучше всего прослеживалась в числе позитивных клеток в лим-

фоидном инфильтрате. Данная зависимость хоть и не является очевидной, однако проведение корреляционного анализа выявило статистически значимую положительную связь между силой экспрессии этих двух показателей ($r=0.4676$ при $p \leq 0,05$).

Выводы. Основываясь на данных, полученных при изучении хвостовых позвонков крыс с моделью РА, мы пришли к заключению, что применение антисмысловых олигонуклеотидов замедляет развитие воспаления, а также препятствует резорбции костной ткани в поврежденных костях. Наиболее эффективны в этом оказались инъекции АСО, блокирующего ИЛ-6. Комбинация двух АСО показала себя наиболее эффективной в снижении активности матриксных металлопротеиназ, реорганизующих внеклеточный матрикс кости при РА, а также снижение синтеза ФНО α . Электрофоретический способ введения препарата не только менее инвазивен, но и сам по себе улучшает гемодинамику в области повреждения и снижает воспаление.

Таким образом, можно заключить, что применение антисмысловых олигонуклеотидов для коррекции модели ревматоидного артрита является сопоставимым по эффекту со стандартной терапией, останавливая резорбцию кости путем снижения активности остеокластов и продукции ими матриксных металлопротеиназ.

Прозрачность исследования. Работа проводится при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение №23-25-10056 от 20.04.2023 г.). Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях. Все авторы принимали участие в разработке концепции и дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bian Y, Xiang Z, Wang Y, et al. Immunomodulatory roles of metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Pharmacology*. 2023; 14: 1285455. DOI: 10.3389/fphar.2023.1285455
2. Jarlborg M, Gabay C. Systemic effects of IL-6 blockade in rheumatoid arthritis beyond the joints. *Cytokine*. 2022; 149: 155742. DOI: 10.1016/j.cyto.2021.155742
3. Shim JH, Stavre Z, Gravalles EM. Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Calcified Tissue International*. 2018; 102 (5): 533-546. DOI: 10.1007/s00223-017-0373-1
4. Messina OD, Vidal M, Adami G, et al. Chronic arthritides and bone structure: focus on rheumatoid arthritis update. *Aging Clinical and Experimental Research*. 2023; 35 (7): 1405-1416. DOI: 10.1007/s40520-023-02432-9
5. Takeuchi T, Yoshida H, Tanaka S. Role of interleukin-6 in bone destruction and bone repair in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews*. 2021; 20 (9): 102884. DOI: 10.1016/j.autrev.2021.102884
6. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2014; 15: 786–801. DOI: 10.1038/nrm3904
7. Van den Steen PE, Proost P, Brand DD, et al. Generation of glycosylated remnant epitopes from human collagen type II by gelatinase B. *Biochemistry*. 2004; 43: 10809–10816. DOI: 10.1021/bi0493665
8. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Frontier in Bioscience*. 2006; 11: 529–543. DOI: 10.2741/1817
9. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *International Journal of Molecular Science*. 2020; 21: 9739. DOI: 10.3390/ijms21249739