

СРАВНЕНИЕ ВЫРАЖЕННОСТИ ВОСПАЛЕНИЯ У КРЫС С ПЕРВИЧНОЙ РЕАКЦИЕЙ И ВТОРИЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИЕЙ НА ИНЪЕКЦИЮ ПОЛНОГО АДЬЮВАНТА ФРЕЙНДА

А.И. Матюшкин*, Е.А. Иванова, С.В. Алексеева, К.С. Качалов, Т.А. Воронина

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Модель хронического иммунного воспаления, вызванного введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу крыс, рассматривают в качестве модели ревматоидного артрита, при которой развивается повреждение суставов других конечностей, помимо той, в которую вводят ПАФ. Цель исследования — сравнить выраженность патологического процесса у крыс с первичной реакцией (отек левой задней лапы) и вторичной иммунологической воспалительной реакцией (отек правой задней лапы) на инъекцию ПАФ в левую заднюю лапу.

Воспаление моделировали введением 0,1 мл ПАФ в левую заднюю лапу аутобредных крыс. Отечность задних лап в области плюсны и голеностопного сустава, температуру кожи лап и массу животных регистрировали на 7, 14, 21, 28 сутки опыта. Порог болевой чувствительности оценивали на 15 сутки; гематологические показатели — на 14 и 28 сутки.

На 7 сутки после введения ПАФ у 11 из 20 животных развилась первичная реакция и вторичная иммунологическая реакция, у остальных крыс наблюдалось воспаление только левой задней лапы; температура кожи задних лап крыс с воспалением была выше, чем в контрольной группе. На 14 день опыта у крыс с моделью воспаления был зарегистрирован максимальный отек лап; повышен ряд гематологических показателей, причем более выражено — у крыс с генерализацией воспаления. В группах животных с первичной реакцией и с генерализацией воспалительного процесса снижался болевой порог. На 28 день у этих крыс наблюдалось уменьшение отека лап и нормализация гематологических показателей.

Таким образом, к 14 суткам после введения ПАФ у животных с первичной реакцией и с генерализацией воспалительного процесса наблюдается максимальная выраженность патологического процесса, которая снижается к 28 суткам. Это необходимо учитывать при планировании экспериментов по оценке фармакологической активности соединений на данной модели.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, полный адьювант Фрейнда, хроническое иммунное воспаление, подошвенный тест, крысы

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Алексеева С.В., Качалов К.С., Воронина Т.А. Сравнение выраженности воспаления у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на инъекцию полного адьюванта Фрейнда. *Биомедицина*. 2019;15(2):75–87. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-75-87>

Поступила 27.01.2019

Принята после доработки 03.04.2019

Опубликована 10.06.2019

COMPARISON OF THE SEVERITY OF INFLAMMATION IN RATS WITH A PRIMARY REACTION AND SECONDARY IMMUNOLOGICAL REACTION TO AN INJECTION OF FREUND'S COMPLETE ADJUVANT

Alexander I. Matyushkin*, Elena A. Ivanova, Svetlana V. Alekseeva, Kirill S. Kachalov,
Tatyana A. Voronina

*Research Zakusov Institute of Pharmacology
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya str., 8*

The model of chronic immune inflammation caused by the administration of Freund's complete adjuvant (CFA) into a hind paw of rats is used as a model of rheumatoid arthritis. Under this condition, the joints of other limbs, along with those subject to the action of CFA, are damaged. The aim of this study was to compare the severity of the inflammatory process in rats with a primary reaction (edema of the left hind paw) and a secondary immunological inflammatory response (edema of the right hind paw) towards a sub-plantar injection of CFA in the left hind paw of the experimental animals.

Inflammation was induced by the sub-plantar administration of 0.1 ml of CFA into the left hind paw of outbred rats. Such indicators as the edema of the metatarsus and the ankle joints of the hind paws, the weight of the animals and the skin temperature of the paws were recorded on the 7th, 14th, 21st and 28th day of the experiment. The pain threshold was recorded using a plantar test on the 15th day. Hematological parameters were assessed on the 14th and 28th day.

Both a primary reaction and a secondary immunological reaction was developed on the 7th day of the experiment in 11 out of 20 animals having received CFA, while the rest of the rats demonstrated inflammation exclusively in the left hind paw. On the 7th day of the experiment, the animals with inflammation showed a higher skin temperature in the hind paws compared to the control group. The maximum edema in the rats with a primary reaction and secondary immunological inflammatory response was recorded on the 14th day of the experiment. On the 14th day, the rats with induced inflammation showed an increase in a number of hematological parameters, with the elevation being more pronounced in the animals with generalized inflammation. As a result of inflammation, pain sensitivity increased in both groups of animals with induced inflammation. In these groups, both a decrease in the edema of the paws and the normalization of hematological parameters were observed on the 28th day of the experiment. It is concluded that the most pronounced inflammatory reaction has developed by the 14th day following CFA administration, with its intensity having reduced by the 28th day. These results might be useful when assessing the pharmacological activity of various compounds using this model.

Keywords: rheumatoid arthritis, Freund's complete adjuvant, chronic immune inflammation, plantar test, rats

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Matyushkin A.I., Ivanova E.A., Alekseeva S.V., Kachalov K.S., Voronina T.A. Comparison of the Severity of Inflammation in Rats with a Primary Reaction and Secondary Immunological Reaction to an Injection of Freund's Complete Adjuvant. *Journal Biomed.* 2019;15(2):75–87. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-2-75-87>

Submitted 27.01.2019

Revised 03.04.2019

Published 10.06.2019

Введение

По заболеваемости на 100 тыс. населения болезни костно-мышечной системы (XIII класс МКБ-10) находятся на третьем месте после болезней органов дыхания и системы кровообращения [1]. Согласно данным Министерства здравоохранения РФ, в период с 2006 по 2017 гг. распространенность заболеваний костно-мышечной системы среди населения РФ увеличилась на 35% и достигла 19 260 000 чел. [3]. Ревматоидный артрит (РА) занимает ведущее место среди воспалительных заболеваний опорно-двигательного аппарата [1]. Согласно клиническим рекомендациям основные средства медикаментозной терапии РА включают нестероидные противовоспалительные препараты, глюкокортикоиды, базисные противовоспалительные препараты [4]. Выбор препаратов при РА зачастую ограничен развитием у пациентов нежелательных реакций на лекарственную терапию, плохой переносимостью и недостаточной эффективностью лекарственных средств [4]. Поэтому разработка новых препаратов и схем комбинированной терапии РА на сегодняшний день является одной из актуальных задач медико-биологических наук. Согласно действующему руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств влияние соединений-кандидатов на хроническое иммунное воспаление изучают на модели адьювантного артрита у крыс, вызванного субплантарным введением полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) в заднюю лапу [6]. Эта модель разрабатывалась с середины прошлого столетия [11, 15] и является широко известной и используемой как в России, так и за рубежом по сей день [5, 13, 19]. На этой модели у крыс наблюдаются как внешние признаки артрита (деформация конечностей, их отечность и эритема), так и патоморфологические изменения поражений суставов, характерные для РА в клинике [8]; снижается порог болевой

реакции поврежденной конечности в тесте механического раздражения лапы, однако не наблюдается повышения болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения и в тесте механического раздражения хвоста [14]. Характерной особенностью модели является то, что при субплантарном введении ПАФ полиартрит развивается только у крыс, попытки моделирования полиартрита введением ПАФ другим лабораторным животным потерпели неудачу [12]. Однако вторичная иммунологическая реакция (повреждение задней конечности, контралатеральной той, в которую вводят ПАФ) у крыс с адьювантным артритом формируется не у всех особей. Так, в работе Е.В. Шекуновой и соавт. [8] описано развитие генерализации патологического процесса той или иной выраженности примерно у 41% животных с этой моделью: у 25% крыс она затрагивает суставы контралатеральной задней конечности, суставы передних конечностей и суставы хвоста; у 16% крыс она проявляется поражением суставов контралатеральной по отношению к стороне инъекции ПАФ задней лапы. Рядом исследователей субплантарная инъекция ПАФ в заднюю лапу крыс используется как модель артрита, при которой у животных регистрируют отечность только той лапы, в которую вводят ПАФ [2, 7]. Таким образом, на модели воспаления у крыс, вызванного субплантарной инъекцией ПАФ в заднюю лапу, можно регистрировать отек лапы, в которую вводят индуктор воспаления (первичная реакция на ПАФ), и отек контралатеральной лапы (вторичная иммунологическая реакция на ПАФ), имея в виду, что вторичная иммунологическая реакция развивается примерно у половины особей группы.

Цель исследования — сравнить выраженность патологического процесса у животных с первичной реакцией и вторичной иммунологической воспалительной реак-

цией на субплантарную инъекцию ПАФ в заднюю лапу.

Материалы и методы

Исследование выполнено на самцах половозрелых аутбредных белых крыс первоначальной массой 260–300 г. Животных получали из питомника лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Организация и проведение работы выполнялись в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Воспалительный процесс у крыс ($n=20$) моделировали путем субплантарного введения в левую заднюю стопу 0,1 мл ПАФ (взвесь БЦЖ в вазелиновом масле, Sigma-Aldrich, США) [6]. Контрольными животными служили крысы без экспериментальной патологии ($n=15$). Выраженность воспаления оценивали в динамике по нарастанию симптомов первичной реакции (отек левой задней лапы) и вторичной иммунологической реакции (отек правой задней лапы) на инъекцию ПАФ. Регистрировали увеличение диаметра стоп в плюсневой области и диаметра голеностопных суставов животных на 7, 14, 21 и 28 сут эксперимента по сравнению с фоновыми значениями (до введения ПАФ). Диаметр стоп в плюсневой

области и диаметр голеностопных суставов задних конечностей измеряли с помощью инженерного штангенциркуля. Крыс с воспалением, вызванным субплантарным введением ПАФ, делили на две группы в зависимости от наличия у них вторичной иммунологической реакции на 7 день опыта и проводили сравнительное исследование выраженности патологического процесса в этих группах.

На 7, 14, 21 и 28 сут после введения ПАФ регистрировали температуру кожи задних конечностей крыс. Температуру кожи измеряли инфракрасным электронным термометром (модель DT-633, A&D medical, Япония). Кроме того, в эти же дни опыта регистрировали массу тела крыс и рассчитывали изменение массы тела животных относительно фоновых значений.

Болевую чувствительность крыс с экспериментальной моделью воспаления оценивали на 15 сут в подошвенном тесте [6] на приборе “Hargreaves Apparatus” (Ugo Basile, Италия), регистрируя латентный период отдергивания лап (секунды) после подачи инфракрасного теплового воздействия на подошву животных при интенсивности излучения, равной 66, что соответствует повышению температуры воздействия от 45 до 55°C в течение 10 с.

О нарушении функции суставов крыс с моделью воспаления судили, оценивая координату движений животных на 21 день эксперимента в тесте «Вращающегося стержня», Rota Rod (Ugo Basile, Италия). Установка представляет собой барабан 3 см в диаметре, разделенный 6 дисками (25 см в диаметре) на 5 одинаковых частей. Барабан может вращаться в разных скоростных режимах, задаваемых в зависимости от задач исследования и тяжести состояния животных. За 15 мин до тестирования животных адаптировали к условиям методики, осуществляя по 3 последовательных посадки на барабан «Вращающегося стержня» со скоростью 5 об./мин. Тести-

рование моторного навыка осуществляли при режиме вращения барабана со скоростью от 10 до 30 об./мин (ускорение составляло 1 об. за 10 с), регистрируя латентное время первого падения и скорость вращения стержня до первого падения.

На 14 и 28 сут после введения ПАФ у животных брали кровь, ампутировав кончик хвоста. Для предотвращения загрязнения и возможной ошибки при измерении первые капли удалялись из пробы. На гематологическом анализаторе “Abacus Junior VET” (Diatron, Австрия) регистрировали следующие гематологические показатели: абсолютное содержание лейкоцитов (WBC); абсолютное содержание лимфоцитов (LYM); абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов (MID); абсолютное содержание гранулоцитов (GRA); относительное (%) содержание лимфоцитов (LY%); содержание средних клеток на долю лейкоцитов (MI%); относительное (%) содержание гранулоцитов (GR%); абсолютное содержание эритроцитов (RBC); концентрацию гемоглобина в периферической крови (HGB); гематокрит (HCT); средний объем эритроцита (MCV); среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах (MCH); среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC); ширину распределения эритроцитов (RDWc); абсолютное содержание тромбоцитов (PLT); тромбокрит (PCT); средний объем тромбоцитов (MPV); ширину распределения тромбоцитов (PDWc).

Статистическую обработку проводили на языке программирования R версии 3.5.1. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро — Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий по критерию Бартлетта. В случае, когда не во всех группах было нормальное распределение данных и межгрупповая гомогенность дисперсий отсутствовала, для оценки различий между группами

использовали двухвыборочное сравнение с помощью критерия Манна — Уитни и результаты в таблицах представляли медианой (1 квартиль; 3 квартиль). Для оценки различия между группами по признаку «Изменения массы крыс в динамике» использовали двухвыборочное сравнение по t-критерию Стьюдента, результаты в таблице представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (стандартное отклонение). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Из 20 крыс, которым субплантарно в левую заднюю лапу вводили ПАФ, через 7 дней после его введения вторичная иммунологическая реакция, проявляющаяся повреждением правой задней конечности (конечности, контралатеральной той, в которую осуществляли инъекцию), развилась у 11 животных (группа «вторичная иммунологическая реакция»), что составило 55% крыс с моделью воспаления. У этих животных признаки воспаления правой задней лапы проявились значимым увеличением как диаметра стопы в плюсневой области, так и диаметра голеностопного сустава задней конечности на протяжении всего эксперимента. У оставшихся 9 животных с экспериментальной патологией (группа «первичная реакция») развилось выраженное повреждение только левой задней лапы: у них не наблюдалось достоверного увеличения диаметра правой задней лапы по параметру «диаметр стопы в плюсневой области» ни в один из дней регистрации. Однако на 14 день наблюдения у этих крыс была зафиксирована отечность голеностопного сустава правой задней лапы, по степени в 2,2 раза уступающая соответствующему параметру в подгруппе крыс с выраженной вторичной иммунологической реакцией. Отек голеностопного сустава правой задней лапы крыс группы «первичная реакция» уменьшался на про-

тяжении последующих двух недель опыта вплоть до практически полного исчезновения к 28 дню эксперимента (табл. 1).

Увеличение диаметра стопы в плюсневой области и диаметра голеностопного сустава крыс с развившейся вторичной иммунологической реакцией было стабильным на протяжении первых двух недель эксперимента: медиана изменения диаметра стопы правой задней конечности в плюсневой области на 7 день опыта составляла 0,9 мм, на 14 день — 1,1 мм; медиана изменения диаметра правого голеностопного сустава на 7 день эксперимента была равна 1,2 мм, на 14 день — 1,1 мм. На протяжении последующих двух недель отечность правой лапы этих крыс снижалась, достигнув по обоим параметрам регистрации значения медианы, составившего 0,4 мм. При этом в течение всего месячного эксперимента диаметр стопы в плюсневой области и голеностопного сустава правой задней лапы крыс с вторичной иммунологической реакцией был достоверно выше, чем в контрольной группе животных и в группе крыс, у которых развилась преимущественно первичная реакция на введение ПАФ (табл. 1). Кроме того, у животных с наблюдающейся генерализацией патологического процесса (группа «вторичная иммунологическая реакция») на 7 день опыта отмечена и достоверно в 2,4 раза более выраженная отечность левого голеностопного сустава по сравнению с группой крыс с моделью воспаления, у которых была повреждена левая задняя лапа (табл. 1). Во все дни регистрации уровня отека лап увеличение диаметра стопы в плюсневой области и голеностопного сустава левой задней лапы в обеих группах животных с экспериментальной патологией разной степени тяжести было значимым по сравнению с соответствующими показателями в контрольной группе. Однако на 14, 21 и 28 дни опыта достоверных различий между группами «первичная реакция»

и «вторичная иммунологическая реакция» зафиксировано не было (табл. 1).

У животных с изучаемой моделью воспаления наблюдались эритема и повышение температуры кожи стоп задних конечностей. На 7 день после введения ПАФ в обеих группах крыс с экспериментальной патологией температура кожи стоп задних лап была достоверно повышена относительно соответствующих показателей контрольной группы. Так, у животных группы «первичная реакция» температура кожи стопы левой задней конечности была на 14,6% выше, чем в контрольной группе; температура кожи стопы правой задней конечности увеличилась на 5,7%. Температура кожи стоп задних конечностей крыс группы «вторичная иммунологическая реакция» повышалась более значительно, чем в группе «первичная реакция», однако значимых отличий между этими группами зафиксировано не было. Температура кожи стопы левой задней конечности у животных с наблюдающейся генерализацией патологического процесса была выше значений контрольной группы на 19,6%, температура кожи стопы правой задней конечности увеличилась на 11,0% (табл. 2).

На 14 день опыта температура кожи лап животных с моделью воспаления практически не отличалась от соответствующих значений в контрольной группе, за исключением температуры кожи стопы левой задней лапы крыс в группе «вторичная иммунологическая реакция», которая оставалась достоверно повышенной. На 21 и 28 дни опыта температура кожи стоп задних лап крыс с экспериментальной патологией значимо не отличалась от температуры кожи стоп задних лап контрольных животных (табл. 2).

На 15 день у крыс с вторичной иммунологической реакцией болевой порог обеих задних лап был значимо снижен по сравнению с контрольными животными. Так, это снижение для левой лапы составило 25%, для правой лапы — 40% по сравне-

Таблица 1. Отечность задних конечностей крыс в динамике

Table 1. Edema of the hind paws in dynamics

Группа	Изменение диаметра стоп и голеностопных суставов задних конечностей крыс (мм) относительно соответствующих фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда на:			
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
1.1. Изменение диаметра стопы левой задней конечности в плюсневой области				
Контроль, n=15	0,1 (-0,2; 0,2)	0,1 (-0,5; 0,4)	0 (-0,2; 0,3)	0 (-0,2; 0,4)
Первичная реакция, n=9	2,3 (1,8; 3,7)*	3,3 (3,0; 3,5)*	2,5 (2,0; 3,1)*	2,5 (2,0; 3,0)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	2,6 (2,1; 3,0)*	2,5 (2,5; 3,2)*	2 (2,0; 2,8)*	1,9 (1,0; 2,0)*
1.2. Изменение диаметра левого голеностопного сустава				
Контроль	-0,1 (-0,3; 0,4)	-0,2 (-0,3; 0,0)	0,0 (-0,4; 0,3)	0,0 (-0,1; 0,2)
Первичная реакция, n=9	0,5 (0,4; 1,0)*	1,0 (0,5; 1,8)*	0,8 (0,6; 1,3)*	0,4 (0,1; 0,5)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	1,2 (1,1; 1,5)**	1,3 (1,1; 1,6)*	0,9 (0,8; 1,1)*	0,4 (0,2; 0,7)*
1.3. Изменение диаметра стопы правой задней конечности в плюсневой области				
Контроль	0,0 (-0,4; 0,5)	0,1 (-0,2; 0,5)	0 (-0,3; 0,2)	0,0 (-0,2; 0,4)
Первичная реакция, n=9	0,0 (-0,1; 0,5)	0,3 (0,2; 0,5)	0,3 (0,1; 0,4)	0,0 (-0,1; 0,2)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	0,9 (0,7; 1,0)**	1,1 (0,9; 1,3)**	0,8 (0,6; 0,9)**	0,4 (0,2; 0,7)**
1.4. Изменение диаметра правого голеностопного сустава				
Контроль	0,1 (0,0; 0,4)	0 (-0,2; 0,1)	0 (-0,1; 0,05)	0 (-0,2; 0,2)
Первичная реакция, n=9	0,4 (0,0; 0,5)	0,5 (0,5; 0,6)*	0,2 (0,2; 0,4)	0,1 (-0,1; 0,2)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	1,2 (0,9; 1,4)**	1,1 (1,0; 1,4)**	0,9 (0,6; 1,1)**	0,4 (0,4; 0,6)**

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, # — $p < 0,05$ по сравнению с группой «Первичная реакция».

Note: * — $p < 0.05$ compared to the control group, # — $p < 0.05$ compared to the group "Primary reaction".

Таблица 2. Температура кожи задних конечностей крыс в динамике

Table 2. Skin temperature of the hind paws of the rats in dynamics

Группа	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Температура кожи стопы левой задней конечности крыс				
Контроль, n=15	28,10 (26,60; 29,85)	32 (30,65; 33)	29,20 (28,15; 30)	28,70 (27,55; 30,60)
Первичная реакция, n=9	32,20 (29,80; 33,65)*	30,80 (29,65; 32,15)	31,10 (28,95; 31,80)	29,00 (27,85; 30,00)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	33,60 (31,50; 35,80)*	32,60 (32,10; 33,70)*	29,7 (28,3; 32,4)	29,00 (28,30; 31,70)
Температура кожи стопы правой задней конечности крыс				
Контроль, n=15	28,10 (26,70; 29,70)	32,00 (30,35; 33,10)	29,30 (28,25; 29,95)	28,70 (27,55; 30,35)
Первичная реакция, n=9	29,70 (28,80; 33,10)*	31,40 (28,60; 32,30)	30,40 (28,95; 31,60)	28,40 (27,55; 29,85)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	31,2 (30,9; 32,5)*	30,30 (29,50; 31,90)	28,30 (28,00; 29,70)	28,50 (27,70; 29,80)

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: * — $p < 0.05$ compared to the control group.

нию с контрольной группой крыс. Однако и в группе животных, у которых была зарегистрирована отечность преимущественно левой задней лапы, болевая чувствительность обеих задних лап была также достоверно повышена по сравнению с группой крыс без экспериментальной патологии: болевой порог левой лапы крыс этой группы был снижен на 17%, правой — на 36% по сравнению с соответствующими показателями контрольных животных (табл. 3).

В тесте «Вращающегося стержня», оценивающего координацию движения животных, на 21 день после введения ПАФ значимых изменений способности крыс с изучаемой моделью воспаления удерживаться на вращающемся барабане по сравнению с контрольной группой зарегистрировано не было. Однако у животных с экспериментальной патологией отмечено снижение медианы латентного периода падения с установки на 20,1–33,4% и, соответственно, средней скорости вращения барабана установки в момент падения крыс на 20,0–30,0% (недостоверно) (табл. 4). Вероятно, нарушение функции

суставов крыс с изучаемой моделью воспаления, приводящее к снижению их координации движения, можно зафиксировать в более ранние сроки после инъекции ПАФ, что требует дальнейшего исследования.

Развитие патологического процесса в обеих группах крыс с моделью воспаления сопровождалось достоверно сниженным приростом массы тела животных по сравнению с контрольной группой на протяжении всего опыта (табл. 5). Наиболее ярко эта разница проявлялась на 7 сут после инъекции ПАФ. Так, у животных с преимущественным отеком левой задней лапы прирост массы тела был в 2,1 раза ниже, а у крыс с наблюдающейся генерализацией патологического процесса — в 5,2 раза ниже, чем в группе крыс без патологии (табл. 5). При регистрации прироста массы тела на 14, 21 и 28 сут эксперимента разница этого параметра в группах животных с моделью воспаления по сравнению с контрольной группой была не столь драматичной и составляла 30,5–41,6% (табл. 5).

У крыс с изучаемой моделью воспаления резких изменений гематологических по-

Таблица 3. Порог болевой чувствительности крыс в подошвенном тесте

Table 3. The pain threshold of rats in a plantar test

Группа	Латентный период для левой лапы, с	Латентный период для правой лапы, с
Контроль, n=15	13,4 (12,35; 14,97)	14,15 (12,78; 15,12)
Первичная реакция, n=9	11,15 (10,15; 12,53)*	9,1 (7,0; 11,95)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	10,1 (9,2; 11,75)*	9,1 (7,0; 11,95)*

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: * — $p < 0,05$ compared to the control group.

Таблица 4. Координация движения животных на 21 сут эксперимента в тесте «Вращающегося стержня» при режиме скорости вращения барабана 10 до 30 об./мин

Table 4. Coordination of animals in a rotarod test under acceleration of the drum from 10 to 30 rpm on the 21th day of the experiment

Группа	Латентный период первого падения, с	Средняя скорость, об./мин
Контроль, n=15	67,0 (41,0; 84,3)	20,0 (14,0; 21,5)
Первичная реакция, n=9	44,6 (23,0; 80,0)	14,0 (10,0; 21,0)
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	53,0 (34,0; 70,0)	16,0 (12,5; 19,0)

Таблица 5. Изменение массы тела крыс в динамике

Table 5. Change in body weight of rats in dynamics

Группа	Изменение массы тела крыс (г) относительно фоновых значений после введения полного адьюванта Фрейнда на:			
	7 сутки	14 сутки	21 сутки	28 сутки
Контроль, n=15	28,4±1,6 (6,2)	51,5±3,2 (12,3)	71,8±3,7 (14,4)	87,3±4,4 (17,0)
Первичная реакция, n=9	13,8±1,7 (5,2)*	30,1±3,8 (11,3)*	41,2±3,5 (10,5)*	57,7±2,4 (7,3)*
Вторичная иммунологическая реакция, n=11	5,5±1,3 (4,2)*	32,4±2,3 (9,8)*	49,9±3,7 (12,3)*	59,3±3,1 (10,2)*

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: * — $p < 0.05$ compared to the control group.

казателей относительно соответствующих значений контрольной группы зафиксировано не было (табл. 6), что свидетельствует в пользу подобию развивающегося у животных патологического процесса клинической картине РА у людей. Повышение ряда гематологических показателей у крыс с экспериментальной патологией зарегистрировано на 14 сут после введения ПАФ. У животных с преимущественным повреждением левой задней лапы относительно показателей контрольной группы достоверно были повышены: абсолютное содержание гранулоцитов — на 67,6%, абсолютное содержание тромбоцитов — на 20,6% и тромбокрит — на 27,3%. Изменения гематологических показателей у крыс группы «вторичная иммунологическая реакция» были более выраженными и проявлялись увеличени-

ем абсолютного содержания лейкоцитов на 58,5%, абсолютного содержания лимфоцитов — на 59,2%, абсолютного содержания гранулоцитов — на 56,8%, абсолютного содержания тромбоцитов — на 12,4% и тромбокрита — на 9,1% (табл. 6). Однако, несмотря на то, что значения указанных гематологических показателей были достоверно выше соответствующих показателей контрольной группы животных, что можно рассматривать в качестве неспецифической реакции на воспалительный процесс, они не выходили за пределы референсных значений. Известно, что и у пациентов с РА при обострении заболевания регистрируют умеренное увеличение уровня тромбоцитов [10, 16]. На 28 сут в обеих группах животных с изучаемой моделью воспаления наблюдалась нормализация гематологических показателей (табл. 6).

Таблица 6. Гематологические показатели крыс

Table 6. Hematological parameters of the rats

Показатель	Сутки после введения полного адьюванта Фрейнда					
	14			28		
	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция
WBC	12,3 (10,7; 16,4)	17,6 (14,0; 18,6)	19,5 (15,9; 21,4)*	16,9 (14,3; 18,9)	15,7 (12,9; 18,4)	17,3 (16,5; 20,3)
LYM	7,1 (5,7; 9,2)	7,6 (5,7; 10,2)	11,3 (8,1; 14,4)*	11,4 (9,1; 12,3)	10,0 (7,7; 12,3)	12,7 (11,2; 13,3)
MID	1,1 (0,5; 1,6)	1,1 (0,2; 1,5)	1,4 (0,9; 1,7)	1,4 (0,1; 2,1)	1,6 (0,1; 2,1)	1,3 (0,1; 1,7)
GRA	3,7 (3,2; 4,6)	6,2 (4,8; 10,3)*	5,8 (5,1; 6,6)*	4,3 (3,8; 5,2)	4,1 (3,1; 4,9)	4,1 (3,7; 5,5)

Продолжение таблицы 6

Показатель	Сутки после введения полного адьюванта Фрейнда					
	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция	Контроль	Перв. реакция	Втор. иммун. реакция
LY%	62,7 (54,5; 65,4)	49,5 (36,9; 72,7)	57,6 (51,4; 67,2)	66,4 (58,4; 69,3)	68,6 (56,9; 72,4)	65,6 (61,6; 69,5)
MI%	10,5 (3,0; 12,4)	7,4 (0,6; 9,2)	8,9 (6,0; 10,4)	10,2 (0,6; 12,4)	9,8 (0,6; 12,2)	7,3 (0,7; 11,0)
GR%	28,5 (27,3; 36,6)	41,3 (26,7; 49,8)	32,2 (24,8; 38,5)	29,8 (22,7; 32)	27,1 (24,2; 30,4)	25,2 (22,1; 29,7)
RBC	8,0 (7,7; 8,7)	8,3 (7,7; 8,5)	8,7 (8,3; 9,1)	9,1 (8,2; 9,3)	8,8 (8,1; 9,4)	9,4 (8,8; 10,0)
HGB	134,0 (123,0; 140,0)	131,0 (128,0; 133,0)	137,5 (134,8; 139,8)	137,0 (133,0; 141,5)	138,0 (130,0; 144,0)	138,0 (134; 143,5)
HCT	43,0 (41,7; 47,1)	43,4 (42,1; 44,2)	44,3 (43,9; 46,6)	45,5 (40,9; 47,5)	44,3 (43,6; 47,7)	47,4 (46,3; 49,6)
MCV	54,0 (53,0; 55,0)	53,0 (51,0; 55,0)	53,0 (51,5; 55,5)	51 (48,5; 53,0)	51,0 (49,0; 53,0)	51,0 (48,8; 54,0)
MCH	15,9 (15,6; 16,4)	15,8 (15,6; 16,8)	15,85 (15,7; 17,1)	15,2 (14,9; 16,7)	16,0 (15,2; 16,0)	15,6 (15,0; 16,5)
MCHC	297,0 (291,0; 301,5)	301,0 (296,0; 309,0)	301,5 (299,5; 304,0)	307 (296,5; 315,5)	304,0 (301,0; 314,0)	304,0 (302,0; 311,5)
RDWc	16,4 (16,0; 16,7)	17,1 (16,7; 17,4)	15,9 (15,5; 17,0)	15,7 (15,7; 16,8)	16,5 (16,0; 16,9)	16,4 (15,9; 17,1)
PLT	428,0 (389,5; 464,0)	516,0 (507,0; 541,0)*	481,0 (457,8; 552,8)*	434,0 (399; 451)	463,0 (380,0; 477,0)	412,0 (387,5; 441,2)
PCT	0,22 (0,20; 0,25)	0,28 (0,26; 0,29)*	0,24 (0,24; 0,28)*	0,23 (0,20; 0,24)	0,24 (0,19; 0,27)	0,21 (0,20; 0,22)
MPV	5,1 (5,1; 5,2)	5,1 (5,0; 5,2)	5,1 (4,9; 5,2)	5,2 (5,0; 5,3)	5,3 (5,1; 5,4)	5,0 (4,8; 5,3)
PDWc	31,9 (31,0; 32,6)	32,7 (31,4; 33,0)	31,4 (30,3; 31,8)	31,7 (31,4; 32,3)	32,2 (31,7; 32,3)	31,8 (31,2; 32,2)

Примечание: «Перв. реакция» — группа «первичная реакция»; «Втор. иммун. реакция» — группа «вторичная иммунологическая реакция»; WBC — абсолютное содержание лейкоцитов; LYM — абсолютное содержание лимфоцитов; MID — абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов; GRA — абсолютное содержание гранулоцитов; LY% — относительное (%) содержание лимфоцитов; MI% — содержание средних клеток на долю лейкоцитов; GR% — относительное (%) содержание гранулоцитов; RBC — абсолютное содержание эритроцитов; HGB — концентрация гемоглобина в периферической крови; HCT — гематокрит; MCV — средний объем эритроцита; MCH — среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах; MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците; RDWc — ширина распределения эритроцитов; PLT — абсолютное содержание тромбоцитов; PCT — тромбокрит; MPV — средний объем тромбоцитов; PDWc — ширина распределения тромбоцитов; * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Note: “Перв. реакция” — primary reaction group; “Втор. иммун. реакция” — secondary immunological reaction group; WBC — absolute leukocyte count; LYM — absolute lymphocyte count; MID — absolute count of the mixture of monocytes, basophils and eosinophils; GRA — absolute granulocyte count; LY% — relative (%) lymphocyte count; MI% — count of “medium” cells per leukocytes; GR% — relative (%) granulocyte count; RBC — absolute erythrocyte count; HGB — peripheral blood haemoglobin concentration; HCT — hematocrit; MCV — average volume of erythrocytes; MCH — average amount of haemoglobin in an erythrocyte, in absolute units; MCHC — average concentration of haemoglobin in an erythrocyte; RDWc — red blood cell distribution width; PLT — absolute platelet count; PCT — thrombokrit; MPV — mean platelet volume; PDWc — platelet distribution width; * — $p < 0.05$ compared with the control group.

Заключение

Таким образом, в проведенном сравнительном исследовании воспалительного процесса у крыс с первичной реакцией и вторичной иммунологической реакцией на субплантарную инъекцию ПАФ в заднюю лапу животных установлено, что максимальная отечность задних конечностей наблюдается на 14 сут опыта как в группе животных с генерализацией патологического процесса (с отеком левой и правой задних конечностей), так и у крыс с развивающимся повреждением преимущественно задней лапы, в которую вводили ПАФ (с отеком левой задней конечности). При этом отечность голеностопного сустава задней лапы, в которую была сделана инъекция индуктора воспаления, была достоверно более выражена в группе крыс с вторичной иммунологической реакцией по сравнению с группой животных с первичной реакцией на 7 сут после введения ПАФ. На 14 сут после инъекции ПАФ у животных зафиксировано повышение ряда гематологических показателей, более выраженное в группе животных с вторичной иммунологической реакцией. Кроме того, у крыс с изучаемой экспериментальной моделью зарегистрированы такие типичные признаки воспаления, как эритема

и гипертермия области воспаления (на 7 сут в обеих группах). На фоне развившейся патологии в обеих группах крыс с моделью воспаления снижился болевой порог, который регистрировали по латентному периоду отдергивания задних лап в ответ на тепловое воздействие в подошвенном тесте на 15 сут опыта. На протяжении всего эксперимента прирост массы тела крыс с воспалительным процессом был достоверно ниже, чем у животных без патологии. К 28 сут опыта отечность лап животных с изучаемой экспериментальной моделью как в группе крыс с генерализацией патологического процесса, так и у крыс с развивающимся повреждением преимущественно задней лапы, в которую вводили ПАФ, значительно снижалась по сравнению с 14 сут, температура кожи задних конечностей и гематологические показатели не отличались от соответствующих параметров в группе контрольных животных. Выявленные особенности развития воспалительного процесса, вызванного субплантарной инъекцией ПАФ в заднюю лапу крыс, могут иметь существенное значение при планировании опытов по оценке фармакологической активности соединений на данной модели и интерпретации результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Балабанова Р.М., Дубинина Т.В., Эрдес Ш.Ф. Динамика заболеваемости ревматическими заболеваниями взрослого населения России за 2010–2014 гг. *Научно-практическая ревматология*. 2016;3(54):266–270. [Balabanova R.M., Dubinina T.V., Ehrdes Sh.F. Dinamika zabolevaemosti revmaticheskimi zabolevaniyami vzroslogo naseleeniya Rossii za 2010–2014 gg. [The dynamics of the incidence of rheumatic diseases in the adult population of Russia in 2010–2014]. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* [Scientific and practical rheumatology]. 2016;3(54):266–270. (In Russian)].
2. Веснина Л.Э., Мамонтова Т.В., Микитюк М.В., Боброва Н.А., Куценко Л.А., Ярошенко Г.А., Кайдашев И.П. Фуллерен C 60 обладает иммуномодулирующей активностью при адьювантном артрите у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012;75(8):15–20. [Vesnina L.E., Mamontova T.V., Mikityuk M.V., Bobrova N.A., Kucenko L.A., Yaroshenko G.A., Kajdashev I.P. Fulleren C 60 obladat immunomoduliruyushchey aktivnostyu pri adyuvantnom artrite u kryis [Fullerene C 60 has immunomodulatory activity in adjuvant arthritis in rats]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2012;75(8):15–20. (In Russian)].
3. Заболеваемость всего населения России в 2017 году. *Статистические данные Министерства здравоохранения РФ*. М., 2018. [Zabolevaemost vsego naseleniya Rossii v 2017 godu. *Statisticheskie dannye Ministerstva zdavooohraneniya RF* [The incidence of the entire population of Russia in 2017. *Statistics from the Ministry of Health of Russian Federation*]. Moscow, 2018. (In Russian)].
4. Клинические рекомендации. Ревматоидный артрит. Министерство здравоохранения РФ. М., 2018. [Klinicheskie rekomendatsii. Revmatoidniy artrit. [Clinical guidelines. Rheumatoid arthritis]. *Ministerstvo zdavooohraneniya RF* [Ministry of Health of the Russian Federation]. Moscow, 2018. (In Russian)].
5. Коваленко Л.П., Мирamedова М.Г., Алексеева С.В., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Серединин С.Б. Противовоспалительные свойства ноопепта (дипептидного ноотропа ГВС-111). *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(2):53–55. [Kovalenko L.P., Miramedova M.G., Alekseeva S.V., Gudashева T.A., Ostrovskaya R.U., Seredinin S.B. Protivovospalitelnye svoystva noopepta (diptidnogo nootropo GVS-111) [Anti-inflammatory properties of noopept (dipeptide nootropic drug GVS-111)]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2002;65(2):53–55. (In Russian)].
6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I* / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ch. I* / Guide to conducting pre-clinical studies of drugs. Pt I]. Ed. by A.N. Mironov. Moscow: Grif i K Publ., 2012. 944 p. (In Russian)].
7. Ульянина Л.Р., Залыютдинова Л.Н., Гайнетдинова А.Н. Сравнительная оценка эффективности экспериментальной терапии адьювантного артрита у крыс новым аминокислотным комплексом лития и метотрексатом. *Современные проблемы науки и образования*. 2015;(4):469. [Ulyanina L.R., Zalyalyutdinova L.N., Gainetdinova A.N. Sravnitel'naya otsenka effektivnosti eksperimental'noy terapii adyuvantnogo artrita u kryis novym aminokislotnym kompleksom litiya i metotreksatom [Comparative evaluation of the effectiveness of experimental therapy for adjuvant arthritis in rats with a new amino acid complex of lithium and methotrexate]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya* [Actual problems of science and education]. 2015;(4):469. (In Russian)].
8. Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Мужикян А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Сравнительный анализ двух экспериментальных моделей хронического артрита у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016;79(10):22–28. [Shekunova E.V., Kashkin V.A., Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Sravnitel'nyy analiz dvuh eksperimentalnykh modeley khronicheskogo artrita u kryis [Comparative analysis of two experimental models of chronic arthritis in rats]. *Experimental and clinical pharmacology*. 2016;79(10):22–28. (In Russian)].
9. Jiang J., Wu F., Lu J., Lu F., Xu Q. Anti-inflammatory activity of the aqueous extract from *Rhizoma smilacis glabrae*. *Pharmacological Research*. 1997;36(4):309–314.
10. Kacena M.A., Horowitz M.C. The role of megakaryocytes in skeletal homeostasis and rheumatoid arthritis. *Cur. Opin. Rheumatol.* 2006;18(4):405–410.
11. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Br. J. of Pharmacology and Chemotherapy*. 1963;21:127–136.
12. Pearson C.M. Experimental joint disease observations on adjuvant-induced arthritis. *J. of Chronic Diseases*. 1963;16:863–874.
13. Patel H., Dawson B., Humby F., Blades M., Pitzalis C., Burnet M., Seed M. Animal Models of Rheumatoid Arthritis. In: Serhan C., Ward P., Gilroy D. (eds) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. Pp. 385–412.
14. Stein C., Millan M.J., Herz A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 1988;31(2):445–451.
15. Zahiri H., Gagnon J., Ayotte R., Laurin C.A. Adjuvant experimental polyarthritis. *Canadian Medical Association J.* 1969;101(5):269–278.
16. <https://medi.ru/info/1912>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Матюшкин Александр Иванович*, ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт фармако-
логии им. В.В. Закусова»;
e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

Alexander I. Matyushkin*, Research Zakusov
Institute of Pharmacology;
e-mail: matyushkin.alex@gmail.com

Иванова Елена Анатольевна, к.фарм.н.,
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии им. В.В. Закусова»;
e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Elena A. Ivanova, Cand. Sci. (Pharm.), Research
Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Алексеева Светлана Витальевна, ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт фармако-
логии им. В.В. Закусова»;
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

Svetlana V. Alekseeva, Research Zakusov Institute
of Pharmacology;
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

Кирилл Сергеевич Качалов, ФГБНУ «Науч-
но-исследовательский институт фармакологии
им. В.В. Закусова»;
e-mail: kkachalov@mail.ru

Kirill S. Kachalov, Research Zakusov Institute of
Pharmacology;
e-mail: kkachalov@mail.ru

Воронина Татьяна Александровна, д.м.н.,
проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт фармакологии им. В.В. Закусова»;
e-mail: voroninata38@gmail.com

Tatyana A. Voronina, Dr. Sci. (Med.), Prof., Re-
search Zakusov Institute of Pharmacology;
e-mail: voroninata38@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author