

УДК 578.821

Индукцированный адьювантом артрит у морских свинок

О. С. Таранов, С. Н. Якубицкий, Т. С. Непомнящих, А. Е. Нестеров, С. Н. Щелкунов*

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Кольцово, Новосибирская обл.

*E-mail: snshchel@rambler.ru; snshchel@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 28.03.2016

Принята в печать 30.05.2016

РЕФЕРАТ Предложена модель ревматоидного артрита, индуцируемого у беспородных морских свинок однократной инъекцией полного адьюванта Фрейнда подкожно в стопу задней конечности. В этой модели гистологически выявляются характерные для ревматоидного артрита в острой фазе отложения фибрина на поверхности синовиальной оболочки, лейкоцитарная инфильтрация синовиальной оболочки и окружающих тканей, разрастания грануляционной ткани и появление участков ангиоматоза. Клеточная реакция выражается увеличением количества плазмоцитов и образованием фолликулоподобных лимфоидных инфильтратов, эрозивным поражением суставной поверхности хряща, нередко с его глубокой деструкцией на больших участках, и поражением эпифизов костей. Показана высокая воспроизводимость индукции артрита в данной модели. Сделано заключение о перспективности использования этой модели для оценки противоартритных препаратов и схем их применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адьювант-индуцированный артрит, морская свинка, ревматоидный артрит.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АИА – адьювант-индуцированный артрит; РА – ревматоидный артрит; СФА – полный адьювант Фрейнда.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) – гетерогенное аутоиммунное заболевание, характеризующееся системным воспалением соединительной ткани. Морфологически при РА наблюдаются воспалительные явления в тканях суставной сумки, пролиферация и гиперплазия клеток синовиальной оболочки, формирование паннуса, структурное разрушение хряща и субхондральной кости. РА характеризуется неуклонно прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, приводящим к ранней потере трудоспособности и сокращению продолжительности жизни. РА болеют около 70 млн жителей земного шара, чаще всего болезнь поражает людей старшего возраста. Причины, обуславливающие развитие артрита, до сих пор четко не определены, возможно, вследствие их множественности [1–4].

Для изучения патогенеза РА и разработки лекарственных средств, эффективных при данном заболевании, используют различные животные модели. При этом подавляющее большинство исследований по индукции и терапии РА выполняют на определенных линиях мышей и крыс [1, 2, 5, 6]. Это обусловлено, в первую очередь, хорошей генетической изученностью и гомогенностью данных линий животных и большим числом имеющихся иммунологических

реагентов и тест-систем. Однако ни одна из моделей не отражает полностью всех аспектов развития РА человека [1, 5, 7], поэтому доклинические исследования потенциальных противоартритных препаратов необходимо проводить одновременно на разных животных моделях.

Генетическая гетерогенность людей и вероятная множественность механизмов индукции развития артрита делают актуальным использование в качестве моделей РА лабораторных животных, приближенных по своим физиологическим и иммунологическим свойствам к человеку. Считается, что морские свинки представляют более адекватную модель для изучения и разработки методов терапии различных воспалительных и инфекционных заболеваний человека, чем мыши и крысы [8–10].

Целью нашей работы было создание воспроизводимой модели адьювант-индуцированного артрита (АИА) у беспородных морских свинок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Использовали самок беспородных морских свинок массой 200–250 г (возраст 3–4 недели), полученных из питомника животных ГНЦ ВБ «Вектор».

Животных содержали при естественном световом режиме и постоянном доступе к воде и пище.

Индукция артрита адьювантом Фрейнда

Животным в стопу задней левой лапы подкожно вводили раствор полного адьюванта Фрейнда (CFA) в объеме 50, 100 или 200 мкл, формируя группы «50», «100» и «200» соответственно. Морским свинкам контрольной группы («К») вводили 200 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS). В контрольной группе и группе «50» было по 9 морских свинок, в группе «100» – 14, в группе «200» – 10 животных.

Через 1 сут после инъекции CFA, а затем каждые 3–4 сут измеряли ширину дистального района плюсны обеих задних лап. По 2–3 особи групп «К», «50» и «200» выводили из эксперимента под эфирным наркозом согласно правилам использования животных с соблюдением принципов гуманности, изложенным в Директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации в сроки 16, 28, 42 и 56 сут. Патологические изменения, вызванные введением CFA, оценивали путем гистологического исследования тканей обеих задних конечностей опытных и контрольных животных. Всех животных группы «100» вывели из эксперимента на 28 сут после инъекции CFA.

Гистологический анализ

Задние конечности морских свинок фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия) в течение 48 ч. Затем образцы, содержащие кость, декальцинировали препаратом BioDec R (Bio Optica Milano, Италия) в течение 48–72 ч. После декальцинации для приготовления гистологических препаратов задние стопы животных пересекали в сагиттальном направлении как описано в [2]. Дальнейшую обработку материала проводили по общепринятой для гистологических препаратов методике: последовательно обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали в смеси ксилолпарафин и заливали в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для дифференцированного окрашивания соединительной ткани применяли окраску по Ван Гизон. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенном цифровой камерой высокого разрешения HRC (Carl Zeiss, Германия) с использованием пакета программ AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия).

Для статистической обработки результатов гистологического анализа образцов животных группы

«100» применяли балльную оценку степени патологических проявлений заболевания в разных группах. Тяжесть заболевания оценивали по четырем признакам: наличие воспалительной реакции в тканях суставной сумки, степень выраженности синовита (образование паннуса), эрозия хрящевой ткани и деструкция суставной поверхности кости.

Воспалительную реакцию оценивали в 1 балл при инфильтрации единичными лимфоцитами и гранулоцитами тканей, окружающих сустав; 2 балла – при выраженной инфильтрации, образовании небольших лимфоцитарно-гистиоцитарных узелков, умеренно выраженном отеке околоуставных тканей. При выраженной диффузной инфильтрации мягких тканей клетками макрофагального ряда, лимфоцитами, гранулоцитами и плазматическими клетками, образовании плотного инфильтрата, выраженном отеке степень воспалительной реакции считали равной 3 баллам.

Степень развития синовита оценивали следующим образом: 1 балл – отмечаются признаки набухания синовиальной оболочки и пролиферация синовиоцитов; 2 балла – в местах соприкосновения синовиальной оболочки и хряща, образующего суставную поверхность, активно пролиферирующая грануляционная ткань формирует паннус; 3 балла – паннус «наползает» на суставной хрящ и разрушает его.

Разрушение хряща оценивали по глубине повреждения: 1 балл – эрозия поверхностного слоя (суставной поверхности) либо появление полостей, лишенных клеток; 2 балла – повреждения распространяются на половину толщины хряща; 3 балла – деструкция захватывает весь хрящ.

Степень деструкции кости: 1 балл – появление небольших участков резорбции в эпифизарных участках костей, образующих сустав; 2 балла – локальные повреждения кортикального слоя в области эпифиза; 3 балла – обширное повреждение кортикального слоя, разрушение трабекул губчатого вещества, деформация кости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические проявления артрита при инъекции CFA морским свинкам

Беспорядным морским свинкам подкожно в стопу задней левой лапы вводили CFA в объеме 50, 100 или 200 мкл. Измерения ширины дистального района плюсны обеих задних лап показали, что размер задней конечности, в которую вводили адьювант, увеличивается в результате развития воспалительной реакции (рис. 1). Реакция (отек и воспаление) на инъекцию CFA проявлялась уже в первые сутки после инъекции, отек обработанной лапы активно увели-

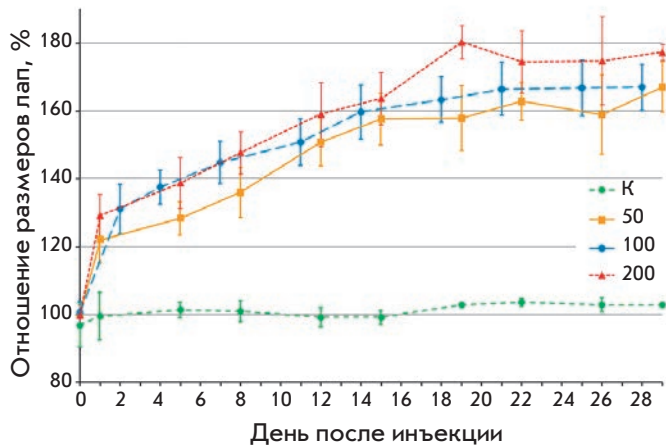


Рис. 1. Развитие воспалительной реакции в левой задней лапе морских свинок после инъекции полного адьюванта Фрейнда объемом 50 (группа «50»), 100 («100») или 200 («200») мкл. Приведено процентное соотношение ширины опытной левой лапы и необработанной правой. Данные представлены как среднее арифметическое в группе \pm стандартное отклонение. К – контрольная группа животных, в левую лапу которых ввели 100 мкл PBS

чивался в первые 2 недели, затем этот показатель практически выходил на плато. При этом в группе «200» отек был сильнее и охватывал почти всю лапу (рис. 2).

Гистологический анализ задних лап морских свинок с АИА, группа «200»

Патоморфологические проявления артрита были однотипными во всех группах животных с АИА. Наиболее интенсивные изменения выявлены в задней левой лапе (на стороне инъекции индуцирующего препарата CFA) в группе «200», поэтому дальнейшее описание в данном разделе касается именно этой группы.

К 16 сут эксперимента на фоне неизменных поверхностных слоев кожи в сетчатом слое дермы, в подкожной жировой клетчатке и между волокнами мышечной ткани обнаруживали диффузную плотную клеточную инфильтрацию. В составе инфильтрата преобладали гранулоциты (преимущественно нейтрофилы), макрофаги и небольшое количество плазматических клеток. В центральной части особенно крупных областей инфильтрации иногда обнаруживали зоны некротического распада. В области суставов наблюдали выраженный отек, воспалительно-клеточную инфильтрацию (рис. 3B), гемодинамические расстройства в виде резкого полнокровия сосудов мелкого и среднего калибра, стаза и тромбо-

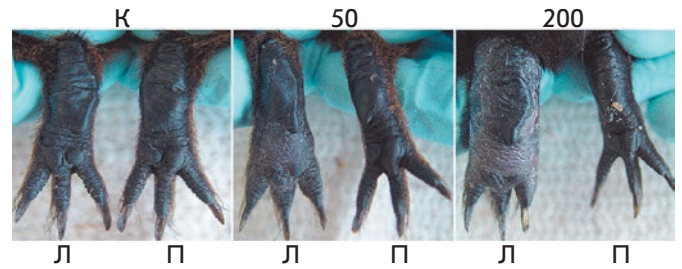


Рис. 2. Внешний вид задних конечностей морских свинок контрольной группы (К) и групп «50» и «200» через 37 сут после инъекции CFA. Л, П – левая и правая лапы

за мелких сосудов венозного русла. Синовиальная оболочка была набухшей и резко утолщенной за счет пролиферации клеток. В краевой зоне синовиальной оболочки, в месте, где она прилежит к хрящу, наблюдали развитие грануляционной ткани и распространение ее на суставную поверхность хряща (рис. 3Г). Повреждения хряща ограничивались различной величины эрозиями, трещинами и образованием в хряще бесклеточных зон (рис. 4B). Изменений субхондральной костной ткани на этом сроке эксперимента не обнаружено (рис. 4Г).

К 28 сут нарастали явления отека и воспалительно-клеточной инфильтрации в мягких тканях, окружающих сустав (рис. 3Д). Поражения суставов прогрессировали. Воспалительный процесс преимущественно затрагивал крупные суставы: голеностопный и таранно-ладьевидный. Мелкие суставы предплюсны и плюсны были повреждены в меньшей степени. Наблюдали резкое утолщение синовиальной оболочки, покрывающей ворсины, пролиферирующие синовиальные клетки располагались в несколько слоев. В некоторых случаях синовиальные клетки слущивались в полость сустава (рис. 3E). В подэпителиальном слое пространство вокруг сосудов было расширено, наблюдался выраженный периваскулярный отек, отек и расслоение мышечной оболочки сосудов, отек и утолщение эндотелия, маргинация и адгезия нейтрофилов на эндотелиоцитах. По краям суставного хряща обнаруживали разрастание грануляционной ткани, которая в виде паннуса «наползала» на хрящ (рис. 4Д). Хрящевая ткань повреждалась в разной степени, как правило, выявляли довольно обширные поля эрозии поверхностного слоя и участки деструкции, иногда распространявшиеся на всю толщину хряща. Обнаруживали истончение субхондральной костной пластинки и появление довольно обширных зон деструкции кортикального слоя (рис. 4E).

Через 42 сут после введения CFA на стороне введения обнаруживали массивную инфильтрацию мяг-

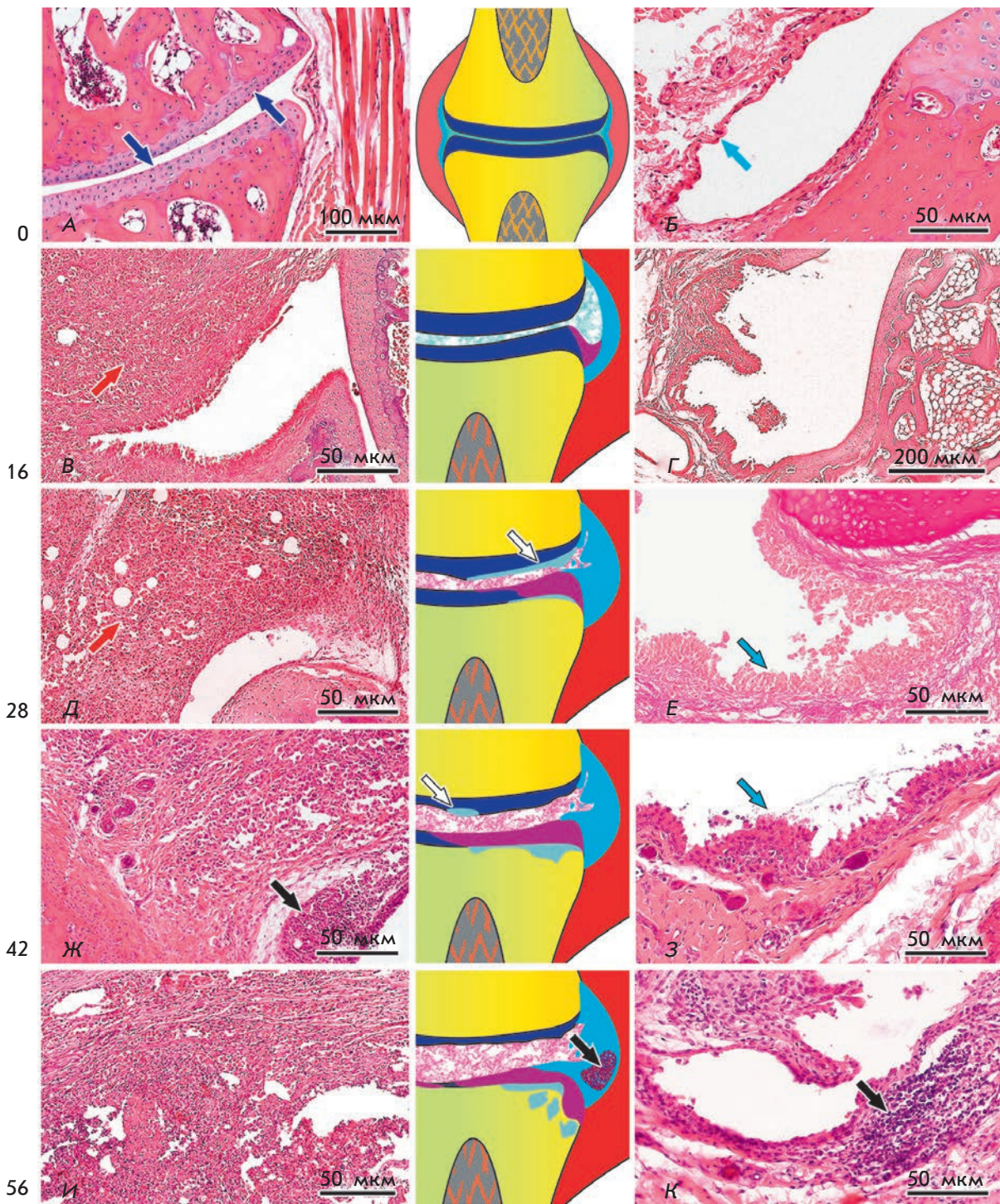


Рис. 3. Динамика воспалительных проявлений в околосуставных тканях (левая колонка) и синовиальной оболочке (правая колонка) (см. пояснения в тексте).

Окраска гематоксилином и эозином (снимок E – препарат окрашен по Ван Гизон). На схемах (центральная колонка) основные элементы сустава и патологические проявления артрита обозначены цветом: костная ткань – желтым, хрящ – синим, суставная сумка (воспаление) – красным, синовиальная оболочка – голубым. Пурпурным цветом выделен паннус, серым – повреждения костных трабекул губчатого вещества кости. Соответствующие структуры указаны стрелками на микрофотографиях. Цвета стрелок соответствуют цветам на схеме. Белыми стрелками указаны эрозивные поражения поверхности суставного хряща, черными – гранулема под синовиальной оболочкой

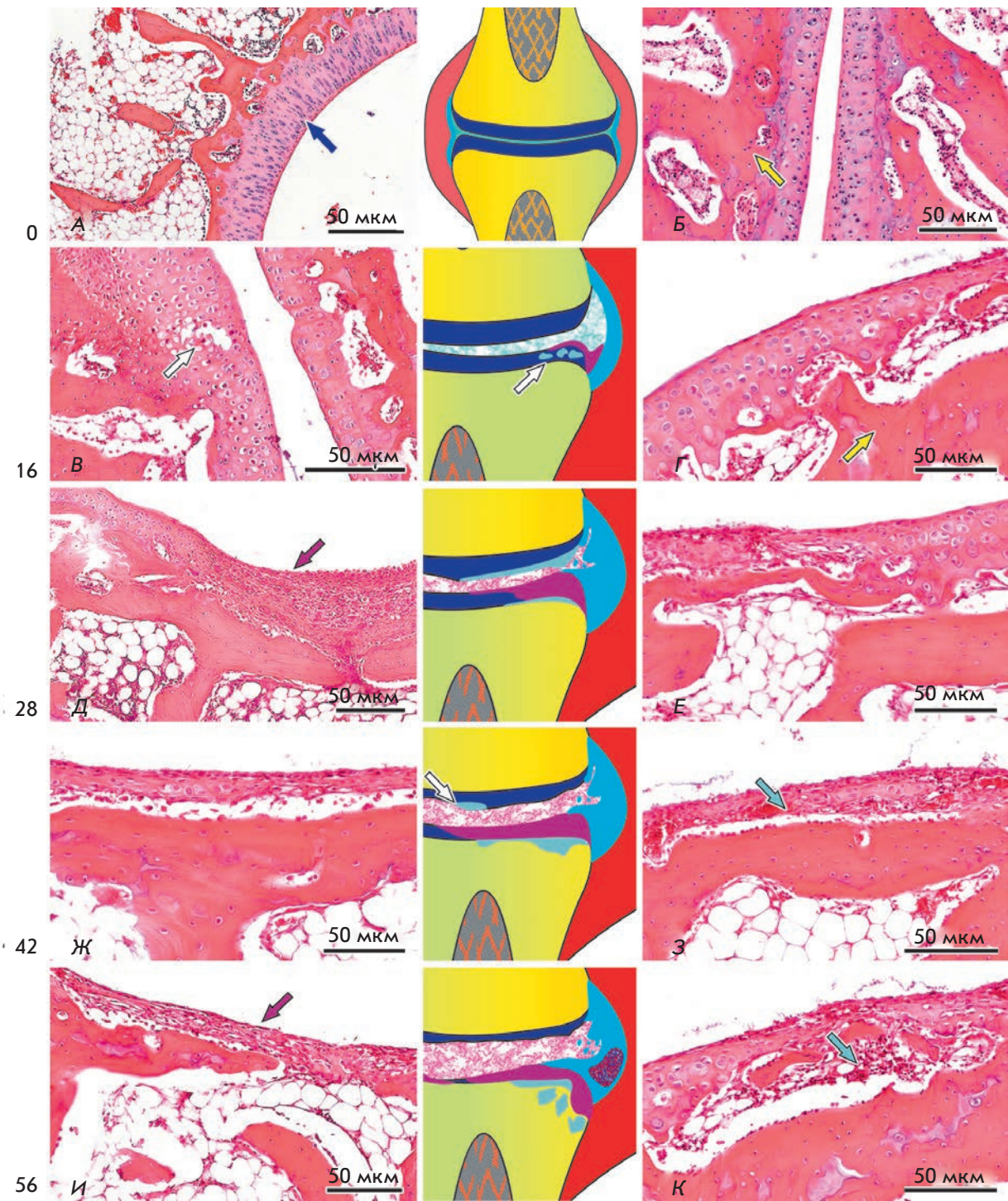


Рис. 4. Динамика поражения суставного хряща (левая колонка) и подлежащей кости (правая колонка) (см. пояснения в тексте). Окраска гематоксилином и эозином. На схемах (центральная колонка) цветовые обозначения те же, что и на рис. 3

ких тканей стопы с участками некроза в центральной части инфильтрата. По периферии очагов инфильтрации наблюдали ангиоматоз, полнокровие, большое количество фибробластов, что свидетельствовало о начале активного процесса репарации тканей суставной сумки (рис. 3Ж). Синовиальная оболочка была резко отечной, ее гипертрофированные ворсины глубоко вдавались в полость сустава. Под оболочкой и в ворсинах наблюдали активный процесс новообразования сосудов и регенерации соединительной ткани (рис. 3З). Поражения хряща и кости были множественными и захватывали как крупные суставы, так и мелкие суставы плюсны. Степень деградации также была различной – от маргинальной деформации хряща (рис. 4Ж) до полной потери хряща на значительной площади суставной поверхности и локального разрушения костных трабекул губчатого вещества кости (рис. 4З).

На 56 сут эксперимента наблюдали некоторое снижение активности воспалительного процесса и при этом усиление склероза тканей, окружающих воспалительный инфильтрат (рис. 3И). В некоторых случаях соединительная ткань прорастала в инфильтрат, образуя более мелкие клеточно-фиброзные гранулемы, окруженные фиброзной капсулой. Несмотря на снижение воспалительной реакции в окружающих тканях, воспалительный процесс в синовиальной оболочке оставался активным. Проявления синовита различной степени выраженности наблюдали у всех животных. Под синовиальной оболочкой, кроме диффузной инфильтрации, нередко обнаруживали небольшие грануломатозные узелки (рис. 3К). Наблюдали глубокую деструкцию суставного хряща (рис. 4И) и прорастание грануляционной ткани в губчатое вещество кости (рис. 4К).

В правых задних необработанных конечностях воспаление проявлялось в виде небольших очагов воспалительно-клеточной инфильтрации, в основном по ходу сосудов небольшого калибра. Тем не менее проявления синовита, хотя и в гораздо меньшей степени, чем на стороне инъекции СФА, обнаруживали через 42 и 56 сут после введения адъюванта. Кроме того, через 56 сут в этих конечностях выявляли эрозивные поражения суставного хряща.

Гистологический анализ задних лап морских свинок с АИА, группа «50»

Патологические изменения в задних конечностях морских свинок группы «50» отличались от изменений в группе «200» в основном степенью их проявлений. В группе «50» воспалительные явления в околосуставной сумке и окружающих тканях достигали максимума через 28 сут после инъекции СФА, в то время как в группе «200» активный воспа-

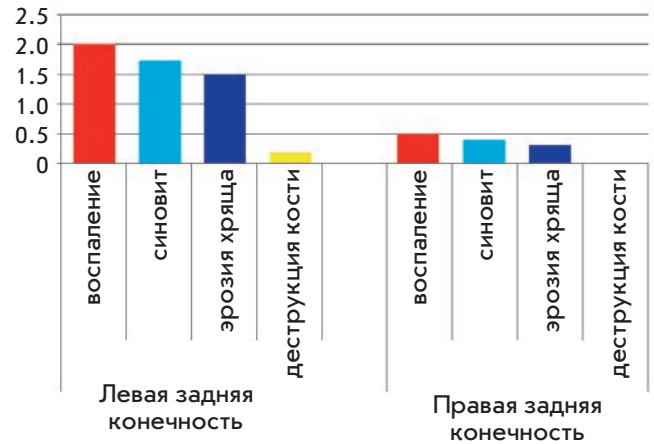


Рис. 5. Сравнительная характеристика степени поражения параартикулярных и суставных тканей в задних конечностях морских свинок: на стороне инъекции СФА (левая) и в симметричной интактной конечности (правая). Приведены средние значения каждого показателя для всей группы «100»

лительный процесс продолжался и на протяжении 42 сут эксперимента. К 28 сут в обеих группах появлялись первые признаки регенерации вокруг очага воспаления в виде пролиферации сосудов и разрастания рыхлой неоформленной соединительной ткани. В суставе наблюдались глубокие эрозии хряща и деструктивные поражения кортикального слоя кости, усиливающиеся в более поздние сроки. Однако степень проявления этих признаков была значительно меньше, чем в группе «200». Кроме того, патологический процесс захватывал, как правило, один сустав, в то время как в группе «200» поражались два или даже три сустава задней конечности.

Воспроизводимость АИА у морских свинок, группа «100»

У всех 14 морских свинок группы «100», которую мы использовали для оценки воспроизводимости АИА, на стороне инъекции СФА (левая задняя лапа) развивалось характерное для ревматоидного артрита поражение синовиальной оболочки и суставного хряща. Кроме эрозии поверхности хряща, обнаруженной у всех животных этой группы, в половине случаев деструкция распространялась на половину толщины суставного хряща, а в двух случаях на отдельных участках хрящ был разрушен полностью, и наблюдалось повреждение подлежащей кости. У четырех животных, несмотря на довольно выраженное воспаление в тканях суставной сумки и в синовиальной оболочке, суставной хрящ голеностопного сустава

Таблица Оценка патологических изменений в тканях задних конечностей морских свинок, вызванных введением 100 мкл СГА (пояснения см. в тексте)

Животное, номер	На стороне инъекции СГА (левая лапа)				Интактная (правая лапа)			
	воспаление	синовит	эрозия хряща	деструкция кости	воспаление	синовит	эрозия хряща	деструкция кости
1	3	2	2	0	0	0	0	0
2	2	1	1	0	1	0	0	0
3	2	2	3	0	0	0	0	0
4	3	1	2	1	0	0	0	0
5	2	2	1	0	1	1	0	0
6	2	2	2	0	1	0	0	0
7	3	2	2	0	0	1	0	0
8	2	2	1	0	1	0	0	0
9	1	2	1	0	0	0	0	0
10	2	1	1	0	0	0	0	0
11	2	2	2	1	1	1	1	0
12	1	1	1	0	1	1	3	0
13	2	2	1	0	1	1	0	0
14	1	2	1	0	0	0	0	0

не был поражен. В то же время у этих животных наблюдалась деструкция хряща других суставов.

В симметричных месту введения СГА конечностях воспаление практически отсутствовало. Выявляли лишь небольшие очаги воспалительно-клеточной инфильтрации по ходу сосудов небольшого калибра. Тем не менее у половины животных отмечены умеренно выраженные проявления синовита, а у двух – эрозивные поражения суставного хряща. Причем в одном случае на ограниченном участке деструкция хрящевой ткани распространялась на всю толщину суставного хряща, что, однако, не укладывается в общую картину поражения в этой группе животных. Степень различных патологических проявлений у отдельных животных, оцененная по трехбалльной шкале (см. раздел «Экспериментальная часть»), приведена в *таблице*, а средние суммарные значения для всей группы «100» приведены на *рис. 5*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что РА – заболевание, для которого характерны различия как в молекулярных механизмах возникновения, так и в чувствительности отдельных индивидов к разным терапевтическим препаратам. Поэтому при тестировании потенциальных противовоспалительных препаратов рекомендуется использовать разные лабораторные модели [1–3, 5, 6, 11]. В настоящее время наиболее хорошо изучены модели индуцированного артрита, в которых используются некоторые линии мышей и крыс [1, 2, 5, 6]. Однако ни одна из этих моделей не отражает все особенности РА

у человека [5], поэтому поиск дополнительных экспериментальных моделей РА остается актуальным.

Мы оценили эффективность индукции артрита после инъекции СГА подкожно в стопу задней конечности беспородных морских свинок и воспроизводимое развитие у них АИА.

Показано, что в результате введения индуцирующего артрит препарата СГА на стороне инъекции развивается гранулематозное воспаление мягких тканей стопы, распространяющееся на суставные сумки крупных и мелких суставов. Активная фаза воспаления в околосуставных тканях стихает к 42 сут эксперимента. Через 28 сут появляются, а в дальнейшем усиливаются явления склероза, приводящие к инкапсуляции очага воспаления. В то же время патологический процесс в самом суставе, приводящий к глубокой деструкции суставного хряща и подлежащей кости, не прекращается и на последнем сроке наблюдения (56 сут), что может свидетельствовать о переходе артрита в хроническую форму. Несмотря на довольно выраженное воспаление в околосуставных тканях, патологические процессы развиваются не во всех суставах задней конечности. При этом частота и степень поражения суставов явно зависят от введенной дозы. В группе «200», где индуцирующая доза была самой высокой, отмечены наиболее тяжелые поражения суставов.

В данной модели присутствуют характерные для РА в острой фазе отложения фибрина на поверхности синовиальной оболочки, лейкоцитарная инфильтрация синовиальной оболочки и окружаю-

щих тканей, продуктивная реакция в виде разрастания грануляционной ткани и появление участков ангиоматоза. Клеточная реакция, выражающаяся увеличением количества плазмочитов и образованием фолликулоподобных лимфоидных инфильтратов, эрозивным поражением суставной поверхности хряща, нередко с его глубокой деструкцией на больших участках, и поражением эпифизов костей, дополняет картину системного заболевания.

Известно, что даже использование линейных мышцей или крыс обычно не приводит к индукции экспериментального артрита у всех исследуемых животных [1, 2]. Это снижает информативность данных, полученных при доклинических испытаниях новых методов терапии РА. Поэтому поиск хорошо воспроизводимых моделей индуцированного артрита остается важным направлением исследований [2, 11, 12]. Мы количественно оценили воспроизводимость АИА у морских свинок в группе «100». Показано (таблица), что введение СГА в дозе 100 мкл вызывало выраженное поражение тканей суставов (на стороне введения препарата), что свидетельствует о хорошей воспроизводимости индукции артрита в использованной модели РА и ее перспективности для оценки противоартритных препаратов и схем их применения. Следует отметить, что через 28 сут в правой (необработанной) задней лапе всех морских свинок группы «100», за исключением животного № 12 (та-

блица), патологические изменения отсутствовали либо были существенно менее выражены, чем в левой (обработанной) лапе.

По-видимому, дистрофические процессы в подлежащей костной ткани животных группы «100» к этому времени (28 сут) не успевают развиться в полной мере, вследствие чего выраженность воспалительного процесса, довольно заметная в суставных тканях, не всегда коррелирует с поражением субхондральной кости. Однако в модели, которая будет использоваться для оценки эффективности перспективных препаратов, это скорее преимущество, чем недостаток, так как далеко зашедший деструктивный процесс в суставе труднее поддается воздействию терапевтических препаратов и соответственно затрудняет оценку результатов лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена лабораторная модель РА, основанная на подкожной инъекции СГА беспородным морским свинкам. Показана высокая эффективность и воспроизводимость АИА у этих животных. Разработанная модель расширит возможности доклинического тестирования противоартритных препаратов. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 14-15-00050).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Шелкунов С.Н. // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. С. 203–210.
2. Bolon B., Stolina M., King C., Middleton S., Gasser J., Zack D., Feige U. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. Article ID 569068.
3. Evans C.H., Ghivizzani S.C., Robbins P.D. // Transl. Res. 2013. V. 161. P. 205–216.
4. Chemin K., Klareskog L., Malmstrom V. // Curr. Opin. Rheumatol. 2016. V. 28. P. 181–188.
5. Vincent T.L., Williams R.O., Maciewicz R., Silman A., Garside P. // Rheumatology. 2012. V. 51. P. 1931–1941.
6. Bevaart L., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. // Arthritis Rheum. 2010. V. 62. P. 2192–2205.
7. Schurgers E., Billiau A., Matthys P. // J. Interferon Cytokine Res. 2011. V. 31. P. 917–926.
8. Padilla-Carlin D.J., McMurray D.N., Hickey A.J. // Comp. Med. 2008. V. 58. P. 324–340.
9. Fernandez M.L., Volek J. // Nutr. Metab. 2006. V. 3. P. 17.
10. Thangavel R.R., Bouvier N.M. // J. Immunol. Meth. 2014. V. 410. P. 60–79.
11. Hu Y., Cheng W., Cai W., Yue Y., Li J., Zhang P. // Clin. Rheumatol. 2013. V. 32. P. 161–165.
12. Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Зварцев Р.В., Чашина А.А., Чудаков Д.М., Тиллиб С.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 1648–1656.