БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 8, с. 1337 – 1351

УДК 577.12

SkQ1 УЛУЧШАЕТ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА И НОРМАЛИЗУЕТ АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ И NADPH-ГЕНЕРИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ АДЪЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННОМ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ У КРЫС

© 2023 Е.Д. Крыльский*, Т.Н. Попова, Д.А. Жаглин, Г.А. Разуваев, С.А. Олейник

Воронежский государственный университет, 394018 Воронеж, Россия; электронная почта: evgenij.krylsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023
После доработки 08.07.2023
Принята к публикации 08.07.2023

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой тяжёлое системное аутоиммунное заболевание воспалительного характера. Окислительный стресс и чрезмерное формирование митохондриальных активных форм кислорода (АФК) рассматриваются в настоящее время в качестве центральных патогенетических механизмов деструкции компонентов соединительной ткани и факторов, поддерживающих высокую активность воспалительного процесса и аутоиммунного ответа. Целью настоящей работы стала оценка воздействия митохондриально-направленного антиоксиданта 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1) на показатели иммунного статуса, интенсивность свободнорадикального окисления и функционирование компонентов антиоксидантной системы (АОС) и NADPH-генерирующих ферментов у крыс с адъювант-индуцированным РА. Лабораторные животные были разделены на 4 группы: контрольную группу; группу животных с РА; животных, которым с 7 дня развития РА внутрибрюшинно вводили SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг каждые 24 ч в течение последующих 8 дней; животных, получавших по вышеуказанной схеме SkQ1 в дозе 625 нмоль/кг. Материал для исследования забирали на 15 день после начала эксперимента. У крыс определяли скорость оседания эритроцитов, уровень ревматоидного фактора и циркулирующих иммунных комплексов, а также концентрацию иммуноглобулинов классов A, M и G с помощью иммуноферментного метода. Интенсивность свободнорадикального окисления оценивали на основании параметров железоиндуцированной биохемилюминесценции, содержания диеновых конъюгатов и активности аконитатгидратазы. Активность ферментов и содержание метаболитов в тканях животных анализировали спектрофотометрически. Результаты работы показали, что развитие РА было сопряжено с возрастанием показателей иммунного ответа и интенсивности свободнорадикального окисления. Наблюдалось также развитие дисбаланса в функционировании АОС и возрастание активности NADPH-генерирующих ферментов. Введение SkQ1 приводило к дозозависимому изменению показателей оксидативного статуса в направлении контроля, что сопровождалось нормализацией параметров иммунного статуса. По-видимому, посредством снижения уровня митохондриальных АФК тестируемое соединение тормозило активизацию воспалительного ответа и последующую генерацию свободных радикалов иммунокомпетентными клетками, обусловливающую развитие в тканях окислительного стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний, ревматоидный артрит, окислительный стресс, иммунный статус, иммуноглобулины, антиоксидантная система.

DOI: 10.31857/S0320972523080043, **EDN:** IIJABG

Принятые сокращения: АГ – аконитатгидратаза; АОС – антиоксидантная система; АФК – активные формы кислорода; Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ГП – глутатионпероксидаза; ГР – глутатионредуктаза; ГТ – глутатионтрансфераза; ДК – диеновые конъюгаты; ПОЛ – перекисное окисление липидов; РА – ревматоидный артрит; СОД – супероксиддисмутаза; ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы; GSH – восстановленный глутатион; Ig – иммуноглобулины; I_{max} – интенсивность максимальной вспышки хемилюминесценции; NADP-ИДГ – NADP-зависимая изоцитратдегидрогеназа; RF – ревматоидный фактор; SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний; $tg\alpha_2$ – тангенс угла наклона касательной к кривой хода хемилюминесценции.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой системную аутоиммунную патологию, связанную с хроническим воспалительным процессом и поражающую как суставы, так и внесуставные ткани. Патофизиологические механизмы РА до конца не выяснены. Наличие генетической предрасположенности в совокупности с внешними факторами риска может привести к модификации путём цитруллинирования собственных белков-антигенов, включая иммуноглобулины (Ig) G, коллаген 2 типа и виментин. Образующиеся в ходе этого процесса аутоантигены поглощаются антигенпрезентирующими клетками, которые впоследствии активируют иммунный ответ. В-Клетки подвергаются соматической рекомбинации, начинают пролиферировать и дифференцироваться в плазматические клетки, которые вырабатывают аутоантитела, такие как ревматоидный фактор (RF) [1].

Окислительный стресс играет важную роль в инициировании и поддержании патогенетических механизмов РА. В физиологических условиях производство и нейтрализация активных форм кислорода (АФК) должны поддерживаться в динамическом балансе, поскольку данные агенты, помимо прочего, являются ключевыми компонентами защиты против патогенов. В патологических условиях АФК, с большой интенсивностью вырабатываемые суставными нейтрофилами, моноцитами и макрофагами, способны повреждать различные клеточные структуры, включая ДНК, углеводы, белки и липиды, способствуя возникновению окислительного стресса. АФК являются также активаторами ядерного фактора κB (NF-κB), ответственного за транскрипцию генов, участвующих в реализации воспалительного ответа [2]. Кроме этого, АФК напрямую или косвенно, путём активации матриксных металлопротеиназ, повреждают внеклеточный матрикс [3].

Важную роль в различных патологических состояниях, включая РА, играет перекисное окисление липидов (ПОЛ). В результате ПОЛ из полиненасыщенных жирных кислот образуются пероксильные радикалы, что сопряжено с повреждением клеточных мембран. Более того, ПОЛ липопротеинов низкой плотности способствует усилению воспалительного ответа посредством повышения уровня хемокинов, молекул адгезии и конечных продуктов гликирования [3, 4]. Имеющиеся исследования демонстрируют, что уровень ПОЛ статистически значимо выше у пациентов с РА по сравнению с контролем. Кроме того, маркеры ПОЛ значительно коррелируют с активностью заболевания [5].

Помимо суставных проявлений, при РА наблюдается повреждение других органов и тканей. В частности, кардиоваскулярная патология на фоне РА развивается вследствие избыточной секреции в кровь провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками, индукции окислительного стресса, аномального иммунного ответа. Показано, что уровень провоспалительных цитокинов и белков острой фазы воспаления напрямую связан с тяжестью коронарной болезни сердца и риском атеротромбоза. У пациентов с РА также повышен риск развития сердечной недостаточности [6].

Вопрос о существовании печёночных проявлений РА в настоящее время является дискуссионным. Тем не менее существует мнение, что печёночные патологии сопровождают до 74% случаев РА. Препараты, используемые для лечения РА, могут оказывать гепатотоксическое действие. Лекарственное поражение печени особенно часто встречается при РА во время лечения нестероидными противовоспалительными препаратами и метотрексатом [7].

Ряд исследований показал, что окислительный стресс связан с возникновением мышечной слабости при РА. Как известно, мышечная ткань богата митохондриями, которые рассматриваются в качестве одного из основных источников АФК. Доказано, что митохондриальная дисфункция, заключающаяся в изменении экспрессии ряда митохондриальных генов, а также в изменении размера и формы митохондрий из биоптатов скелетных мышц пациентов, коррелирует с тяжестью РА [8].

Как известно, длительное воздействие АФК приводит к повреждению митохондриальной ДНК (мтДНК), изменению митохондриальной функции, апоптозу и остановке роста клеток. Повышенное содержание внеклеточной мтДНК в плазме крови и синовиальной жидкости больных РА свидетельствует о взаимосвязи воспалительного артрита и степени повреждения мтДНК [9–11]. Повреждённые митохондрии могут также вызывать иммунный ответ и активизацию воспаления. Окисленные компоненты митохондрий, такие как мтДНК, белки и липиды, накапливаются в воспалённых ревматоидных суставах и способствуют выработке аутоантител и аутоиммунному ответу, который, в свою очередь, усиливает окислительный стресс [12].

Антиоксидантная защитная система предотвращает окислительное повреждение клеток и тканей и включает такие ферменты,

как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР) и глутатионтрансфераза (ГТ), и неферментативные компоненты. Основным неферментативным антиоксидантом является L-глутамил-цистеинилглицин, или восстановленный глутатион (GSH). Проведённые исследования показывают, что развитие дисбаланса и нарушения в работе системы антиоксидантной защиты играют важнейшую роль в патогенезе РА [3, 13–15].

В настоящее время актуален поиск способов митохондриально-направленных воздействий, способных тормозить развитие метаболических нарушений в тканях суставных компонентов. В частности, было показано, что использование полимерных мицелл позволяет осуществить доставку берберина в митохондрии фибробластов. При исследовании *in vivo* эффективности данной системы доставки берберина было продемонстрировано, что у крыс с адъювант-индуцированным артритом наблюдалось значительное уменьшение отёка конечности, подавление выработки цитокинов и снижение степени повреждения костей [16]. Имеются также данные о том, что уролитин А нормализует митофагию и митохондриальное дыхание в первичных хондроцитах из суставов здоровых доноров и пациентов с остеоартритом [17]. Уролитин А, помимо этого, тормозил прогрессирование патологии при моделировании остеоартрита у мышей, что было связано с его позитивным воздействием на функционирование митохондрий [17].

В отношении РА интерес представляет исследование протекторных свойств 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония (SkQ1), являющегося действующим веществом препарата «Визомитин» (применяется в качестве глазных капель при синдроме сухого глаза и начальных стадиях катаракты, в основе патогенеза которых лежит окислительный стресс) [18]. SkQ1 активно проникает через клеточную мембрану и накапливается в матриксе митохондрий. Важно отметить, что SkQ1 является восстанавливаемым антиоксидантом многоразового действия, поскольку после окисления АФК SkQ1 восстанавливается в исходное, активное состояние за счёт электрон-транспортной цепи митохондрий [19]. Таким образом, применение SkQ1 обусловливает уменьшение повреждений, вызванных митохондриальными АФК [20]. Ранее были получены первые результаты, указывающие на перспективность применения SkQ1 на модели РА [21].

Таким образом, целью настоящей работы стал анализ воздействия SkQ1 на состояние иммунного статуса, а также показатели интенсивности свободнорадикального окисления и функционирования антиоксидантной системы (АОС) в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс с адъювант-индуцированным РА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали самцов белых лабораторных крыс Wistar массой 180–200 г (питомник «КролИнфо», Россия), содержавшихся при температуре 20–25 °C, 12-часовом световом дне и доступе к воде и корму (4RF21 для мышей и крыс на короткий и средний периоды, «Фармбиолайн», Россия) *ad libitum*. Работа выполнялась с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации. Животные были разделены на 4 экспериментальные группы: первая группа животных (контроль, $n = 12$) не подвергалась воздействиям; вторая группа (РА, $n = 12$) – животные, которым индуцировали экспериментальный РА путём подкожного введения в подушечку лапки полного адъюванта Фрейнда («Thermo Fisher Scientific», США), содержащего 0,5 мг/мл убитых микобактерий, в объёме 100 мкл [22]; третья группа (РА + SkQ1 1250, $n = 12$) – животные, которым с 7 дня развития РА внутрибрюшинно вводили SkQ1 в 0,9%-ном хлориде натрия в дозе 1250 нмоль/кг каждые 24 ч в течение последующих 8 дней; животные четвертой группы (РА + SkQ1 625, $n = 12$) по вышеуказанной схеме получали SkQ1 в дозе 625 нмоль/кг. На 15 день эксперимента животных наркотизировали хлороформом и забирали кровь из сердца в пробирки, ополоснутые 0,9%-ным раствором хлорида натрия. После свёртывания кровь центрифугировали при 2500 *g* для получения сыворотки. Участок икроножной мышцы воспалённой конечности, а также печень и сердце крыс извлекали в ёмкость с ледяным физиологическим раствором, промывали и немедленно приступали к приготовлению гомогената. При получении гомогената навеску тканей крысы гомогенизировали в охлаждённой среде выделения (0,05 М Tris-HCl буфер (pH 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 2 мМ β-меркаптоэтанола) и центрифугировали при 5000 *g* в течение 15 мин. Полученный супернатант и сыворотку крови незамедлительно использовали для проведения исследований.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) крови крыс определяли по методу Панченкова [23].

Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови определяли методом преципитации с полиэтиленгликолем с молекулярным весом 6000 единиц («Serva», Германия) с последующим измерением оптической плотности. Содержание Ig класса A (IgA), M (IgM) и G (IgG) определяли иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов Cusabio® ELISA kits («Cusabio», Китай). Для отмывки планшет использовали промывочное устройство Stat Fax 2600 («Awareness Technology», США), результаты регистрировали с помощью ИФА-фотометра Stat Fax 4300 Chromate («Awareness Technology»). Уровень RF в сыворотке крови крыс определяли с помощью набора Rheumatoid factor FS («Diagnostic systems», Германия).

Интенсивность процессов свободнорадикального окисления и общую антиоксидантную активность в образце измеряли методом биохемилюминесценции, индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа [24]. Кинетическую кривую биохемилюминесценции регистрировали в течение 30 с, используя биохемилюминометр БХЛ-07 («Medozons», Россия), и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S) и интенсивность максимальной вспышки (I_{max}), которые характеризуют активность протекания свободнорадикальных процессов в образце, а также величину тангенса угла наклона касательной к кривой хода хемилюминесценции ($tg\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность. Реакционная среда содержала 0,4 мл 0,02 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ $FeSO_4$ и 0,2 мл 2%-ного раствора пероксида водорода (*v/v*), вносимого непосредственно перед измерением. Исследуемый материал добавляли в объёме 0,1 мл до внесения пероксида водорода. Для анализа концентрации диеновых конъюгатов (ДК) к исследуемому образцу добавляли гептан и изопропанол, перемешивали и осаждали центрифугированием при 3000 *g*. Гептановую фазу супернатанта разбавляли этанолом и анализировали спектрофотометрически при 233 нм [25].

Активность исследуемых ферментов определяли на спектрофотометре U-1900 («Hitachi», Япония). Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзиматической системе феназинметасульфата и NADH [26]. Среда спектрофотометрирования включала следующие компоненты: 0,1 М фосфатный буфер (pH 7,8), 0,33 мМ ЭДТА, 0,41 мМ нитросинего тетразолия, 0,01 мМ феназинметасульфата, 0,8 мМ NADH. Исследуемый образец вносили в количестве 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию инициировали добавлением NADH и регистрировали прирост оптической плотности за 5 мин при длине волны 540 нм. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ного ингибирования восстановления нитросинего тетразолия. Активность каталазы определяли при длине волны 410 нм с использованием следующих реактивов: буферно-субстратная смесь, содержащая 10 мл Tris-HCl буфера (pH 7,4) и 30 мл 0,08%-ного (*v/v*) пероксида водорода; 4,5%-ный раствор аммония молибденовокислого [27]. Активность аконитатгидратазы (АГ) оценивали в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7,8), содержащем 4 мМ цитрата натрия («PanReac», Испания). Измерение активности ГП проводили в среде для спектрофотометрии: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА, 0,12 мМ NADPH («AppliChem», Германия), 0,85 мМ GSH («AppliChem»), 0,37 мМ H_2O_2, 1 Ед./мл ГР («Sigma-Aldrich», США) [28]. Активность ГР оценивали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержавшем 1 мМ ЭДТА, 0,16 мМ NADPH («AppliChem») и 0,8 мМ окисленного глутатиона («AppliChem») [29]. Активность ГТ измеряли в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержавшем 1 мМ ЭДТА, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензола («Sigma-Aldrich»), 5 мМ GSH («AppliChem») [30]. Концентрацию GSH определяли с помощью реактива Эллмана [31]. Концентрацию цитрата оценивали по методу Нательсона [32]. Активность NADP-зависимой изоцитратдегидрогеназы (NADP-ИДГ) измеряли в среде для спектрофотометрии, состоящей из 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,8), 1,5 мМ изоцитрата, 2 мМ $MnCl_2$, 0,4 мМ NADP. Среда спектрофотометрирования для оценки активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) представляла собой 50 мМ Tris-HCl буфер (pH 7,8), содержавший 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ NADP, 1,0 мМ $MgCl_2$. Для определения содержания белка использовали биуретовый метод. Активность ферментов представлена в виде ферментативных единиц (Е)/мл сыворотки крови, Е/г сырой массы ткани и Е/мг белка.

Результаты анализировали с помощью программы SPPS Statistics 23.0 с использованием одновыборочного критерия Колмогорова–Смирнова для оценки нормальности распределения значений переменных. Значения показателей в группах сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа или критерия Краскела–Уоллиса. *t*-Критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни

использовали для попарных сравнений. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

SkQ1 способствует нормализации показателей иммунного статуса при экспериментальном РА у крыс. Результаты проведённой работы показали, что введение SkQ1 крысам с РА способствовало уменьшению СОЭ, уровня ЦИК и RF, а также концентрации IgA, IgM и IgG в сыворотке крови (рис. 1). При этом дозозависимый эффект SkQ1 прослеживался только по отношению к содержанию IgG. Так, введение животным с патологией тестируемого соединения в дозах 1250 и 625 нмоль/кг приводило к снижению данного параметра в 1,6 и 1,4 раза соответственно. Показатели уровня ЦИК, RF, концентрации IgA и IgM приближались к аналогичным значениям для контрольной группы при использовании обеих дозировок SkQ1. Помимо этого, у животных, получавших на фоне РА SkQ1, регистрировалось менее выраженное увеличение толщины воспалённой конечности, в которую вводили полный адъювант Фрейнда (см. рис. 1).

SkQ1 снижает показатели интенсивности свободнорадикального окисления при индуцированном РА. Важным фактором развития воспаления при РА является окислительный стресс. Результаты работы показали, что моделирование РА у крыс сопровождалось возрастанием интенсивности свободнорадикального окисления в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах (рис. 2, табл. 1). Введение SkQ1 животным с патологией приводило к изменению параметров биохемилюминесценции, концентрации ДК, активности АГ и содержания цитрата в направлении значений контрольной группы. На ряд анализируемых параметров более выраженное действие тестируемое соединение оказывало в дозе 1250 нмоль/кг. В частности, в сыворотке крови I_{max} под действием SkQ1 в дозировке 1250 нмоль/кг снижалась на 36% по сравнению со значениями для группы с РА. Использование соединения в дозе 625 нмоль/кг, в отличие от большей дозировки, не оказывало значительного влияния на параметр S в сыворотке животных с патологией. $tg\alpha_2$ снижался на 42 и 27% в сыворотке крови и мышцах в группе животных РА + SkQ1 1250 соответственно, что было более существенно, чем в группе РА + SkQ1 625. Использование протектора в большей дозировке также приводило

Таблица 1. Показатели биохемилюминесценции при РА у крыс и введении SkQ1

Показатели	Группы животных			
	Контроль	РА	РА + SkQ1 1250	РА + SkQ1 650
I_{max}, сыворотка, мВ	68,5 ± 15,1	102,5 ± 23,0*	65,6 ± 14,2#^	97,5 ± 21,8#
I_{max}, сердце, мВ	51,5 ± 11,4	65,4 ± 11,5*	48,1 ± 10,2#	50,1 ± 11,9#
I_{max}, печень, мВ	42,0 ± 9,4	52,1 ± 11,1*	42,9 ± 8,0#	47,1 ± 8,6#
I_{max}, мышцы, мВ	94,1 ± 10,2	131,1 ± 29,6*	89,8 ± 20,3#	96,0 ± 21,3#
S, сыворотка, мВ·с	903 ± 205	1197 ± 247*	1064 ± 223#^	1210 ± 374
S, сердце, мВ·с	485 ± 105	715 ± 157*	459 ± 104#	476 ± 107#
S, печень, мВ·с	92 ± 21	109 ± 25*	105 ± 23	115 ± 31
S, мышцы, мВ·с	528 ± 120	675 ± 155*	556 ± 121#	593 ± 137#
$tg\alpha_2$, сыворотка	14,0 ± 3,1	24,1 ± 5,7*	13,9 ± 3,2#^	24,6 ± 6,0
$tg\alpha_2$, сердце	7,1 ± 1,5	8,5 ± 2,0*	7,8 ± 1,7#^	9,5 ± 2,1
$tg\alpha_2$, печень	8,1 ± 1,8	10,1 ± 2,2*	9,1 ± 2,0#^	10,0 ± 2,3
$tg\alpha_2$, мышцы	34,5 ± 8,1	48,8 ± 10,2*	35,7 ± 8,0#^	41,9 ± 9,3#

Примечание. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой РА; ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой РА + SkQ1 650.

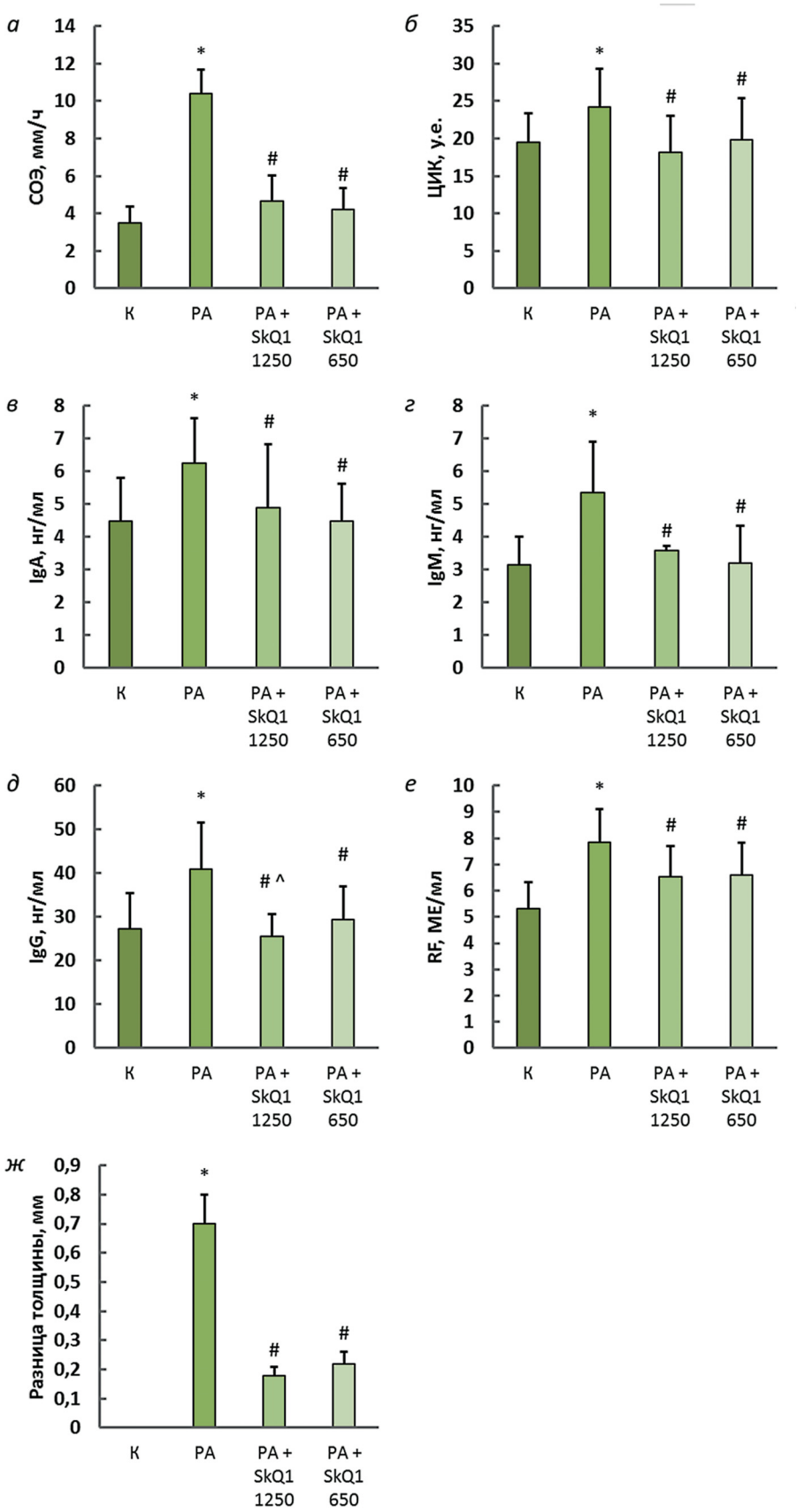

Рис. 1. СОЭ (*а*), уровень ЦИК (*б*), содержание IgA (*в*), IgM (*г*), IgG (*д*), уровень RF (*е*) и прирост толщины воспалённой конечности после введения полного адъюванта Фрейнда (*ж*) у животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой РА; ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой РА + SkQ1 650

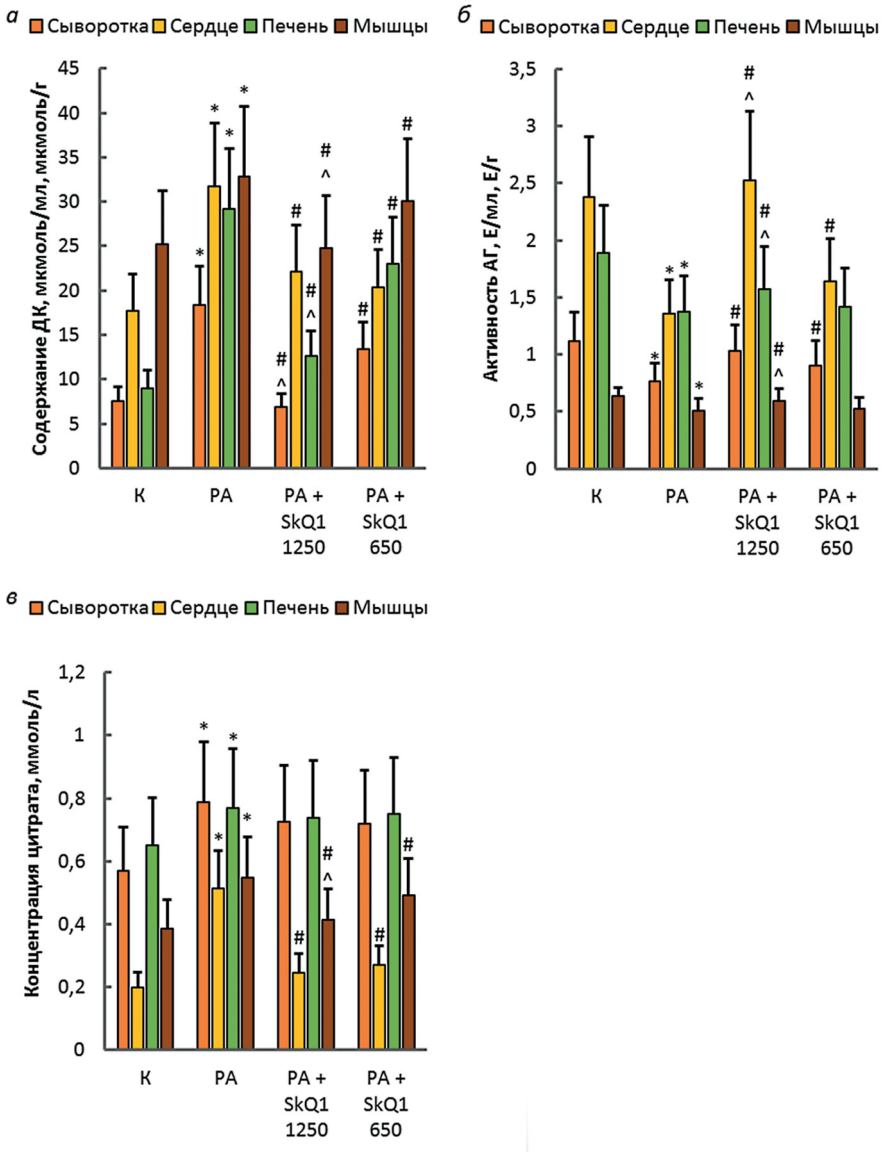

Рис. 2. Содержание ДК (мкмоль/мл сыворотки и мкмоль/г ткани на панели *а*), активность АГ (Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы ткани на панели *б*) и концентрация цитрата (ммоль/л сыворотки, гомогената на панели *в*) у животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой РА; ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой РА + SkQ1 650

к более существенному понижению концентрации ДК и увеличению активности АГ. Так, в сыворотке крови, сердце, печени и мышцах крыс из группы РА + SkQ1 1250 наблюдалось снижение уровня ДК соответственно на 62, 30, 57 и 25% по сравнению с группой с РА. Активность АГ у крыс, получавших SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг, возрастала в данных тканях соответственно на 34, 86, 14 и 15%. Содержание цитрата при этом достоверно снижалось в сердце и мышцах на 52 и 24% соответственно.

SkQ1 способствует снижению выраженности дисбаланса в функционировании АОС. Дисфункция компонентов антиоксидантной защиты является одним из ключевых факторов повреждения тканей при РА. Полученные данные показали, что индукция РА у крыс сопровождалась дисбалансом в функционировании АОС. В частности, наблюдалось возрастание активности СОД, каталазы, ГП и ГР и падение активности ГТ и содержания GSH в тканях животных с патологией (табл. 2, рис. 3). Применение SkQ1 в обеих дозах на фоне РА в большинстве случаев способствовало снижению выраженности данных изменений. При этом активность СОД в мышцах значимо изменялась только под действием SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг, тогда как в сыворотке крови данная дозировка оказывала менее существенное действие на активность каталазы по сравнению с дозой 625 нмоль/кг: было зарегистрировано снижение показателя на 41%

Таблица 2. Активность СОД, каталазы, ГП, ГР и ГТ при РА у крыс при введении SkQ1

Показатели	Группы животных			
	Контроль	РА	РА + SkQ1 1250	РА + SkQ1 650
СОД, сыворотка, Е/мл	37,0 ± 9,0	61,4 ± 12,7*	41,1 ± 9,9#	38 ± 8,2#
СОД, сердце, Е/г	200,1 ± 45,7	286,0 ± 68,2*	226,2 ± 52,4#	208,1 ± 42,0#
СОД, печень, Е/г	7,3 ± 1,6	20,4 ± 4,9*	9,3 ± 2,2#	8,9 ± 1,6
СОД, мышцы, Е/г	45,3 ± 8,1	63,2 ± 9,2*	57,3 ± 8,6#	64,6 ± 8,9
Каталаза, сыворотка, Е/мл	0,090 ± 0,020	0,157 ± 0,031*	0,142 ± 0,032#^	0,092 ± 0,020#
Каталаза, сердце, Е/г	0,650 ± 0,154	0,891 ± 0,207*	0,658 ± 0,158#	0,712 ± 0,168#
Каталаза, печень, Е/г	0,640 ± 0,150	0,751 ± 0,172*	0,635 ± 0,152#	0,640 ± 0,151#
Каталаза, мышцы, Е/г	0,619 ± 0,147	0,804 ± 0,158*	0,607 ± 0,149#	0,593 ± 0,141#
ГП, сыворотка, Е/мл	0,159 ± 0,035	0,185 ± 0,042*	0,171 ± 0,040	0,184 ± 0,038
ГП, сердце, Е/г	0,351 ± 0,085	0,525 ± 0,128*	0,441 ± 0,102#^	0,581 ± 0,141
ГП, печень, Е/г	0,137 ± 0,032	0,172 ± 0,040*	0,127 ± 0,030#^	0,168 ± 0,031
ГП, мышцы, Е/г	2,539 ± 0,617	2,866 ± 0,687*	2,880 ± 0,702	2,930 ± 0,704
ГР, сыворотка, Е/мл	0,038 ± 0,006	0,047 ± 0,007*	0,041 ± 0,007#	0,049 ± 0,008
ГР, сердце, Е/г	0,106 ± 0,020	0,124 ± 0,021*	0,110 ± 0,020#	0,113 ± 0,019#
ГР, печень, Е/г	0,780 ± 0,187	0,952 ± 0,218*	0,754 ± 0,172#	0,742 ± 0,177#
ГР, мышцы, Е/г	0,220 ± 0,035	0,302 ± 0,051*	0,263 ± 0,041#^	0,295 ± 0,054
ГТ, сыворотка, Е/мл	0,060 ± 0,013	0,029 ± 0,006*	0,028 ± 0,007	0,029 ± 0,007
ГТ, сердце, Е/г	1,013 ± 0,155	0,710 ± 0,112*	0,886 ± 0,165#	0,801 ± 0,139#
ГТ, печень, Е/г	0,640 ± 0,098	0,473 ± 0,073*	0,532 ± 0,081#	0,561 ± 0,107#
ГТ, мышцы, Е/г	0,384 ± 0,051	0,268 ± 0,038*	0,313 ± 0,049#^	0,261 ± 0,042

Примечание. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой РА; ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой РА + SkQ1 650.

в группе РА + SkQ1 625 против снижения на 10% в группе РА + SkQ1 1250. Активность ГП достоверно уменьшалась в сердце и печени животных из группы РА + SkQ1 1250 по сравнению с данными группы с патологией. Величина наблюдаемых изменений составила 16 и 26% соответственно. Активность ГР достоверно изменялась в направлении контроля во всех тканях в группе РА + SkQ1 1250, а также в сердце и печени животных из группы РА + SkQ1 625. Активность ГТ, пониженная у крыс с РА, восстанавливалась под действием SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг в сердце, печени и мышцах, а при использовании SkQ1 в дозе 625 нмоль/кг – в сердце и печени. Концентрация GSH также изменялась в направлении контроля в сыворотке крови, сердце и печени животных группы РА + SkQ1 1250.

SkQ1 способствовал нормализации активности NADPH-генерирующих ферментов при РА. Основными поставщиками NADPH для глутатионовой АОС являются NADP-ИДГ и Г6ФДГ, в связи с чем был проведён анализ воздействия SkQ1 на данные ферменты при РА. Результаты работы показали, что SkQ1 оказывал некоторое стимулирующее воздействие

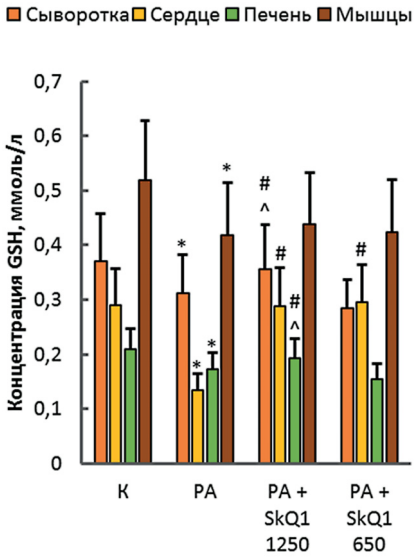

Рис. 3. Концентрация GSH (ммоль/л сыворотки, гомогената) у животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # $p < 0,05$ по сравнению с группой РА; ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой РА + SkQ1 650

на активность NADP-ИДГ в сердце крыс, которая при РА понижалась (рис. 4). Так, применение дозы 1250 нмоль/кг приводило к увеличению данного параметра в 2,4 раза относительно значений для группы с патологией. Активность фермента в мышцах и сыворотке крови животных под действием SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг изменялась в направлении контроля, тогда как тестируемое соединение в дозировке 625 нмоль/кг не оказывало значимого воздействия на данный показатель в мышцах крыс с РА. На активность Г6ФДГ, которая повышалась в тканях крыс при РА, наибольший эффект SkQ1 оказывал в дозе 1250 нмоль/кг. Так, при введении протектора в данной дозировке активность фермента понижалась в сыворотке крови, сердце и печени животных соответственно на 62, 18 и 10% по сравнению с данными для группы с патологией. Удельная активность исследуемых в настоящей работе ферментов представлена в Приложении.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Окислительный стресс, сопряжённый с усиленным образованием АФК и дисфункцией АОС, играет одну из ключевых ролей в поддержании высокой интенсивности воспаления при РА. Митохондрии, являясь ключевым компонентом клеточного энергетического обмена, выступают в качестве основных источников АФК и вносят существенный вклад в регуляцию воспалительных процессов и формирование аутоиммунного ответа [33]. Снизить уровень митохондриальных АФК и стимулированный ими воспалительный ответ возможно с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов, в частности SkQ1. В настоящем исследовании было продемонстрировано, что применение SkQ1 при адъювант-индуцированном РА приводило к уменьшению интенсивности свободнорадикального окисления и смягчению выраженности дисбаланса в функционировании АОС и NADPH-генерирующих ферментов, что сопровождалось нормализацией параметров иммунного статуса у экспериментальных животных.

Результаты настоящей работы продемонстрировали снижение уровня IgA, IgM, IgG, ЦИК и RF, неспецифического маркера воспаления – СОЭ, а также выраженности отёка воспалённой конечности у крыс с РА, получавших SkQ1. Судя по всему, данный эффект тестируемое соединение проявляло посредством торможения интенсивности свободнорадикального окисления в тканях животных с патологией. Как известно, в условиях окислительного стресса наблюдается деградация ингибитора фактора NF-κB, который играет важнейшую роль в активизации воспалительной реакции. Кроме того, накапливающиеся при РА конечные продукты гликирования белков активируют рецепторы конечных продуктов гликирования, что является важным механизмом развития кардиоваскулярных осложнений при РА [3]. Повреждённые в условиях окислительного стресса митохондрии могут высвобождать ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны (DAMPs), которые действуют через модуляцию врождённого иммунитета посредством редокс-чувствительных воспалительных путей, в частности NF-κB-пути, или прямой активации NLRP3 инфламмасомы – цитозольного рецептора, способствующего созреванию провоспалительных цитокинов [33].

Результаты настоящей работы согласуются с полученными ранее данными, продемонстрировавшими перспективность применения SkQ1 в качестве дополнения к основной терапии РА. Так, было показано, что данное соединение предотвращало разрушение кости, дегенерацию и воспалительную инфильтрацию хряща при аутоиммунном артрите у крыс, что могло быть связано с активацией апоптоза нейтрофилов под действием SkQ1 [21]. Судя по всему, продемонстрированная способность тестируемого соединения оказывать регуляторное воздействие на жизнеспособность

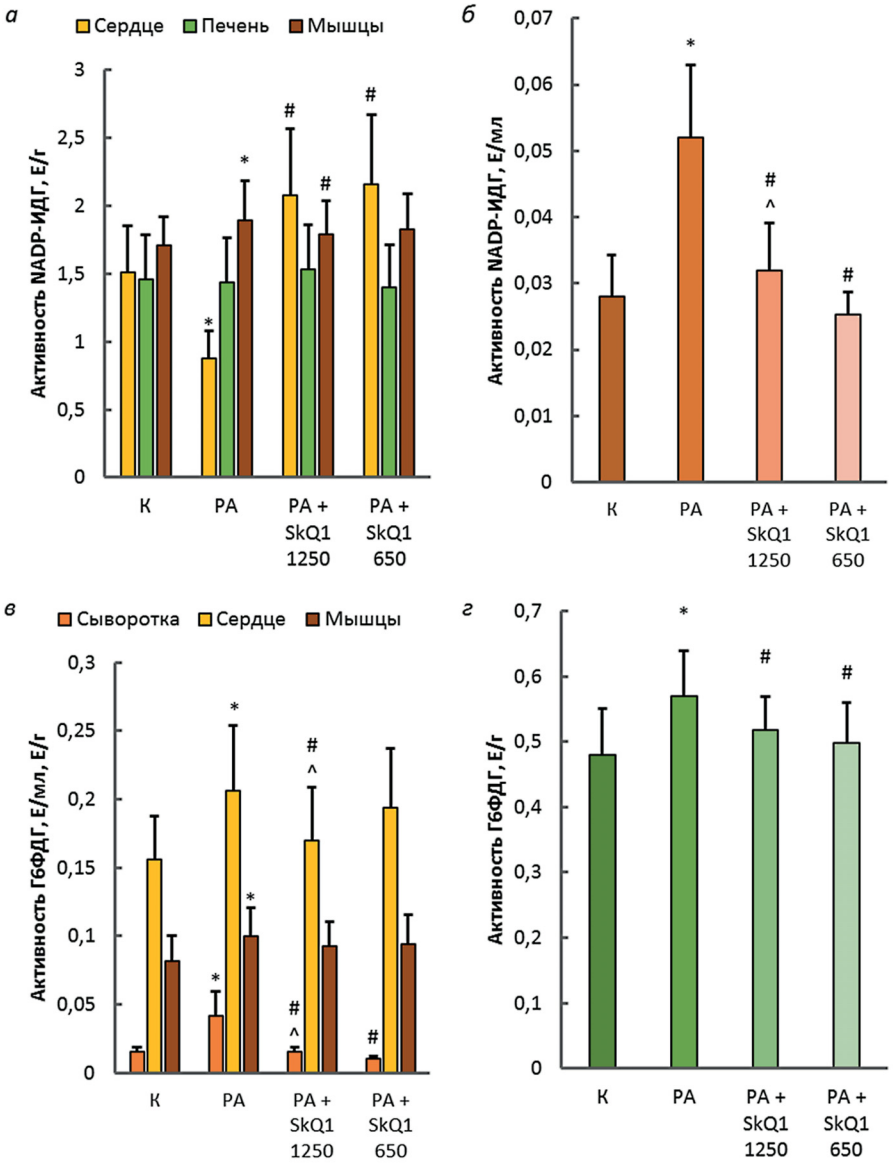

Рис. 4. Активность NADP-ИДГ в сердце, печени, мышцах (*а*) и сыворотке крови (*б*), а также активность Г6ФДГ в сыворотке крови, сердце, мышцах (Е/мл сыворотки и Е/г сырой массы ткани на панели (*в*)) и печени (*г*) животных с РА, получавших SkQ1. К – контроль. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$ по сравнению с контролем; #$p < 0,05$ по сравнению с группой РА; ^$p < 0,05$ по сравнению с группой РА + SkQ1 650

иммунных клеток в совокупности с нормализующим влиянием SkQ1 на показатели иммунного статуса, показанного в настоящем исследовании, лежали в основе уменьшения клинических проявлений патологии у животных с аутоиммунным артритом [21]. Механизм действия SkQ1 мог быть связан с нивелированием дисфункции митохондрий, уменьшением генерации митохондриальных АФК и вызванных ими воспалительных реакций. Действительно, как показали результаты нашей работы, SkQ1 способен существенно снижать интенсивность свободнорадикального окисления при РА.

В соответствии с результатами настоящей работы у крыс с РА, помимо изменения параметров иммунного статуса, наблюдалась интенсификация процессов свободнорадикального окисления, о чём свидетельствовало повышение параметров биохемилюминесценции, отражающих активность свободнорадикальных процессов и общий антиоксидантный потенциал, снижение активности АГ – чувствительной мишени для действия АФК [34], а также накопление субстрата данного фермента – цитрата. Введение SkQ1 крысам с РА приводило к изменению параметров интенсивности свободнорадикального окисления в направлении контрольных значений. Из литературы известно, что уменьшение выраженности окислительного стресса может снизить

степень развития воспалительного ответа и затормозить прогрессирование РА. В частности, применение таких антиоксидантов, как зингерон [35], фанхинолин [36] и витамин Е [37], способствовало снижению уровня продуктов свободнорадикального окисления, восстановлению активности компонентов АОС и торможению воспалительного ответа у экспериментальных животных. Кроме того, имеются сведения о том, что потребление антиоксидантов с пищей способствует смягчению воспалительных состояний и улучшению функции антиоксидантных ферментов у пациентов с РА [38]. Для SkQ1 также известна противовоспалительная активность. В частности, применение данного соединения нормализовывало воспалительный ответ, снижая содержание нейтрофилов и увеличивая содержание макрофагов в процессе заживления ран [39, 40], что достигалось посредством снижения уровня митохондриальных АФК и сопутствующей активации NLRP3 инфламмасомы. Необходимо отметить некоторое преимущество использования митохондриально-направленных антиоксидантов по сравнению с антиокислителями, не обладающими способностью накапливаться преимущественно в митохондриях. В частности, введение зингерона и витамина Е животным с экспериментальным артритом, как упоминалось выше, способствовало снижению выраженности патологии и воспалительных процессов [35, 37], однако для достижения данного эффекта требовалось использовать гораздо более высокие дозировки данных соединений: 128 и 290 тысяч нмоль/кг соответственно, по сравнению с 1250 и 650 нмоль/кг для SkQ1. Фанхинолин оказывал протекторный эффект в дозировках, сравнимых с использованными в настоящей работе [36], но введение данного соединения продолжалось на протяжении 21 дня, в то время как SkQ1 вводили 7 дней. Достаточно высокую протекторную активность при экспериментальном РА продемонстрировал антиоксидант ресвератрол, понижавший степень повреждения синовиальной ткани и тормозивший активацию иммунных клеток [41]. В то же время ресвератрол использовался в дозировке, превышающей таковую для SkQ1 примерно в 44 раза, и вводился 2 месяца. Данные различия подтверждают, что ингибирование свободнорадикального окисления в митохондриях является одним из наиболее эффективных способов смягчения АФК-опосредованного воспаления, поддерживающего прогрессирование аутоиммунного ответа и развитие дегенеративных изменений в суставах.

Ранее нами было показано, что у крыс с РА в условиях интенсификации свободнорадикального окисления наблюдалось развитие дисбаланса в функционировании АОС, заключавшегося в снижении активности ГТ и содержания GSH на фоне повышения активности СОД, каталазы, ГП и ГР [42, 43]. Хотя не существует однозначного мнения о состоянии АОС при РА, хорошо известно, что сдвиг прооксидантно-антиоксидантного баланса в сторону избыточного формирования АФК является одним из ключевых факторов дальнейшей активации воспаления и деструкции тканей при патологии [44]. Как показали полученные в настоящей работе результаты, применение митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 способствовало изменению активности СОД, каталазы, ГП, ГР, ГТ, а также содержания GSH у крыс с РА в направлении показателей контрольной группы. Очевидно, что реализация антиоксидантного эффекта SkQ1 в митохондриях являлась главной причиной нормализации функционирования компонентов АОС у крыс с патологией. Имеются сведения, что некоторые медиаторы воспаления, такие как интерлейкин 1β и фактор некроза опухоли α, могут вызывать изменения функционирования митохондрий. Параллельно с этим окислительный стресс, индуцируемый в условиях активации аутоиммунного ответа и гипоксии в воспалённых суставах, увеличивает количество мутаций в мтДНК и выработку АФК митохондриями, способствуя ещё более сильной активизации воспаления [33, 45]. Таким образом, механизм действия SkQ1 заключался, по-видимому, в разрывании порочного круга нарушения функции митохондрий, сопряжённого с усиленной генерацией АФК и дальнейшей активацией воспалительной реакции посредством высвобождения DAMPs, индукции NLRP3 инфламмасомы и сигнального пути NF-κB.

Основными поставщиками NADPH для восстановления окисленного глутатиона и функционирования глутатионовой АОС являются Г6ФДГ и NADP-ИДГ. Развитие патологии было сопряжено с увеличением активности данных ферментов в тканях крыс, что могло иметь адаптивное значение в связи с возрастанием потребности в NADPH глутатионовой АОС при интенсификации процессов свободнорадикального окисления на фоне РА [42]. Кроме того, NADPH при патологии мог интенсивно потребляться активированными нейтрофилами, обильно производящими супероксидный анион-радикал и вносящими существенный вклад в поддержание воспалительного ответа

и разрушение суставов [46]. Вместе с тем проведённые нами исследования продемонстрировали понижение активности NADP-ИДГ в сердце животных с РА. Имеются литературные данные, свидетельствующие о том, что в сердечной ткани в условиях развития адъювант-индуцированного артрита в существенных количествах накапливается 4-гидроксиноненаль – конечный продукт пероксидного окисления омега-6-полиненасыщенных жирных кислот. 4-Гидроксиноненаль образует аддукты с NADP-ИДГ, инактивируя тем самым данный фермент [47]. Введение животным с патологией SkQ1 приводило к изменению активности NADPH-генерирующих ферментов в направлении контроля, что, очевидно, было сопряжено с нормализацией активности ГП и ГР под действием тестируемого соединения. Помимо этого, снижение интенсивности воспалительных процессов под действием SkQ1 могло также вносить вклад в уменьшение потребности NADPH-оксидазы в NADPH. Известно, что Г6ФДГ играет важную роль не только в поддержании редокс-баланса клеток путём поставки NADPH для глутатионовой АОС, но и в поддержании работы NADPH-оксидазы и воспалительного ответа [48, 49]. В данном свете нормализация активности Г6ФДГ и NADP-ИДГ выглядит как возможный подход к снижению интенсивности генерации АФК при патологиях, сопряжённых с воспалением. Активность NADP-ИДГ в сердце крыс с РА при введении SkQ1 восстанавливалась и несколько превышала значения активности для контрольной группы. По-видимому, вследствие улучшения оксидативного статуса в клетках сердца под действием тестируемого соединения существенно снижалась концентрация 4-гидроксиноненаля, инактивирующего NADP-ИДГ, что давало возможность компенсировать потребность в NADPH данным компонентом метаболизма при окислительном стрессе, вызванном полным адъювантом Фрейнда.

Таким образом, введение крысам с РА SkQ1 способствовало снижению интенсивности свободнорадикального окисления и изменению активности антиоксидантных, NADPH-генерирующих ферментов, содержания GSH и цитрата в направлении значений контрольной группы. Улучшение окислительно-восстановительного баланса в тканях крыс с РА под действием SkQ1 приводило к нормализации параметров иммунного статуса, что, по-видимому, было обусловлено торможением АФК-опосредованной активизации воспаления и аутоиммунного ответа. По совокупности анализируемых показателей дозировка SkQ1 1250 нмоль/кг оказывала более выраженный эффект.

Вклад авторов. Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова – концепция и руководство работой; Д.А. Жаглин, Г.А. Разуваев, С.А. Олейник – проведение экспериментов; Е.Д. Крыльский, Т.Н. Попова – обсуждение результатов исследования, написание текста статьи.

Благодарности. Авторы выражают благодарность директору НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, академику РАН Скулачёву В.П. за предоставление SkQ1 для проведения данного исследования, постоянное внимание, плодотворное обсуждение результатов исследований и ценные рекомендации при выполнении работы. Авторы также выражают признательность генеральному директору ООО «Митотех», ведущему научному сотруднику НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, к.б.н. Скулачёву М.В. за помощь при интерпретации и обсуждении полученных результатов, а также полезные рекомендации для написания представленной рукописи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утверждённым правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Radu, A. F., and Bungau, S. G. (2021) Management of rheumatoid arthritis: an overview, *Cells*, **10**, 2857, doi: 10.3390/cells10112857.
2. Da Fonseca, L. J. S., Nunes-Souza, V., Goulart, M. O. F., and Rabelo, L. A. (2019) Oxidative stress in rheumatoid arthritis: what the future might hold regarding novel biomarkers and add-on therapies, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 7536805, doi: 10.1155/2019/7536805.
3. Phull, A. R., Nasir, B., Ul Haq, I., and Kim, S. J. (2018) Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis,

Chem. Biol. Interact., **281**, 121-136, doi: 10.1016/j.cbi.2017.12.024.
4. Ferreira, H. B., Melo, T., Paiva, A., and Domingues, M. R. (2021) Insights in the role of lipids, oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis unveiled by new trends in lipidomic investigations, *Antioxidants*, **10**, 45, doi: 10.3390/antiox10010045.
5. Mititelu, R. R., Pădureanu, R., Băcănoiu, M., Pădureanu, V., Docea, A. O., Calina, D., Barbulescu, A. L., and Buga, A. M. (2020) Inflammatory and oxidative stress markers – mirror tools in rheumatoid arthritis, *Biomedicines*, **8**, 125, doi: 10.3390/biomedicines8050125.
6. Del Buono, M., Abbate, A., and Toldo, S. (2018) Interplay of inflammation, oxidative stress and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis, *Heart*, **104**, 1991-1992, doi: 10.1136/heartjnl-2018-313313.
7. Radovanović-Dinić, B., Tešić-Rajković, S., Zivkovic, V., and Grgov, S. (2018) Clinical connection between rheumatoid arthritis and liver damage, *Rheumatol. Int.*, **38**, 715-724, doi: 10.1007/s00296-018-4021-5.
8. Steinz, M. M., Santos-Alves, E., and Lanner, J. T. (2020) Skeletal muscle redox signaling in rheumatoid arthritis, *Clin. Sci.*, **134**, 2835-2850, doi: 10.1042/CS20190728.
9. Lee, S. H., Chang, D. K., Goel, A., Boland, C. R., Bugbee, W., Boyle, D. L., Firestein, G. S. (2003) Microsatellite instability and suppressed DNA repair enzyme expression in rheumatoid arthritis, *J. Immunol.*, **170**, 2214-2220, doi: 10.4049/jimmunol.170.4.2214.
10. Biniecka, M., Fox, E., Gao, W., Ng, C. T., Veale, D. J., Fearon, U., and O'Sullivan, J. (2011) Hypoxia induces mitochondrial mutagenesis and dysfunction in inflammatory arthritis, *Arthritis Rheum.*, **63**, 2172-2182, doi: 10.1002/art.30395.
11. Harty, L. C., Biniecka, M., O'Sullivan, J., Fox, E., Mulhall, K., Veale, D. J., and Fearon, U. (2012) Mitochondrial mutagenesis correlates with the local inflammatory environment in arthritis, *Ann. Rheum. Dis.*, **71**, 582-588, doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200245.
12. Kan, S., Duan, M., Liu, Y., Wang, C., and Xie, J. (2014) Role of mitochondria in physiology of chondrocytes and diseases of osteoarthritis and rheumatoid arthritis, *Cartilage*, **13**, 1102S-1121S, doi: 10.1177/19476035211063858.
13. Oğul, Y., Gür, F., Cengiz, M., Gür, B., Sarı, R. A., and Kızıltunç, A. (2021) Evaluation of oxidant and intracellular anti-oxidant activity in rheumatoid arthritis patients: *in vivo* and *in silico* studies, *Int. Immunopharmacol.*, **97**, 107654, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107654.
14. Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A., Fatima, N., and Shahzad, S. (2017) Role of hydrotherapy in the amelioration of oxidant-antioxidant status in rheumatoid arthritis patients, *Int. J. Rheum. Dis.*, **21**, 1822-1830, doi: 10.1111/1756-185X.13118.
15. Behl, T., Upadhyay, T., Singh, S., Chigurupati, S., Alsubayiel, A. M., Mani, V., Vargas-De-La-Cruz, C., Uivarosan, D., Bustea, C., Sava, C., Stoicescu, M., Radu, A. F., Bungau, S. G. (2021) Polyphenols targeting MAPK mediated oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis, *Molecules*, **26**, 6570, doi: 10.3390/molecules26216570.
16. Fan, X. X., Xu, M. Z., Leung, E. L. H., Jun, C., Yuan, Z., and Liu, L. (2020) ROS-responsive berberine polymeric micelles effectively suppressed the inflammation of rheumatoid arthritis by targeting mitochondria, *Nano Micro Lett.*, **12**, 76, doi: 10.1007/s40820-020-0410-x.
17. D'Amico, D., Olmer, M., Fouassier, A. M., Valdés, P., Andreux, P. A., Rinsch, C., and Lotz, M. (2022) Urolithin A improves mitochondrial health, reduces cartilage degeneration, and alleviates pain in osteoarthritis, *Aging Cell*, **21**, e13662, doi: 10.1111/acel.13662.
18. Сенокосова Е. А., Крутицкий С. С., Груздева О. В., Антонова Л. В., Скулачев М. В., Григорьев Е. В. (2022) Исследование антиоксидантного эффекта митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на модели изолированного сердца крысы, *Общая реаниматология*, **18**, 36-44, doi: 10.15360/1813-9779-2022-4-36-44.
19. Skulachev, V. P., Anisimov, V. N., Antonenko, Y. N., Bakeeva, L. E., Chernyak, B. V., Erichev, V. P., Filenko, O. F., Kalinina, N. I., Kapelko, V. I., Kolosova, N. G., Kopnin, B. P., Korshunova, G. A., Lichinitser, M. R., Obukhova, L. A., Pasyukova, E. G., Pisarenko, O. I., Roginsky, V. A., Ruuge, E. K., Senin, I. I., Severina, I. I., Skulachev, M. V., Spivak, I. M., Tashlitsky, V. N., Tkachuk, V. A., Vyssokikh, M. Y., Yaguzhinsky, L. S., and Zorov, D. B. (2009) An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 437-461, doi: 10.1016/j.bbabio.2008.12.008.
20. Wei, Y., Troger, A., Spahiu, V., Perekhvatova, N., Skulachev, M., Petrov, A., Chernyak, B., and Asbell, P. (2019) The role of SKQ1 (visomitin) in inflammation and wound healing of the ocular surface, *Ophthalmol. Ther.*, **8**, 63-73, doi: 10.1007/s40123-018-0158-2.
21. Andreev-Andrievskiy, A. A., Kolosova, N. G., Stefanova, N. A., Lovat, M. V., Egorov, M. V., Manskikh, V. N., Zinovkin, R. A., Galkin, I. I., Prikhodko, A. S., Skulachev, M. V., and Lukashev, A. N. (2016) Efficacy of mitochondrial antioxidant plastoquinonyl-decyl-triphenylphosphonium bromide (SkQ1) in the rat model of autoimmune arthritis, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 8703645, doi: 10.1155/2016/8703645.
22. Taurog, J. D., Argentieri, D. C., McReynolds, R. A. (1988) Adjuvant arthritis, *Methods Enzymol.*, **162**, 339-355, doi: 10.1016/0076-6879(88)62089-1.
23. Луговская С. А., Морозова В. Т., Почтарь М. Е., Долгов В. В. (2014) *Лабораторная гематология*, Триада, Тверь.

24. Piskarev, I. M., Trofimova, S. V., Ivanova, I. P., and Burkhina, O. E. (2015) Investigation of the level of free-radical processes in substrates and biological samples using induced chemiluminescence, *Biophysics*, **60**, 400-408, doi: 10.1134/S0006350915030148.
25. Recknagel, R. O., and Ghoshal, A. K. (1966) Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids induced by carbon tetrachloride, *Nature*, **210**, 1162-1163, doi: 10.1038/2101162a0.
26. Nishikimi, M., Rao, N. A., and Yagi, K. (1972) The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 849-864, doi: 10.1016/s0006-291x(72)80218-3.
27. Góth, L. (1991) A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range, *Clin. Chim. Acta*, **196**, 143-151, doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-m.
28. Paglia, D. E., and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase, *Lab. Clin. Med.*, **70**, 158-169.
29. Zanetti, G. (1979) Rabbit liver glutathione reductase. Purification and properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 241-246, doi: 10.1016/0003-9861(79)90415-6.
30. Warholm, M., Guthenberg, C., Von Bahr, C., and Mannervik, B. (1985) Glutathione transferases from human liver, *Method Enzymol.*, **113**, 499-504, doi: 10.1016/s0076-6879(85)13065-x.
31. Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys.*, **82**, 70-77, doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
32. Афанасьев В. Г., Зайцев В. С., Вольфсон Т. И. (1973) К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра, *Лаб. дело*, **4**, 115-116.
33. López-Armada, M. J., Fernández-Rodríguez, J. A., and Blanco, F. J. (2022) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in rheumatoid arthritis, *Antioxidants*, **11**, 1151, doi: 10.3390/antiox11061151.
34. Liu, R. Z., Zhang, S., Zhang, W., Zhao, X. Y., and Du, G. H. (2023) Baicalein attenuates brain iron accumulation through protecting aconitase 1 from oxidative stress in rotenone-induced Parkinson's disease in rats, *Antioxidants*, **12**, 12, doi: 10.3390/antiox12010012.
35. Bashir, N., Ahmad, S. B., Rehman, M. U., Muzamil, S., Bhat, R. R., Mir, M. U. R., Shazly, G. A., Ibrahim, M. A., Elossaily, G. M., Sherif, A. Y., and Kazi, M. (2021) Zingerone (4-(four-hydroxy-3-methylphenyl) butane-two-1) modulates adjuvant-induced rheumatoid arthritis by regulating inflammatory cytokines and antioxidants, *Redox Rep.*, **26**, 62-70, doi: 10.1080/13510002.2021.1907518.
36. Lu, S., Liu, T., Li, H., and Fan, H. (2019) Fangchinoline supplementation attenuates inflammatory markers in experimental rheumatoid arthritis-induced rats, *Biomed. Pharmacother.*, **111**, 142-150, doi: 10.1016/j.biopha.2018.12.043.
37. Dai, W., Qi, C., and Wang, S. (2018) Synergistic effect of glucosamine and vitamin E against experimental rheumatoid arthritis in neonatal rats, *Biomed. Pharmacother.*, **105**, 835-840, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.136.
38. Arablou, T., Aryaeian, N., Djalali, M., Shahram, F., and Rasouli, L. (2019) Association between dietary intake of some antioxidant micronutrients with some inflammatory and antioxidant markers in active rheumatoid arthritis patients, *Int. J. Vitamin Nutr. Res.*, **89**, 238-245, doi: 10.1024/0300-9831/a000255.
39. Demyanenko, I. A., Popova, E. N., Zakharova, V. V., Ilyinskaya, O. P., Vasilieva, T. V., Romashchenko, V. P., Fedorov, A. V., Manskikh, V. N., Skulachev, M. V., Zinovkin, R. A., Pletjushkina, O. Y., Skulachev, V. P., and Chernyak, B. V. (2015) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice, *Aging (Albany NY)*, **7**, 475-485, doi: 10.18632/aging.100772.
40. Demyanenko, I. A., Zakharova, V. V., Ilyinskaya, O. P., Vasilieva, T. V., Fedorov, A. V., Manskikh, V. N., Zinovkin, R. A., Pletjushkina, O. Y., Chernyak, B. V., Skulachev, V. P., and Popova, E. N. (2017) Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves dermal wound healing in genetically diabetic mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 6408278, doi: 10.1155/2017/6408278.
41. Riveiro-Naveira, R. R., Valcárcel-Ares, M. N., Almonte-Becerril, M., Vaamonde-García, C., Loureiro, J., Hermida-Carballo, L., López-Peláez, E., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. (2016) Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model, *Rheumatology*, **55**, 1889-1900, doi: 10.1093/rheumatology/kew255.
42. Kryl'skii, E. D., Popova, T. N., and Kirilova, E. M. (2015) Activity of glutathione antioxidant system and NADPH-generating enzymes in rats with experimental rheumatoid arthritis, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 24-27, doi: 10.1007/s10517-015-3089-0.
43. Крыльский Е. Д., Попова Т. Н., Кирилова Е. М., Сафонова О. А. (2016) Воздействие липоевой кислоты на активность каспаз, показатели иммунного и антиоксидантного статуса при ревматоидном артрите у крыс, *Биоорг. химия*, **42**, 431-439, doi: 10.7868/S0132342316040138.
44. Ponist, S., Zloh, M., and Bauerova, K. (2019) in *Animal Models in Medicine and Biology* (Tvrdá, E., and Yenisetti, S. C., eds), IntechOpen, London, pp. 195-216.
45. Cai, W. W., Yu, Y., Zong, S. Y., and Wei, F. (2020) Metabolic reprogramming as a key regulator in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Inflamm. Res.*, **69**, 1087-1101, doi: 10.1007/s00011-020-01391-5.
46. Benna, J. E., Hayem, G., Dang, P. M. C., Fay,

M., Chollet-Martin, S., Elbim, C., Meyer, O., and Gougerot-Pocidalo, M. A. (2002) NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy, *Inflammation*, **26**, 273-278, doi: 10.1023/a:1021460517468.

47. Shi, Q., Abusarah, J., Baroudi, G., Fernandes, J. C., Fahmi, H., and Benderdour, M. (2012) Ramipril attenuates lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, **14**, R223, doi: 10.1186/ar4062.
48. Nadeem, A., Al-Harbi, N. O., Ahmad, S. F., Ibrahim, K. E., Siddiqui, N., and Al-Harbi, M. M. (2018) Glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition attenuates acute lung injury through reduction in NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, *Clin. Exp. Immunol.*, **191**, 279-287, doi: 10.1111/cei.13097.
49. Martínez-Navarro, F. J., Martínez-Morcillo, F. J., López-Muñoz, A., Pardo-Sánchez, I., Martínez-Menchón, T., Corbalán-Vélez, R., Cayuela, M. L., Pérez-Oliva, A. B., García-Moreno, D., and Mulero, V. (2020) The vitamin B6-regulated enzymes PYGL and G6PD fuel NADPH oxidases to promote skin inflammation, *Dev. Comp. Immunol.*, **108**, 103666, doi: 10.1016/j.dci.2020.103666.

SkQ1 IMPROVES IMMUNE STATUS AND NORMALISES THE ACTIVITY OF ANTIOXIDANT AND NADPH-GENERATING ENZYMES IN ADJUVANT-INDUCED RHEUMATOID ARTHRITIS IN RATS

E. D. Kryl'skii*, T. N. Popova, D. A. Zhaglin, G. A. Razuvaev, and S. A. Oleynik

Voronezh State University, 394018 Voronezh, Russia; e-mail: evgenij.krylsky@yandex.ru

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe systemic autoimmune inflammatory disease. Oxidative stress and excessive formation of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) are now considered to be the central pathogenetic mechanisms of connective tissue component destruction and the factors responsible for a highly active inflammatory process and autoimmune response. The aim of the present work was to evaluate the effect of mitochondrial-directed antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on immune status, intensity of free radical-induced oxidation and functioning of antioxidant system (AOS) and NADPH-generating enzymes in rats with adjuvant-induced RA. Laboratory animals were divided into 4 groups: a control group; a group of animals with RA; animals injected intraperitoneally with SkQ1 at a dose of 1250 nmol/kg every 24 hours during the next 8 days from day 7 of RA development, and animals given SkQ1 at a dose of 625 nmol/kg according to the above scheme. Material for the study was taken on day 15 after the start of the experiment. The rate of erythrocyte sedimentation, the level of circulating immune complexes, and the concentration of immunoglobulins A, M and G were determined in rats by enzyme immunoassay. The intensity of free radical-induced oxidation was assessed by iron-induced biochemiluminescence, diene conjugate content and aconitate hydratase activity. Enzyme activity and metabolite content in animal tissues were analysed spectrophotometrically. The results of the work showed that the development of RA was associated with an increase in the indicators of immune response and intensity of free radical-induced oxidation. The development of an imbalance in AOS functioning and an increase in the activity of NADPH-generating enzymes was also observed. The administration of SkQ1 resulted in a dose-dependent change in the oxidative status indicators towards the control, which was accompanied by the normalization of the immune status parameters. It seems that the tested compound decreased the level of mitochondrial ROS, resulting in an inhibition of the inflammatory response. The consequence of these changes could be inhibition of free radical generation by immunocompetent cells and subsequent mitigation of the severity of oxidative stress in the tissues.

Keywords: 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium, rheumatoid arthritis, oxidative stress, immune status, immunoglobulins, antioxidant system