

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 616.72-002.77-092.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА**М. В. Громыко, А. И. Грицук****Гомельский государственный медицинский университет**

В обзоре рассматриваются и анализируются наиболее распространенные экспериментальные модели ревматоидного артрита: коллаген-индуцированный, адьювант-индуцированный и пристан-индуцированный.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, адьювант-индуцированный артрит, коллаген-индуцированный артрит, пристан-индуцированный артрит, животные модели РА, РА в эксперименте, РА у крыс, адьювант Фрейнда, артрит экспериментальный, способы моделирования артрита.

EXPERIMENTAL MODELS OF RHEUMATOID ARTHRITIS**M. V. Gromyko, A. I. Gritsuk****Gomel State Medical University**

The review covers and analyzes the most common experimental models of rheumatoid arthritis, i.e. adjuvant-induced, collagen-induced and pristane-induced forms.

Key words: rheumatoid arthritis, adjuvant-induced arthritis, collagen-induced arthritis, pristane-induced arthritis, RA animal models, experimental RA, RA in rats, Freund's adjuvant, experimental arthritis, arthritis modeling methods.

Ревматоидный артрит (РА) — весьма распространенное (страдает около 1 % населения Земли) хроническое аутоиммунное, системное заболевание с неблагоприятным исходом. Для него характерно поражение синовиальной оболочки суставов, ее гиперплазия и быстрое увеличение объема синовиальной ткани с прогрессирующей деструкцией хрящевой и костной ткани. Для его изучения широко используются экспериментальные модели, индуцированные у обычных и генетически модифицированных животных, которые достигают различной степени сходства с болезнью человека и являются ценным инструментом для изучения потенциальных методов лечения. Исследования на животных моделях привели к ряду важных открытий, которые расширили наше понимание патогенеза аутоиммунных заболеваний, в том числе роль, которую сыграли регуляторные Т-клетки и TH17 клетки. Кроме того, важные терапевтические успехи были достигнуты благодаря исследованиям иммунного статуса животных моделей. В результате доклинических испытаний в экспериментальных исследованиях были апробированы препараты, блокирующие фактор некроза опухоли (ФНО), которые нашли применение для лечения РА.

При выборе экспериментальной модели РА важными критериями являются: 1) адекватность клинических проявлений модели и/или патогенеза таковым при РА у человека, 2) возможность прогноза эффективности при-

менения лекарственных препаратов у человека и 3) доступность, простота выполнения модели, воспроизводимость данных, разумная продолжительность испытательного периода и др.

Из-за молекулярной гетерогенности и сложных клинических проявлений данного заболевания в настоящее время не существует «универсальной» модели РА, а разработанные модели весьма разнообразны по способам исполнения. С одной стороны, это является недостатком, поскольку сложно унифицировать результаты экспериментальных исследований, полученных на разных моделях, а с другой — это обстоятельство может стать большим преимуществом, поскольку каждая из используемых моделей демонстрирует частные патофизиологические пути, позволяя, таким образом, оценить РА с различных сторон. По способу исполнения существуют наиболее распространенные экспериментальные модели РА [1]:

1. Артриты, индуцированные введением масляных растворов:

- а) адьювант-индуцированный артрит;
- б) пристан-индуцированный артрит.

2. Модели с преимущественным поражением хрящевой ткани:

- а) коллаген-индуцированный артрит.

3. Артриты, индуцированные инфекционными агентами:

- а) компонентами стрептококковой клеточной стенки;
- б) различного типа.

Помимо данных моделей существуют модели, разработанные на трансгенных животных (мышях).

Индукцированные модели чаще всего используются для скрининга или тестирования потенциальных лекарственных средств.

Коллаген-индуцированный артрит (КИА) — «стандартная» экспериментальная модель основана на способности бычьего коллагена II типа, основного белка суставного хряща, стимулировать у мышей или крыс выработку антител против костной и хрящевой ткани. Модель наиболее часто используется для разработки средств профилактики и лечения РА. Длительность исследования — 45 дней.

КИА является экспериментальным аутоиммунным заболеванием, которое развивается у восприимчивых грызунов (крыс и мышей) и приматов вскоре после иммунизации в виде аутоиммунно-опосредованного полиартрита, сходного с РА по клиническим, гистологическим и иммунологическим параметрам. В частности, у мышей и крыс развивается интенсивный синовиит, что точно соответствует начальной клинической картине артрита [2–4]. Как и при РА, у восприимчивых к КИА грызунов молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса играют существенную патогенетическую роль. Развитие артрита сопровождается надежным Т- и В-клеточным ответом к коллагену II типа. Данная модель РА позволяет проводить клиническое тестирование таких лекарственных препаратов, как кортикостероиды, индометацин и в меньшей степени — метотрексат [5].

Индукцию КИА вызывают введением нативного бычьего коллагена II типа с неполным адьювантом Фрейнда однократно внутривенно в заднюю часть спины и основание хвоста в 4–6 точек по 400 мкг коллагена на крысу под анестезией.

Подготовку антигена производят путем растворения и перемешивания при 4 °С 2–4 мг/мл коллагена II типа в 100 мл 10 мМ уксусной кислоты. Важно, чтобы раствор коллагена был охлажденным, что предотвращает его денатурацию. В случае денатурации эффективность индукции артрита снижается примерно наполовину. В ряде случаев к раствору коллагена добавляют тщательно растертые в ступке убитые нагреванием микобактерии туберкулеза.

В коллаген-индуцированной модели артрит возникает у части животных, что позволяет сравнить особенности образования аутоантител у животных, подверженных этому заболеванию и устойчивых к нему. Развитие артрита у восприимчивых крыс ассоциировано со слабой и непродолжительной продукцией ревматоидного фактора в первые две недели после иммунизации бычьим коллагеном, тогда как у устойчивых к артриту крыс наблюдался сильный и продолжительный ответ ревматоидного

фактора. Показано, что уровень антител к бычьему коллагену и аутоантител к коллагену в модели коллаген-индуцированного артрита крыс зависит от уровня продукции ревматоидного фактора, что указывает на вовлечение ревматоидного фактора и лимфоцитов, его продуцирующих, в физиологическую регуляцию антиколлагеновых лимфоцитов посредством идиотип-антиидиотипических взаимодействий [6].

Адьювант-индуцированный артрит (АИА) — одна из старейших экспериментальных моделей, которая используется для тестирования лекарственных препаратов, предназначенных для лечения РА. Длительность исследования — 30 дней. Вид животных — крыса.

Сходство АИА с РА человека заключается в наличии отека конечностей, дегенерации хрящей, лимфоцитарной инфильтрации воспаленной ткани суставов, утрате их функции, кроме того, отмечается резорбция кости и надкостницы; однако повреждение хряща происходит в меньшей степени, чем у крыс с КИА и у человека с РА [7]. Отличие этой модели от РА заключается в том, что у животных с АИА также страдают позвоночник, желудочно-кишечный тракт, моче-половые пути, кожа и глаза, что похоже на спондилоартропатию человека [8]. Модель АИА Т-клеточнoзависима и комплементнезависима [9–12]. В лимфатических узлах и (или) воспаленных суставах крыс с АИА было обнаружено повышенное содержание ФНО, интерферонов γ (INF γ) и интерлейкинов типа IL1, IL6 и IL17A [13, 14]. Блокада ФНО, IL1, IL21 и IL17A у крыс с АИА улучшает течение заболевания, что свидетельствует о роли этих цитокинов в патогенезе экспериментального артрита [15–17].

Индукцию АИА осуществляют внутривенным или подкожным введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ), который содержит убитые микобактерии, суспензированные в масле [18]. Масляную эмульсию адьюванта иногда называют неполным адьювантом Фрейнда (НАФ).

Возможно введение полного адьюванта Фрейнда с добавлением микобактерии или в виде инъекций синтетического адьюванта, производного гидроксиэтилпропандиамина. Адьювант может быть введен в основание хвоста или в одну из подушечек лап [19], что позволяет изучить острую воспалительную реакцию в месте введения, а также иммунологическую реакцию, которая развивается примерно через 9 дней в контралатеральной лапе и различных органах. Отек задней лапы контролируется с самого первого дня (9 день — начало болезни) до 15 или более в зависимости от продолжительности эксперимента. На более поздних стадиях заболевания (12 день и далее) крысы с АИА часто неподвижны из-за тяжести отека лапы и им требуется специальный уход, включая га-

рантированный доступ к воде и пище. При использовании модели с целью разработки профилактических мероприятий терапевтические препараты применяют с нулевого дня, а в случае необходимости отработки лечебной стратегии препараты назначают с восьмого дня создания модели.

Известна модификация способа моделирования РА у крыс путем введения 0,07–0,08 мл полного адьюванта Фрейнда, после чего в период с 14 по 28 сутки животного подвергают воздействию иммобилизационного стресса в течение 1 часа ежедневно. Недостатками способа являются большая продолжительность периода создания модели (28 суток), применение на протяжении 2 недель ежедневной часовой иммобилизации, а также трудности технического характера в виде внутрикожного введения ПАФ.

Помимо всего прочего, введение бактериальных антигенов в модели АИА вызывает сильный бактерииспецифический иммунный ответ, что провоцирует иммунную систему крыс на развитие системной адьювантной болезни [20]. Альтернативная модель индукции РА у крыс с неполным адьювантом Фрейнда не требует введения иммуногенного материала, но развивающаяся болезнь не имеет хронического течения, что ограничивает его использование для экспериментального изучения РА.

Пристан-индуцированный артрит (ПИА) — неиммуногенная экспериментальная модель, которая наиболее полно имитирует картину РА у человека [21–25]. Длительность исследования — 30 дней. Воспалительный агент — масляный раствор пристана (2,6,10,14-тетраметилпентадекан). Пристан — артритогенный компонент, естественный насыщенный терпеноид алканов, обнаруженный в минеральном масле, нашел важное применение в медицинских исследованиях и биотехнологии, включая индукцию аутоиммунных заболеваний и артрита. Однократное подкожное введение небольшого количества пристана крысам и мышам приводит к развитию острого тяжелого воспаления, переходящего в хроническую рецидивирующую фазу.

Модель имитирует ранние стадии РА и, следовательно, подходит для разработки и изучения эффективности профилактического или терапевтического вмешательства на ранних стадиях заболевания. Вид животных — крыса, мышь.

По данным некоторых авторов, АИА плохо отражает критерии РА и потому не является его адекватной моделью [26], ведет к развитию острого системного воспаления, вызывающего у животных небольшие страдания. Новая модель, разработанная на основе пристана, точно имитирует РА критерии, в том числе хроническое рецидивирующее течение заболевания. Модель, индуцированная синтетическими или естественными маслами пристана, проста в использовании и легко воспроизводима.

Чтобы вызвать иммунную реакцию, приводящую к развитию артрита, 150 мкл пристана вводят внутрикожно у основания хвоста (либо внутрибрюшинно). Через 2 недели после однократной внутрикожной инъекции пристана у крыс развиваются тяжелые и хронические артриты.

Одной из наиболее важных и полезных особенностей этой модели является формирование выраженного хронического течения суставно-специфического заболевания, которое напоминает РА с характерной хрящевой и костной эрозией суставов. ПИА удовлетворяет клиническим критериям, соответствующим РА, поскольку предполагает участие регуляторных Т-клеточных механизмов и МНС генов. Распространение пристана по организму приводит к ранней местной реакции в лимфатических узлах и к системным реакциям. Уже через несколько дней после адьювантной инъекции можно наблюдать повышение уровня белков острой фазы в крови, фибриногена и α 1-кислых гликопротеинов, а также IL-6. Ответ может быть связан с прямым влиянием адьюванта на печень, но также может быть косвенно вызван такими цитокинами, как IL-6 и IL-1, α -ФНО. Макроскопически артрит появляется в периферических суставах после задержки, по крайней мере, 1 или 2 недель с аналогичной локализацией как при РА. Пораженные суставы содержат несколько воспалительных типов клеток, включая Т-клетки [27].

Заключение

Каждая из рассмотренных моделей РА имеет свои преимущества и недостатки. Коллаген-индуцированный артрит является адекватной экспериментальной моделью РА, недостатками которой являются трудоемкая процедура подготовки антигена, необходимость введения антигена крысам в 4–6 точек под анестезией, длительность проведения эксперимента — 45 дней и медленное развитие клинических проявлений артрита. Недостатками модели адьювант-индуцированного артрита является то, что введение бактериальных антигенов в модели АИА вызывает сильный бактерииспецифический иммунный ответ, приводящий иногда к развитию системной адьювантной болезни и системного острого воспалительного процесса, плохо отражающих РА критерии и приносящего животным значительные страдания. Пристан-индуцированный артрит — неиммуногенная модель, наиболее близко имитирующая РА у человека, в том числе хроническое рецидивирующее течение заболевания, тогда как введение других адьювантов, таких как адьювант Фрейнда и микобактерии туберкулеза, растворенные в минеральном масле, провоцируют развитие острого процесса. Модель также имитирует ранние стадии РА и, следовательно, подходит для разработки различных мер

профилактического или терапевтического характера на ранних стадиях заболевания.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Cuzzocrea, S Characterization of a novel and spontaneous mouse model of inflammatory arthritis / S. Cuzzocrea // *Arthritis Research & Therapy*. — 2011. — Vol. 13. — P. 126–129.
2. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis / R. Holmdahl [et al.] // *Immunol Rev*. — 1990. — Vol. 118. — P. 193–232.
3. Histological, immunological and biochemical studies on type II collagen arthritis in rats / K. Terato [et al.] // *Biomed Res*. — 1982. — Vol. 3. — P. 495–523.
4. Williams, R Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis / R. Williams // *Methods Mol Med*. — 2004. — Vol. 98. — P. 207–216.
5. Animal models of arthritis: relevance to human disease / A. Bendele [et al.] // *Toxicologic Pathol*. — 1999. — Vol. 27. — P. 134–142.
6. Бедулева, Л. В. Идиотип-антиидиотипические взаимодействия как механизм развития коллаген-индуцированного артрита у крыс / Л. В. Бедулева, И. В. Меньшиков // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. — 2006. — № 3. — С. 14–17.
7. Bendele, A. Sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis / A. Bendele // *Arthritis Rheum*. — 1999. — Vol. 42. — P. 498–506.
8. Waksman, B. Immune regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis / B. Waksman // *Scand J Immunol*. — 2002. — Vol. 56. — P. 12–34.
9. Suppression and prevention of adjuvant arthritis in rats by a monoclonal antibody to the a/b T cell receptor / S. Yoshino [et al.] // *Eur. J. Immunol*. — 1990. — Vol. 20. — P. 2805–2808.
10. Linton, S. Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis / S. Linton, B. Morgan // *Mol Immunol*. — 1999. — Vol. 36. — P. 905–914.
11. Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis / L. Santos [et al.] // *Clin Exp Immunol*. — 1997. — Vol. 107. — P. 248–253.
12. Issekutz, T. Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation / T. Issekutz, M. Miyasaka, A. Issekutz. // *J Exp Med*. — 1996. — Vol. 183. — P. 2175–2184.
13. Cytokine mRNA in the joints and draining lymph nodes of rats with adjuvant arthritis and effects of cyclosporine A / L. Ayer [et al.] // *Inflammation*. — 2000. — Vol. 24. — P. 447–461.
14. Cytokine expression and synovial pathology in the initiation and spontaneous resolution phases of adjuvant arthritis: interleukin-17 expression is upregulated in early disease / K. Bush [et al.] // *Clin. Exp. Immunol*. — 2001. — Vol. 123. — P. 487–495.
15. Anti-interleukin-1 and anti-tumor necrosis factor- α synergistically inhibit adjuvant arthritis in Lewis rats / U. Feige [et al.] // *Cell. Mol. Life Sci*. — 2000. — Vol. 57. — P. 1457–1470.
16. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis / D. Young [et al.] // *Arthritis Rheum*. — 2007. — Vol. 56. — P. 1152–1163.
17. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein / K. Bush [et al.] // *Arthritis Rheum*. — 2002. — Vol. 46. — P. 802–805.
18. Allison, A. An adjuvant formulation that selectively elicits the formation of antibodies of protective isotypes and of cell-mediated immunity / A. Allison, N. Byars // *J. Immunol. Methods*. — 1986. — Vol. 95. — P. 157–168.
19. Копьева, Т. Н. Патология ревматоидного артрита / Т. Н. Копьева. — М.: Медицина, 1980. — 208 с.
20. Pearson, C. Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats by injection of mycobacterial adjuvant / C. Pearson, F. Wood // *Arthritis Rheum*. — 1959. — Vol. 2. — P. 440–459.
21. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes / C. Vingsbo [et al.] // *Am J Pathol*. — 1996. — Vol. 149. — P. 1675–1683.
22. Bedwell, A. Immunological involvement in the pathogenesis of pristane induced arthritis / A. Bedwell, C. Elson, C. Hinton // *Scand J Immunol*. — 1987. — Vol. 25. — P. 393–398.
23. Pristane induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease / P. Wooley [et al.] // *Arthritis Rheum*. — 1989. — Vol. 32. — P. 1022–1030.
24. The role of oil and agalactosyl IgG in the induction of arthritis in rodent models / G. Rook [et al.] // *Eur. J. Immunol*. — 1991. — Vol. 21. — P. 1027–1032.
25. Hitsumoto, Y. Relationship between interleukin 6, agalactosyl IgG and pristane-induced arthritis / Y. Hitsumoto, et al. // *Autoimmunity*. — 1992. — Vol. 11. — P. 247–254.
26. Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis / R. Holmdahl [et al.] // *Immunol Rev*. — 2001. — Vol. 184. — P. 184–202.
27. Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in chronic erosive arthritis in rats / C. Vingsbo-Lundberg [et al.] // *Arthritis Rheum*. — 1998. — Vol. 41. — P. 544–550.

Поступила 16.03.2012

УДК 572.781

ОСТЕО-АНТРОПОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНЫХ ОСТАНКОВ

Р. В. Дорошенко, Э. А. Надыров, О. А. Макушников, В. В. Радюк

Гомельский государственный медицинский университет
Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека, г. Гомель

Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины

В данной статье представлены результаты медико-антропологического исследования костных останков из трех курганов могильника д. Мохов, предоставленных кафедрой истории восточных славян ГГУ им. Ф. Скорины. Целью данной работы являлось сравнение данных об останках, получаемых с помощью археологических и медико-антропологических методов, оценка достоверности информации, полученной при использовании каждого из методов. При сравнении результатов исследования показано, что по отдельным параметрам медико-антропологическое исследование дает значительно более точные результаты.

Ключевые слова: костная ткань, кремация, osteo-антропологическое исследование.

OSTEOANTHROPOLOGICAL STUDY OF BONE REMAINS

R. V. Doroshenko, E. A. Nadyrov, O. A. Makushnikov, V. V. Raduik

Gomel State Medical University
Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel
Gomel State University named after F. Skorina

This article presents the results of medical and anthropological study of the bone remains found in the three burial mounds of Mokhov, provided by the Department of Eastern Slavs History of Gomel State University named after F. Skorina. The aim of this work was to compare the data on the fossils obtained by archaeological and medical and an-