Сведения об авторах:

Сирак Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии;
тел.: (8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru; http://orcid.org/0000-0002-4924-5792

Диденко Мария Олеговна, аспирант, младший научный сотрудник;
тел.: (8652)352628; e-mail: azrch_1991@rambler.ru

Сирак Алла Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии;
тел.: (8652)355592; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Щетинина Елизавета Евгеньевна, студентка; тел.: (8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru

Сирак Екатерина Сергеевна, студентка; тел.: (8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Погожева Алина Владимировна, студентка; тел.: (8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru

Петросян Григорий Григорьевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии;
тел.: (8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru

Ленев Вадим Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии;
тел.: (8652)350551; e-mail: lenevstom@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2020
УДК 616-002.2:571.27
DOI – https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15087
ISSN – 2073-8137

ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС С АДЪЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННЫМ АРТРИТОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ КОРРЕКЦИИ

З. З. Темирова, Т. П. Макалиш, В. В. Оберемок, Е. Ю. Зяблицкая, О. А. Сердюкова, И. А. Новиков, Е. В. Лайкова, Л. Р. Шаймарданова

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Российская Федерация

PERIPHERAL BLOOD INDICATORS OF RATS WITH ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN VARIOUS CORRECTION SCHEMES

Temirova Z. Z., Makalish T. P., Oberemok V. V., Zyablitskaya E. Yu., Serdyukova O. A., Novikov I. A., Laikova E. V., Shaymardanova L. R.

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

Изучены изменения лейкоцитарных индексов крыс с адъювант-индуцированным ревматоидным артритом при лечении в течение трех недель препаратами базисной терапии и инновационными экспериментальными средствами. Не выявили отличий между эффектами от лечения базисными препаратами и экспериментальными препаратами на основе антисмысловых олигонуклеотидов, что свидетельствует об их схожей эффективности.

Ключевые слова: гематологические показатели, ревматоидный артрит, антисмысловые олигонуклеотиды, фактор некроза опухоли

Changes in leukocyte indices of rats with adjuvant-induced rheumatoid arthritis were studied after three weeks of treatment with basic therapy drugs and innovative experimental means. No differences were found between the effects of treatment with basic drugs and experimental drugs based on antisense oligonucleotides, which indicates their similar effectiveness.

Keywords: blood counts, rheumatoid arthritis, antisense oligonucleotides, tumor necrosis factor

Для цитирования: Темирова З. З., Макалиш Т. П., Оберемок В. В., Зяблицкая Е. Ю., Сердюкова О. А., Новиков И. А., Лайкова Е. В., Шаймарданова Л. Р. ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС С АДЪЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННЫМ АРТРИТОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМАХ КОРРЕКЦИИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):369-372. DOI – https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15087

For citation: Temirova Z. Z., Makalish T. P., Oberemok V. V., Zyablitskaya E. Yu., Serdyukova O. A., Novikov I. A., Laikova E. V., Shaymardanova L. R. PERIPHERAL BLOOD INDICATORS OF RATS WITH ADJUVANT-INDUCED ARTHRITIS IN VARIOUS CORRECTION SCHEMES. *Medical News of North Caucasus.* 2020;15(3):369-372.
DOI – https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15087 (In Russ.)

АСОН – антисмысловые олигонуклеотиды
ИСЛК – индекс сдвига лейкоцитов крови
ЛИ – лимфоцитарный индекс
ЛИИ – лейкоцитарный индекс интоксикации
ЯИИ – ядерный индекс интоксикации
TNF-α – фактор некроза опухоли альфа

Показатели периферической крови остаются удобным диагностическим признаком, отражающим текущее состояние иммунной системы организма [1, 2]. При аутоиммунных процессах показательны не только изменения количества различных классов иммунокомпетентных клеток, но и их соотношения, высчитываемые по целому ряду индексов иммунологической реактивности, расширяя не только диагностические, но и прогностические возможности клиницистов [3, 4]. В частности, широко используются: лейкоцитарный индекс интоксикации, отражающий соотношение между нейтрофилами и остальными лейкоцитами; ядерный индекс интоксикации, вычисляемый как отношение незрелых форм гранулоцитов к зрелым и показывающий истощение гранулоцитопоэза; лимфоцитарный индекс, отражающий соотношение лимфоцитов к числу сегментоядерных нейтрофилов; индекс сдвига лейкоцитов крови, показывающий соотношение гранулоцитов к агранулоцитам.

Углубление знаний о механизмах развития, течения и исходов аутоиммунных процессов, влючая ревматоидный артрит, позволяет внедрять новые, патогенетически обоснованные в экспериментальной и клинической практике методы коррекции [5, 6], которые требуют объективизации оценки их эффективности и безопасности.

Цель работы – изучение лейкоцитарной формулы и лейкоцитарных индексов периферической крови крыс с моделированным ревматоидным артритом и различными схемами лечения.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 42 крысах линии Вистар обоих полов в возрасте 6–7 недель. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с директивой Европейского союза по защите животных, используемых в научных целях (2016). Ревматоидный артрит моделировали путем введения полного адъюванта Фрейнда субплантарно в левую заднюю лапу на протяжении трех недель три раза в неделю в объеме 0,04 мл. После созревания модели приступали к лечению по нескольким схемам: 1) преднизолон внутримышечно в дозе 0,02 мл ежедневно в течение 2 недель; 2) Хумира в дозировке 0,04 мл один раз в неделю субплантарно; 3) АСОН ORN2 (блокирует синтез белка в клетках) в дозировке 0,05 мл дважды в неделю в течение 21 дня; 4) АСОН Cyto1 (блокирует синтез TNF-α) по той же схеме; 5) комбинация из двух АСОН по аналогичной схеме. Отдельную группу составили животные, которым лечение не проводилось (контроль), а также интактные животные. Перед началом лечения, а также каждые 7 дней в течение эксперимента у животных под эфирным наркозом брали кровь из подъязычного сплетения и изготавливали мазки, которые после высушивания окрашивали стандартным протоколом по Романовскому – Гимзе. На полученных мазках подсчитывали количество лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов на 100 клеток.

Индексы высчитывали по следующим формулам:

– лейкоцитарный индекс интоксикации (по Я. Я. Кальф-Калифа):

$$ЛИИ=2П+С/(М+Л)*(Э+1);$$

– ядерный индекс интоксикации (по Г. А. Даштаянцу):

$$ЯИИ=(М+П)/С;$$

– лимфоцитарный индекс:

$$ЛИ=Л/С;$$

– индекс сдвига лейкоцитов крови (по Яблучанскому):

$$ИСЛК=(Э+Н)/(М+Л),$$

где П – палочкоядерные нейтрофилы; С – сегментоядерные нейтрофилы; Н – общее число всех форм нейтрофилов; М – моноциты; Л – лейкоциты; Э – эозинофилы.

Полученные числовые значения подвергались статистической обработке с помощью ПО Statistica 10. Использовали методы описательной статистики (определение нормальности распределения признака методом Шапиро – Уилка, вычисление среднего арифметического, медианы), отличия между группами вычисляли методом Краскела – Уоллиса для несвязанных выборок. Достоверными считали отличия при вероятности ошибки $p<0,05$. Методом ANOVA определяли степень влияния фактора (метода и/или продолжительности лечения) на показатели периферической крови.

Результаты и обсуждение. Среди всех форменных элементов наибольшему влиянию формы лечения и его продолжительности подвергались значения количества сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов.

На момент начала лечения лейкоцитарная формула показывала картину хронического воспаления. Снижение лимфоцитов и увеличение сегментоядерных нейтрофилов отразилось на изменении всех исчисляемых нами индексов, кроме ЯИИ. Рост ЛИИ является клиническим показателем хронического воспаления, равно как и снижение ЛИ. Снижение числа агранулоцитов произошло за счет уменьшения лимфоцитов и привело к росту ИСЛК (рис.).

На 7-е сутки лечения изменения количества лимфоцитов и нейтрофилов зависели от применяемого препарата. Достоверно значимое увеличение нейтрофилов (на 90 %) и уменьшение лимфоцитов (на 34 %) наблюдали в группе без лечения. В остальных группах противовоспалительные препараты компенсировали эти изменения. Показатели лейкоцитарных индексов подтвердили нарастающее воспаление в группе без лечения и компенсацию воспаления в группах с лечением. Среди всех применяемых препаратов преднизолон оказался отличным по способу компенсации. Если в группах с генетическими препаратами (Хумира, АСОН Cyto1, АСОН ORN2) индексы показывали легкую степень эндогенной интоксикации, отражающую сдерживание воспалительных процессов, то в группе с преднизолоном механизм действия направлен на синтез молодых форм нейтрофилов, что нашло свое отражение в росте ЛИ ($p<0,05$) и ЯИИ (рис. C, D).

На 14-е сутки лечения динамика изменений оказалась таковой, что достоверные отличия между группами практически отсутствовали. Тем не менее сохранялись тенденции к уменьшению ЛИИ и увеличению ЛИ в группах с лечением и обратные тенденции в группе без лечения. По многим параметрам наблюдалась большая внутригрупповая дисперсия показателей, однако анализ ANOVA показал отсутствие достоверных изменений в периферической крови.

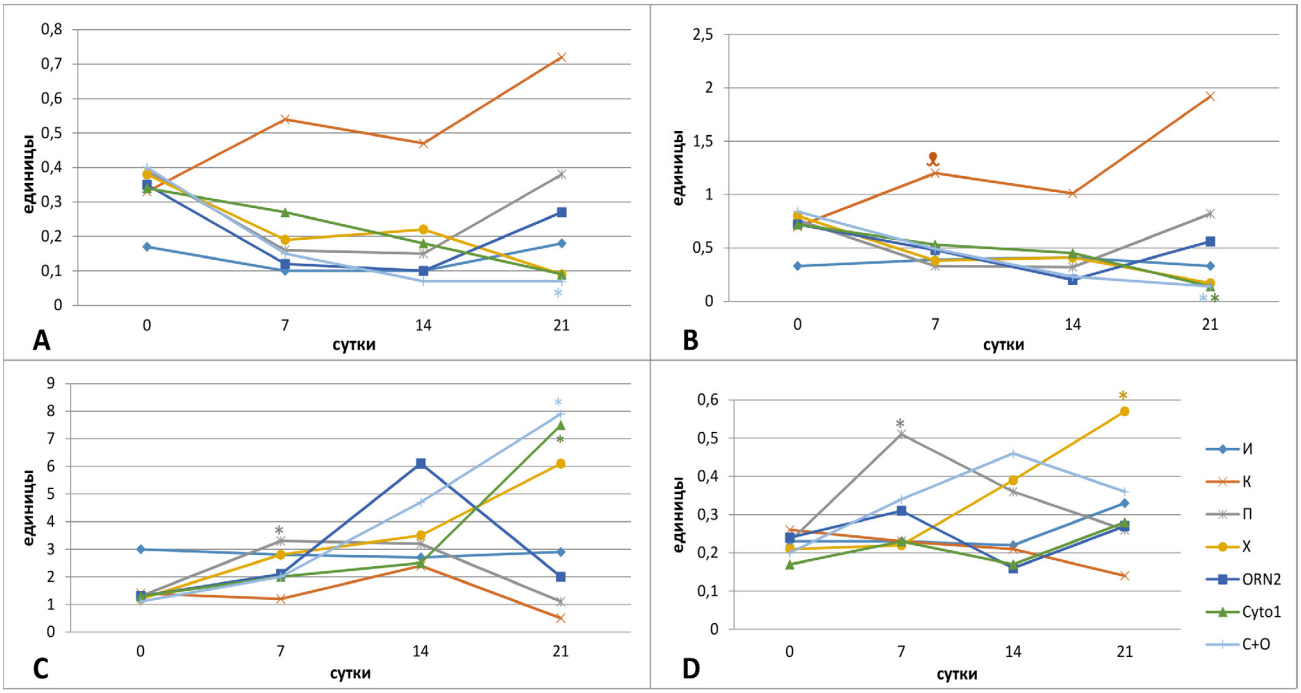


Рис. Показатели лейкоцитарных индексов периферической крови крыс в разные сроки эксперимента: А – ЛИИ, В – ИСЛК, С – ЛИ, D – ЯИИ; И – интактные животные; К – контрольная группа с моделированным артритом без лечения; П – группа животных, получавших лечение преднизолоном; Х – группа с лечением Хумирой; ORN2 – группа с лечением экспериментальным олигонуклеотидом ORN2; Cyto1 – группа с лечением экспериментальным олигонуклеотидом Cyto1; C+O – группа животных, получавших комбинацию двух олигонуклеотидов
(● – p<0,05 отличия от интактной группы, * – p<0,05 отличия от контрольной группы)

На третью неделю лечения значения индексов и лейкоцитарной формулы достигли наибольшего статистического различия в группах с разными схемами лечения. Показательно, что достоверных отличий от контрольной группы достигли группы с лечением препаратами Хумира, АСОН Cyto1 и АСОН ORN2 (p<0,05). В группе лечения Хумирой значение ЯИИ значительно превышало аналогичный показатель других групп, включая интактных животных. Такое изменение было вызвано не столько увеличением числа палочкоядерных нейтрофилов, сколько снижением зрелых сегментоядерных форм.

Известно, что хроническое воспаление отражается увеличением лейкоцитов в периферической крови, в первую очередь нейтрофилов и моноцитов. Увеличивается также и соотношение нейтрофилов к лимфоцитам [1, 7]. При ревматоидном артрите эндотелиоциты и клетки синовиальной оболочки поврежденных суставов экспрессируют медиаторы воспаления, такие как IL-1, IL-2, TNF-α и др. [8]. Это провоцирует выход в периферическую кровь моноцитов и сегментоядерных нейтрофилов, пролиферацию Т-лимфоцитов. Применение противоцитокиновых препаратов для лечения ревматоидного артрита кажется перспективным направлением в медицине. Одним из наиболее популярных препаратов является блокатор рецепторов к TNF-α – АСОН Cyto1. Он представляет собой антитело к названному рецептору и прерывает цепочку взаимодействий между лейкоцитами, формирующими воспалительную реакцию. Как ожидалось, после применения данного препарата показатели крови, свидетельствующие о воспалении, пришли в норму.

Показатели периферической крови крайне видоспецифичны. Если у человека наиболее многочисленной популяцией лейкоцитов являются нейтрофилы, то у крыс среди белых клеток крови преобладают лимфоциты, составляющие до 80 % от всех лейкоцитов. По этой причине интерпретация значения лейкоцитарных индексов человека на животных и обратно невозможна. Выводы об изменении иммунореактивности можно сделать, отталкиваясь не от абсолютных значений, а от тенденции изменения того или иного показателя в процессе лечения.

У интактных крыс показатели крови не изменялись с течением эксперимента. В группе без лечения значения индексов ЛИИ и ИСЛК, отражающих эндогенную интоксикацию, возрастали с течением эксперимента, что вполне закономерно. При этом в группах с лечением данные показатели постепенно нормализовывались, что свидетельствует о снижении интенсивности воспалительного процесса. Характерно, что в группах с преднизолоном и АСОН ORN2 после 14-х суток начинался незначительный рост этих индексов, тогда как в группах с генетическими антицитокиновыми препаратами продолжалось снижение индексов.

ЯИИ отражает скорость регенерации моноцитов и нейтрофилов, а также продолжительность их циркуляции в периферической крови. Наименьших значений данный показатель достигал в группе АСОН Cyto1 на 14-е сутки. Несмотря на его повышение к 21-м суткам, достоверных отличий от интактной группы не наблюдалось. Это объясняется снижением циркулирующих моноцитов после блокировки синтеза TNF-α. В группе без лечения данный индекс также был низок, однако за счет значительного повышения уровня сегментоядерных нейтрофилов. Такая картина характерна для истощенного иммунитета, в результате чего высок риск вторичных бактериальных осложнений [7]. Лимфоцитарный индекс оказался пониженным в группах без лечения, с АСОН ORN2 и преднизолоном (начиная с 14-х су-

ток), тогда как в группах, получавших Хумиру, АСОН Cyto1 и комбинацию АСОН, данный показатель рос на протяжении всего эксперимента. Это может свидетельствовать об успешной блокировке воспалительных процессов в организме экспериментальных животных [8].

Заключение. Таким образом, на основании динамики гематологических показателей крыс с адъювант-индуцированным артритом можно сделать вывод об эффективности препаратов, направленных на блокировку провоспалительных цитокинов. При этом применение экспериментальных олигонуклеотидов, направленных на блокировку синтеза TNF-α, не уступает в эффективности препарату Хумира, используемому в терапии ревматоидного артрита.

Финансирование. Исследования проведены при поддержке программы развития Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского (Рег. № АААА-А19-119122390041-9 от 23/12/2019).

Информированное согласие: Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в приказе Минздрава России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации», этическим принципам, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге в 18.03.1986 и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006). Эксперимент одобрен комитетом по этике Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Wahren-Herlenius M., Dörner T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. *Lancet*. 2013;382(9894):819-831. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60954-X
2. Zagólski O., Stręk P., Jurczak W., Gorzedowski P. Peripheral blood cell count and inflammation-based markers in chronic rhinosinusitis. *HNO*. 2018;66(8):605-612. https://doi.org/10.1007/s00106-018-0527-0
3. Wu Y., Chen Y., Yang X., Chen L., Yang Y. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *International Immunopharmacology*. 2016;36:94-99. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.006
4. Luo H., He L., Zhang G., Yu J., Chen Y. [et al.]. Normal Reference Intervals of Neutrophil-To-Lymphocyte Ratio, Platelet-To-Lymphocyte Ratio, Lymphocyte-To-Monocyte Ratio, and Systemic Immune Inflammation Index in Healthy Adults: a Large Multi-Center Study from Western China. *Clinical Laboratory*. 2019;65(3). https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2018.180715
5. Her M., Kavanaugh A. Alterations in immune function with biologic therapies for autoimmune disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(1):19-27. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.023
6. Gharagozloo M., Majewski S., Foldvari M. Therapeutic applications of nanomedicine in autoimmune diseases: from immunosuppression to tolerance induction. *Nanomedicine*. 2015;11(4):1003-1018. https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.12.003
7. Ranneh Y., Akim A. M., Hamid H. A. Induction of Chronic Subclinical Systemic Inflammation in Sprague-Dawley Rats Stimulated by Intermittent Bolus Injection of Lipopolysaccharide. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2019;67(6):385-400. https://doi.org/10.1007/s00005-019-00553-6
8. Yang X., Chang Y., Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*. 2016;2016:6813016. https://doi.org/10.1155/2016/6813016

Сведения об авторах:

Темирова Зенуре Зейнуровна, аспирант;
тел.: 89788852822; e-mail: wwwzzznnn333@gmail.com

Макалиш Татьяна Павловна, кандидат биологических наук,
младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории;
тел.: 89787853919; e-mail: gemini_m@list.ru; https://orcid.org/0000-0003-1884-2620

Оберемок Владимир Владимирович, кандидат биологических наук,
доцент кафедры биохимии; тел.: 89788146866; e-mail: genepcr@mail.ru

Зяблицкая Евгения Юрьевна, доктор медицинских наук,
заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией;
тел.: 89787434810; e-mail: evgu79@mail.ru

Сердюкова Олеся Артуровна, магистрант;
тел.: 89788051369; e-mail: aliss.serdyuckova@yandex.ru

Новиков Илья Александрович, аспирант;
тел.: 89787632073, e-mail: i.nowikow2012@mail.ru

Лайкова Екатерина Владимировна, ассистент кафедры биохимии;
тел.: 89788146866; e-mail: botan_icus@mail.ru

Шаймарданова Лейля Рустемовна, кандидат медицинских наук,
доцент кафедры нормальной анатомии; тел.: 89787295003; e-mai: vikllilysum@mail.ru