

УДК 615.076.9

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ АДЬЮВАНТНОГО АРТРИТА У КРЫС НОВЫМ АМИНОКИСЛОТНЫМ КОМПЛЕКСОМ ЛИТИЯ И МЕТОТРЕКСАТОМ

Ульянина Л.Р.¹, Залялютдинова Л.Н.¹, Гайнетдинова А.Н.¹

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации», Казань, Россия (420012, Казань, ул. Бутлерова, д. 49), e-mail: ga-le-ra@mail.ru

В статье приведены результаты оценки эффективности длительной терапии адьювантного артрита у крыс новым аминокислотным комплексом лития в дозе 100 мг/кг ежедневно интраперитонеально в течение 1 месяца в сравнении с метотрексатом в дозе 1 мг/кг интраперитонеально 1 раз в неделю в течение 3 месяцев. Критериями эффективности экспериментальной терапии служили: степень подавления отека лап в динамике, уменьшение патологических изменений задних лап, оцененных с помощью компьютерной рентгеновской томографии, коррекция показателей периферической крови, влияние на прирост массы тела животных и предупреждение летальности в течение эксперимента. Показано, что изучаемый аминокислотный литиевый комплекс через 2 недели от начала лечения, проявляя более раннее и сопоставимое с метотрексатом антиревматоидное действие, подавлял выраженность отека, предупреждал развитие вторичных изменений в суставах у крыс, корригировал показатели периферической крови и увеличивал выживаемость животных.

Ключевые слова: адьювантный артрит у крыс, аминокислотный комплекс лития, метотрексат.

COMPARATIVE ESTIMATION OF EFFICIENCY OF EXPERIMENTAL THERAPY OF ADJUVANT ARTHRITIS IN RATS BY A NEW AMINO ACID LITHIUM COMPLEX AND METHOTREXATE

Ulianina L.R.¹, Zalyalyutdinova L.N.¹, Gainetdinova A.N.¹

¹"Kazan State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation", Kazan, Russia (420012, Kazan, Butlerova Str., 49), e-mail: ga-le-ra@mail.ru

The article presents the results of an assessment of efficiency of long-term therapy of adjuvant arthritis in rats by aminoacid lithium complex, given in a dose of 100 mg/kg daily intraperitoneally within 1 month, in comparison with methotrexate in a dose of 1 mg/kg intraperitoneally once a week within 3 months. The criteria of efficiency of experimental therapy: degree of suppression of edema of paws in dynamics, reduction of pathological changes of the hinder legs, estimated by means of a computer x-ray tomography, correction of indicators of peripheral blood, influence on a gain of body weight of animals and the prevention of lethality during the experiment. It is shown that the studied amino-acid lithium complex in 2 weeks from an initiation of treatment, having earlier and comparable anti-rheumatoid action with methotrexate, suppressed expressiveness of edema, prevented development of secondary changes in joints of rats, corrected the changes in the peripheral blood indicators and increased survival of animals.

Keywords: adjuvant arthritis in rats, methotrexate, aminoacid lithium complex.

Распространенность заболеваний суставов у людей неуклонно растет. Среди артритов особое положение занимают ревматические процессы, в основе патогенеза которых лежит аутоиммунное воспаление соединительной ткани оболочки суставов, которое приводит к стойкой деформации суставов, нарушению их функции, и, как правило, трудно поддается лечению. Для ревматоидного артрита характерны хроническое персистирующее течение, наличие системных проявлений, ранняя инвалидизация больных и высокий процент летальности [2,4,6]. Стандартная базисная терапия ревматических заболеваний суставов направлена на подавление активности иммунного воспалительного процесса в синовиальной ткани сустава, замедление развития заболевания, профилактику системных проявлений.

Средства базисной терапии представлены такими фармакологическими группами как цитостатики, иммунодепрессанты, глюкокортикоиды, имеющими ряд серьезных побочных эффектов [9]. Поэтому поиск альтернативных малотоксичных лекарственных средств для лечения ревматических артритов представляется актуальным.

Для оценки противовоспалительного действия потенциальных противовоспалительных средств широко используется экспериментальная модель адьювантного артрита (АА), которая характеризуется развитием вторичного воспаления в суставах и окружающих мягких тканях с преобладанием пролиферативного компонента [10]. Ранее на данной модели нами впервые выявлена противовоспалительная активность нового малотоксичного аминокислотного комплекса лития, синтезированного под руководством заведующего научно-исследовательской лабораторией координационных соединений КФУ, кандидата химических наук В.Г. Штырлина, сопоставимая с эффективностью диклофенака натрия и метионина [1,8]. Это явилось предпосылкой для дальнейшего углубленного изучения его эффективности в сравнении с препаратом базисной терапии ревматоидного артрита метотрексатом.

Цель исследования

Целью настоящего исследования стала оценка эффективности аминокислотного комплекса лития в сравнении с метотрексатом при терапии адьювантного артрита у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 32 крысах линии Wistar обоего пола массой 180 ± 20 грамм, содержащихся в стандартных условиях лаборатории. Исследования были одобрены локальным этическим комитетом Казанского ГМУ. Животных разделили на группы по 8 в каждой – интактную, контрольную и 2 опытные. Крысам в группах контроля и в опытных моделировали хроническое воспаление субплантарным введением в заднюю лапку 0.1 мл полного адьюванта Фрейнда (Sigma) [5]. Животным первой опытной группы с 15 по 45 день эксперимента с лечебной целью внутрибрюшинно вводили комплекс лития с метионином (LiMet) в эффективной дозе 100 мг/кг ежедневно, а второй опытной группы - метотрексат в дозе 1 мг/кг 1 раз в неделю в течение 3 месяцев. Контрольным животным внутрибрюшинно инъецировали воду для инъекций в эквиво объеме. Степень выраженности отека относительно интактной лапки определяли в динамике, измеряя объем лап плетизмометром «Ub Ugo Basile 37140». Противовоспалительное действие исследуемых веществ оценивали по степени подавления отека относительно показателей контрольной группы. В ходе эксперимента наблюдали за общим состоянием, изменением массы тела и выживаемостью животных, на 10 и 18 неделе опыта делали компьютерную рентгеновскую томографию суставов аппаратом КРТ «ОКО». Снимки консультировал врач-рентгенолог, заведующий отделением РКБ

Нагорных Б.П. Также, в конце эксперимента забирали кровь для общего и биохимического анализа, определяли количество лейкоцитов, эритроцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, СОЭ, подсчитывали лейкоформулу и цветовой показатель. В сыворотке крови определяли уровень холестерина, общего белка, билирубина, активность трансаминаз печени, щелочной фосфатазы и ревматоидный фактор. Анализы крови проводили на гематологическом анализаторе «Medonic» и биохимическом анализаторе «БиАн».

Результаты обрабатывали статистически с использованием программ Microsoft Office Excel, применяя t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна-Уитни, хи-квадрат Пирсона. Критерием достоверности различий служило значение $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На 2-й день после инъекции полного адьюванта Фрейнда возникала региональная воспалительная реакция в лапке, которая нарастала к 3-му дню и проявлялась в виде покраснения, болезненности при пальпации и отека. Прирост объема лапки крыс в контрольной группе относительно интактной составил в среднем $1,05 \pm 0,04$ мл и был принят за 100%. Изучаемые препараты вводили с 15 дня от начала эксперимента, ориентируясь на вторичное усиление отека в суставах до $1,2 \pm 0,02$ мл. К 4 неделе эксперимента у контрольных животных с моделированным адьювантным артритом наблюдали генерализацию процесса с формированием вторичных изменений в виде усиления и распространения отека на вышележащие суставы, появления пальпируемых подкожных узелков на хвосте. С 5-6 недели у животных в группах с АА наблюдали различающиеся по степени выраженности региональные вторичные изменения в виде деформации и ограничения движения в мелких суставах стоп, голеностопных, коленных и тазобедренных суставах с сохранением отека лапок в контроле, зафиксированном плетизмометрически (Рисунок 1).

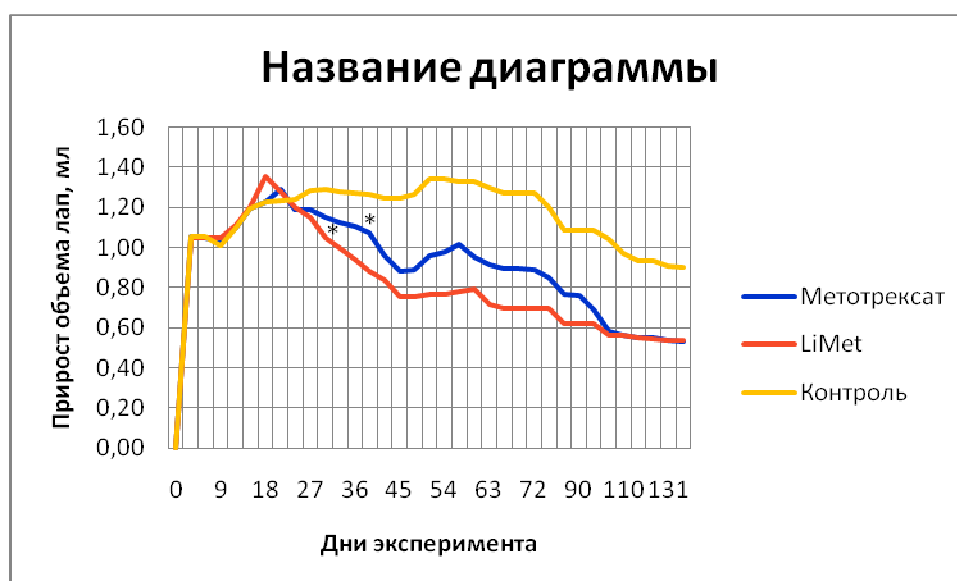


Рис.1. Динамика прироста объема лап контрольных и опытных крыс с адьювантным артритом; * – далее различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

В разные сроки от начала лечения метотрексат и LiMet подавляли воспалительный отек в лапах крыс. (Рисунок 2).

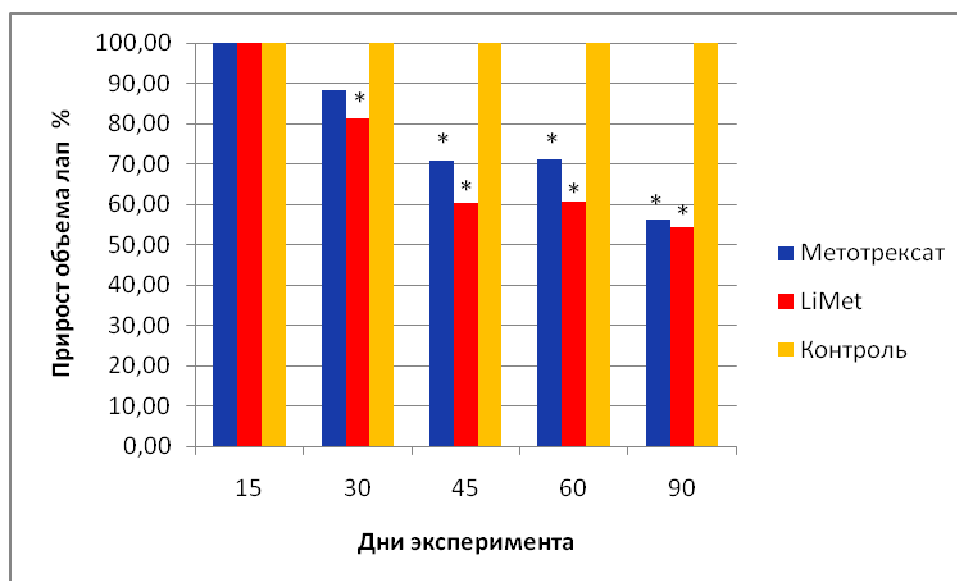


Рис. 2. Степень подавления отека лап крыс с адьювантным артритом, леченых LiMet и метотрексатом, в процентном отношении к контролю, взятому за 100%; * - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$).

Развитие достоверного противовоспалительного эффекта при терапии метотрексатом наблюдалось через 3 недели терапии (39 день опыта), когда метотрексат подавлял отек на 19,14%. Лечебный эффект LiMet проявился через 2 недели терапии (30 день опыта), когда подавление отека составило 18,76% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Противовоспалительная активность LiMet в конце 4 недели терапии (45 день опыта) составила 39,53%, а метотрексата 29,29%. После завершения 3 месячного курса терапии метотрексатом (103 день опыта) выраженность воспалительного отека у животных в данной группе уменьшилась на 43,85% по сравнению с контролем. Аминокислотный комплекс лития на этом сроке оказывал аналогичное действие, достоверно подавляя отек на 45,60%.

Проведенная компьютерная рентгеновская томография выявила у контрольных животных с АА подвывихи проксимальных фаланговых суставов, выраженную изъеденность по суставной поверхности коленных и голеностопных суставов, сужение суставных щелей пястнофаланговых суставов, крупные эрозии в дистальных отделах бедренной кости, отек мягких тканей до уровня тазобедренного сустава по сравнению с интактными животными (рисунок 3А, Б).



Рис.3. КРТ суставов задней лапы у крыс: А) интактная; Б) контрольная (АА без терапии); В) опытная (терапия АА метотрексатом); Г) опытная (терапия АА LiMet)

Изменения на рентгеновских снимках указывают на патологический процесс в костях и суставах лап у животных с АА, характерный для ревматических поражений суставов кистей и стоп у человека [7]. В группе животных, леченых метотрексатом и аминокислотным комплексом лития, отсутствовали сужение суставных щелей и подвывихи суставов, однако имелись единичные кистовидные просветления костей и эрозии суставных поверхностей. Отек мягких тканей распространялся в группе метотрексата и LiMet до коленного сустава (Рисунок 3 В, Г).

В ходе эксперимента у контрольных животных изменения в суставах сопровождалась некротизацией кожи больных лапок с выделением серозно-геморрагической жидкости, снижением прироста массы тела на 63% к концу опыта и гибелью животных. У крыс, получавших терапию метотрексатом, не наблюдались некрозы на коже лапок, однако отмечалось поредение шерстяного покрова со 2 недели терапии, с восстановлением через 1 месяц после отмены препарата. Животные, получавшие лечение аминокислотным комплексом лития, не имели некрозов кожи больных лапок, по состоянию шерстяного покрова и прибавки веса они не отличались от интактных животных, что указывает на отсутствие общетоксического действия LiMet (Рисунок 4).

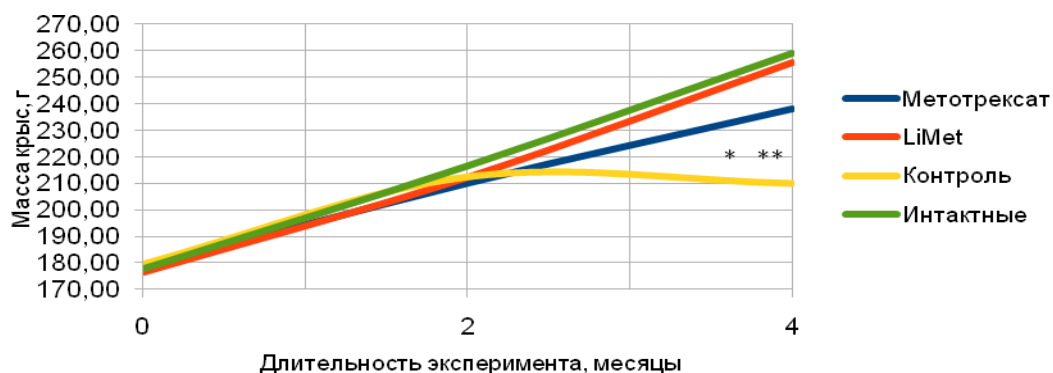


Рис.4. Динамика изменения массы тела крыс в группах.

$P < 0,05$ * - к интактным животным, ** - к LiMet

При анализе показателей крови контрольных животных выявлено достоверное увеличение СОЭ, общего числа лейкоцитов и процентного содержания эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, уменьшение относительного содержания лимфоцитов и моноцитов, снижение гемоглобина, гематокрита по сравнению показателями крыс интактной группы. Результаты указывают на сохраняющиеся воспалительные изменения в крови у крыс контрольной группы через 18 недель после моделирования АА, а также на типичное для длительно протекающего РА системное проявление заболевания в виде анемии [2,4,6,9]. Метотрексат корригировал анемию, лейкоцитоз, эозинофилию и лимфоцитопению, повышение СОЭ, сопровождающие течение АА, однако, полностью не устранял моноцитопению и палочкоядерный нейтрофилез. Все показатели периферической крови крыс, после терапии литиевым комплексом метионина, в конце эксперимента статистически не отличались от показателей интактной группы (Таблица 1).

Таблица 1

Состояние периферической крови крыс в конце эксперимента

Показатель крови	Интактные	АА контроль	Метотрексат	LiMet
		вода стерильная в/б 1 месяц	1 мг/кг в/б 1 раз в неделю 3 месяца	100 мг/кг 1 раз в день 1 месяц
Эритроциты $\times 10^{12}/л$	7,08 \pm 0,51	6,67 \pm 0,24	7,36 \pm 0,25**	7,53 \pm 0,46**
Гемоглобин г/л	141,83 \pm 6,08	122,50 \pm 4,50*	137,25 \pm 4,57**	146,67 \pm 5,65**/**
Цветовой показатель	0,60 \pm 0,03	0,55 \pm 0,26	0,56 \pm 0,24	0,58 \pm 0,02
Гематокрит %	42,90 \pm 1,95	37,30 \pm 1,20*	39,93 \pm 1,24*/**	42,00 \pm 1,30**/**

Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	6,98 \pm 1,60	13,25 \pm 1,55 *	6,76 \pm 2,32 **	6,18 \pm 1,70**
Эозинофилы %	2,50 \pm 1,52	5,00 \pm 0,00 *	3,50 \pm 1,29	3,17 \pm 1,60**
Палочко- ядерные нейтрофилы %	1,33 \pm 0,52	9,00 \pm 1,00*	6,25 \pm 3,10*	2,00 \pm 0,89 **
Сегменто- ядерные нейтрофилы %	20,50 \pm 2,88	45,67 \pm 5,03*	21,00 \pm 4,16 **	17,50 \pm 3,27 **
Лимфоциты %	59,83 \pm 4,71	36,67 \pm 6,51 *	60,50 \pm 5,51 **	65,67 \pm 7,71**
Моноциты %	15,83 \pm 1,17	3,67 \pm 0,58 *	8,75 \pm 1,50*/**	11,67 \pm 3,27*/**
СОЭ (мм/ч)	1,00 \pm 0,00	10,00 \pm 0,00*	3,00 \pm 0,82 **	1,33 \pm 0,52 **

*- $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой/ **с контролем/** **с метотрексатом

Биохимический анализ крови показал наличие ревматоидного фактора в крови крыс контрольной группы, а в группах интактных и леченых животных его отсутствие. В конце эксперимента показатели общего белка, холестерина, билирубина, активности трансаминаз печени во всех опытных группах были в пределах физиологических норм. В группе нелеченых животных наблюдалось достоверное снижение уровня щелочной фосфатазы до $46,33 \pm 2,84$ Ед/л по сравнению с показателями интактных животных ($84,17 \pm 16,68$ Ед/л), что можно расценивать как признак анемии или истощения организма [3].

Развитие АА во всех группах сопровождалось гибелью животных. Основная масса животных погибла с 54 по 63 день в период обострения заболевания. К 90 дню опыта в контроле погибло 50% животных, в группе метотрексата — 37,5%, а в группе крыс, получавших терапию литиевым комплексом метионина, — 12,5%. В конце эксперимента гибель животных в контрольной группе составила 67,5% относительно интактной группы, в опытной группе, получавшей препарат сравнения метотрексат – 37,5%, а литиевый комплекс метионина – 12,5% (Таблица 2).

Таблица 2

Выживаемость животных в группах на разных сроках эксперимента

Дни опыта	Интактные крысы		Крысы с моделированным адьювантным артритом					
			Контроль (нелеченные) стерильная вода в/б		Метотрексат 1мг/кг в/б 1 раз в 7 дней 3 месяца		LiMet 100мг/кг в/б 1 раз в день 1 месяц	
	Погибл о/вы- жило	Выжива емость %	Погибло /вы- жило	Выживае мость%	Погибл о/вы- жило	Выживае мость%	Погибл о/вы- жило	Выживае мость %
1	0/8	100	0/8	100	0/8	100	0/8	100
45	0/8	100	1/7	87,5	1/7	87,5	0/8	100
90	0/8	100	4/4	50*	3/5	62,5	1/7	87,5
135	0/8	100	5/3	37,5*	3/5	62,5	1/7	87,5**

* $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой/ **с контролем/***с метотрексатом

Заключение

Таким образом, изучаемый новый комплекс лития с метионином в дозе 100 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно в течение 30 дней на модели адьювантного артрита у крыс проявляет противовоспалительную активность, сопоставимую с таковой метотрексата. Достоверный противовоспалительный эффект у аминокислотного комплекса лития проявляется раньше, чем у препарата сравнения. Его курсовое применение у крыс с АА предупреждает развитие вторичных изменений, характерных для вторичного аутоиммунного воспалительного процесса, снижает агрессивность его течения и защищает животных от гибели.

Список литературы

1. Залялютдинова Л.Н. Фармако-токсикологические свойства новых комплексов и композиций эссенциальных микроэлементов меди, кобальта, марганца, ванадия и лития с аминокислотами и олигопептидами: диссертация доктора мед. наук. – Казань. 2001. – 376 с.
2. Лиля А.М. Социально-экономические аспекты лечения ревматических болезней / А. М. Лиля. // Рус. Мед. Журн. – 2006. – №5. – С. 1033-1039.
3. Лифшиц В.М. Медицинские лабораторные анализы: справочник / В. М. Лифшиц, В.И. Сидельникова. – М.: Триада-Х, 2011 – 304 с.
4. Мазуров В.И. Клиническая ревматология: руководство для врачей. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: ООО "Издательство ФОЛИАНТ", 2005. — 520 с.

5. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев с соавт. — Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — С. 751.
6. Насонов Е.Л. Ревматология: национальное руководство / Е.Л. Насонов, В.А. Насонова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — Гл.12. — С. 290-331.
7. Смирнов А.В. Дифференциальная рентгенологическая диагностика поражений суставов кисти при ревматических заболеваниях // Consilium Medicum. - 2005. — Т. 7, №2. — С. 75-82
8. Ульянина Л.Р. Влияние нового аминокислотного комплекса лития на течение хронического иммунного воспаления у крыс / Ульянина Л.Р., Залялютдинова Л.Н., Штырлин В.Г.// Материалы XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство» 6-10 апреля, 2015. — Москва, 2015. — С. 272.
9. Шулутко Б.И. Стандарты диагностики и лечения внутренних болезней / Б.И. Шулутко, С.В. Макаренко. — СПб.: ООО «Медкнига ЭЛБИ-СПб», 2009. — С. 478-489.
10. Yudoh K. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the development of arthritis in the rat model of arthritis/ K. Yudoh et al. // Int. J. Nanomedicine. — 2009. — No.4. - P. 217-225.

Рецензенты:

Бойчук С.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ», г. Казань;

Семина И.И., д.м.н., профессор, заведующий ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ», г. Казань.