

Е.В.БЕРНОТЕНЕ,
Л.К.ЛЕОНАВИЧЕНЕ,
Р.А.БРАДУНАЙТЕ,
А.И.ВЕНАЛИС,
Д.И.ВАЙТКЕНЕ,
В.И.АСТРАУСКАС,
А.Ю.ВАЛИЦКАС
НИИ экспериментальной и
клинической медицины,
Вильнюс, Литва

УДК 616.72-002-022.7:9-092.6/9

МОДЕЛИРОВАНИЕ ИЕРСИННОЗНОГО РЕАКТИВНОГО АРТРИТА НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ДЕСФЕРАЛА И ПРЕПАРАТА FERRUM LEK У LEWIS КРЫС

Yersinia enterocolitica принадлежит к категории классических возбудителей реактивных артритов (ReA). Экспериментальная модель у крыс породы Lewis воспроизводится внутривенной инъекцией больших доз микробов штамма O:8. Однако частота развития ReA варьирует в диапазоне от 0 до 100%, в зависимости от дозы, микробного статуса животных и всего ряда других факторов. Опухание суставов обычно довольно слабое и убывает само собой в течение 2-3 недель. Целью нашей работы явилось увеличение частоты проявления и длительности течения, а также более острой выраженности артритов у крыс. В связи с тем, что увеличенное количество железа (Fe) в организме и присутствие сидерофора - Fe связывающего агента дефероксамина способны влиять на рост бактерий, нами исследовано действие препарата Ferrum Lek и сидерофора десферала на вирулентность и артритогенность *Y. enterocolitica* O:8. В части экспериментов также проведено повторное заражение иерсиниями, поскольку для развития хронического ReA необходимо периодическое или продолжающееся поступление антигена в сустав. Полученные результаты показали, что увеличилось число животных с ReA в группах, получивших десферал и повторные инъекции *Y. enterocolitica* O:8, а его течение было более острым и продолжительным, однако летальность оказалась более выраженной. Совместное применение десферала и Ferrum Lek оказывало аналогичное, но менее выраженное действие. Заражение же иерсиниями на фоне введения Fe слабо влияло на вирулентность и артритогенность *Y. enterocolitica* O:8.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Yersinia enterocolitica*, экспериментальный реактивный артрит, железо, десферал.

Иммунопатология, аллергология, инфектология 2001, 2: 22-33.

MODELLING OF YERSINIA TRIGGERED REACTIVE ARTHRITIS IN LEWIS RATS ON THE BACKGROUND OF DESFERAL AND FERRUM LEK

E.BERNOTIENE, L.LEONAVICIENE, R.BRADUNAITE, A.VENALIS, D.VAITKIENE,
V.ASTRAUSKAS, A.VALICKAS

Institute of Experimental and Clinical Medicine, Vilnius, Lithuania.

Yersinia enterocolitica is known to be one of the most frequent causes of reactive arthritis (ReA). ReA triggered by an intravenous injection of high dose of *Y. enterocolitica* O:8 in Lewis rats is an accepted experimental model of the disease. The incidence of arthritis variates in a range of 0 to 100%, depending on dose, microbial

status in animals and other factors. The joint swelling is usually weak and subsides by it's own in a 2-3 weeks. The aim of our study was to increase the incidence and severity of arthritis and to extend it's duration. As the both, increased amount of body iron (Fe) and the availability of a siderophore - the Fe-chelating agent deferoxamine can be exploited for the growth of *Yersinia*, we investigated the effect of Fe preparation – Ferrum Lek and the siderophore Desferal on the virulence and arthrogenicity of *Y. enterocolitica* O:8. The influence of reinfection was also evaluated in some of our experiments, because a periodic or continuous supply of antigen is required for the development of chronic ReA. Our results showed that the course of arthritis was more severe and more prolonged and the lethality was higher in the groups receiving the therapy with Desferal and having repeated infection with *Y. enterocolitica* O:8. The therapy with Ferrum Lek didn't exert similar kind of action, and showed less expressed effect on the virulence and arthritogenicity of *Y. enterocolitica* O:8.

KEY WORDS: *Yersinia enterocolitica*, experimental reactive arthritis, iron, Desferal. *Immunopathol., allergol., infectol.* 2001, 2: 22-33.

Изучение роли инфекционных факторов как возможной причины развития реактивных артритов (ReA), всегда привлекало внимание исследователей [1,2]. ReA - это негнойные воспалительные процессы в суставах, развивающиеся в связи с определенными инфекционными заболеваниями внесуставной локализации [1,2,3,4], вызванные такими микробами, как *Chlamydia trachomatis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* и другими. Микробные антигены, или целые патогены, играют важную роль в патогенезе ReA, особенно в ранней стадии заболевания, однако точные механизмы, указывающие на то, каким образом патогены способствуют развитию этой болезни, неизвестны.

Бактерии, индуцирующие ReA, инфицируют слизистые оболочки, а затем они или их фрагменты могут попасть в суставы, где индуцируют ответ Th1 лимфоцитов [2]. Ухудшение Th1 ответа способствует персистенции болезни. При нейтрализации TNF α или ИФН γ , усиливается иерсиниозная инфекция [5,6]. У больных ReA слабая секреция TNF α и наличие HLA B27 коррелируют с более длительной продолжительностью болезни и хроническим ее течением [7].

ReA является актуальным в клинической практике, так как им заболевают молодые люди, и болезнь продолжается несколько недель или месяцев. Хорошо известно, что при латентном течении или носительстве патогенов, когда инфицированные пациенты остаются практически здоровыми, в ряде случаев инфекция сочетается с поражением суставов. Хотя ReA редко вызывает инвалидность, тем не менее, у некоторых больных он имеет тенден-

цию повторяться и переходить в хроническое заболевание [8,9], лечение которого является более сложной проблемой.

Наиболее частыми агентами энтероколитических артритов являются микроорганизмы *Yersinia enterocolitica* или (реже) *Yersinia pseudotuberculosis*, и они принадлежат к категории классических возбудителей ReA [10]. Из числа больных иерсиниозом, по данным разных авторов, ReA развивается у 13-55% [11,12]. По данным С.М.Сидельниковой [13], эти микроорганизмы обуславливают развитие энтероколитических ReA у 63,7% больных.

В связи с вышеизложенным, *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* часто используются для моделирования ReA. Однако частота его развития варьирует в довольно широких диапазонах, а также зависит как от породы используемых животных, так и от штамма бактерий. При внутривенном (в/в) введении *Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis* крысам пяти разных пород (Lewis, SHR, Wistar, WKY и Zucker), ReA развивался лишь у 5 из 9 оставшихся в живых крыс породы SHR при заражении *Y. enterocolitica* штаммом O:8 [14]. У других пород крыс, в том числе и Lewis, признаки артрита не были выявлены. По данным других авторов, исследовавших Lewis, Buffalo, Fisher, DA и LDA породы крыс, только у животных породы Lewis развивался артрит [15]. Наши попытки воспроизвести ReA у крыс породы Wistar тоже не дали положительных результатов. Только у одной из 45 крыс после в/в инъекции иерсиний опухли суставы задних конечностей (данные не опубликованы), что позволяет

предполагать существование механизма патогенеза РеА и у других пород крыс. Воспроизвести РеА у Lewis крыс удалось и другим исследователям, но, как показывают многочисленные данные, частота его развития варьирует от 0 до 100% [15]. Нет однозначного ответа, почему после в/в инъекции той же самой *Y. enterocolitica* O:8, развитие РеА у Lewis крыс так широко варьирует. Предполагают, что это зависит от дозы бактерий, попавших в организм животного. Сама же артритогенная доза должна быть довольно высокой и близкой к летальной [16]. Имеются данные о том, что чувствительность к РеА определяется и бактериологическим статусом организма животного [16]. Так, обычный патоген крыс *Mycoplasma pulmonis* способен ослабить даже коллагеновый или адьювантный артрит [16]. Животные, чувствительные к появлению РеА пород, могут стать резистентными, и наоборот, резистентные животные могут стать чувствительными, в зависимости от изменения микробного окружения [17]. Однако даже у крыс, которые содержатся в той же самой клетке и у которых микробиологический статус должен был быть очень похожим, артрит развивается не у всех особей. Данные наблюдения позволяют думать, что существуют и другие факторы, определяющие чувствительность организма крыс к развитию РеА.

Недостатком модели иерсиниозного РеА также является короткая продолжительность опухания суставов. По данным многих авторов, иерсиниозный РеА у крыс выражен недостаточно интенсивно и проходит сам по себе в течение четырех недель со дня заражения [15,18]. Так как в клинике важнейшей проблемой является терапия хронических, рецидивирующих РеА, наиболее ценной для эксперимента была бы модель хронического РеА. Существует мнение, что хронизация РеА главным образом зависит от продолжительной персистенции бактерий в организме [19,20].

Одним из факторов, определяющих патогенность инфекции в организме, является повышенная концентрация железа (Fe) в крови. У пациентов с увеличенным количеством Fe в сыворотке заболевание могут вызвать даже микроорганизмы, обычно не несущие угрозы [21]. Иерсиния является микробом, рост которого стимулируется избытком Fe [21]. Эти грам-отрицательные бактерии способны расти при увеличенном количестве Fe как в

жидкостях организма, так и в макрофагах [22]. В опытах *in vitro* установлено, что сыворотка с избытком Fe угнетает фагоцитарные свойства полиморфноядерных клеток [23]. У пациентов с повышенным количеством Fe, *Y. enterocolitica* или *Y. pseudotuberculosis* вызывают тяжелые системные инфекции [21,24,25,26]. Смертность при септических формах болезни составляет около 75%, несмотря на адекватное лечение антибиотиками [26]. Существует и другая точка зрения, что сама инфекция может вызвать как увеличение количества ферритина в сыворотке крови, так и дисфункцию нейтрофилов [27].

Системный иерсиниоз, кроме поражения желудочно-кишечного тракта, вызывает артрит, лимфаденит, фарингит, остеомиелит, пневмонию, эндокардит, менингит и дерматит [24,28]. Группу риска при этих заболеваниях составляют пациенты с бета-талассемией, Африканским сидерозом, алкоголизмом, аспленией, передозированной парентеральной и пероральной терапией препаратами Fe, гемохроматозом, сидеробластной анемией или трансфузным сидерозом [22]. Парадоксально, но экспериментальные, *in vitro* и клинические данные показали, что особенно рискуют пациенты, употребляющие связывающий Fe препарат - дефероксамин* [24,25,26], который применяют для детоксикации при отравлениях Fe и при болезнях с характерным повышением концентрации Fe в крови. Полученный из *Streptomyces pilosus*, ДФ является хелатным агентом, связывающим Fe, в результате чего формируются экзогенные сидерофоры (иерсинии легко усваивают только в состав сидерофоров входящее Fe).

Среди иерсиний *Y. enterocolitica* отличается тем, что сама не продуцирует сидерофоров, но имеет для них рецепторы и поэтому может использовать ферроксиамин как промотор роста [22,24]. Другие же авторы утверждают, что некоторые серогруппы иерсиний способны сами продуцировать сидерофоры и от этого свойства сильно зависит вирулентность их штамма [24,26]. Продукция сидерофоров свойственна исключительно серогруппам, вызывающим летальность у мышей – O:8, O:13, O:20 и O:40, а невирулентные для них штаммы O:3, O:5,27 и O:9 сидерофоров не продуцируют [28]. Видимо, поэтому штамм O:8 вызывает более выраженную клинику, в том числе сильное изъязвление кишечника и смерть, в то время как под действием

* – препараты этой группы (Desferal, Deferoxaminum или Desferioxaminum) в тексте будут представлены сокращенно “ДФ”).

штаммов O:3 и O:9 отмечается меньшее повреждение [28]. В Европе у людей чаще всего доминируют патогенные серовары O:3 и O:9, в США – O:8 [26]. Однако в эксперименте вызвать РеА у крыс лучше всего удалось с помощью серовара O:8 [15,28]. Иерсиния O:8, вирулентность которой частично зависит от ее способности секретировать собственные сидерофоры, называемые иерсиниябактинами или иерсинияфорами, может и не нуждаться в экзогенном источнике хелата железа [28]. Продукция иерсиниозных сидерофоров регулируется железом, что стимулирует рост иерсиний даже при низком уровне Fe [28]. При повышенной концентрации Fe или употреблении экзогенных сидерофоров обычно мало вирулентные серогруппы *Y. enterocolitica* O:3 и O:9, являющиеся наиболее частой причиной всех иерсиниозных инфекций, могут достигать вирулентности, равную серогруппе O:8 [28]. Установлено, что внутрибрюшинная (в/б) инъекция ДФ в 100 000 раз снижает 50% летальную дозу *Y. enterocolitica* O:3, O:9 штаммов у мышей и с 10 до 100 раз вирулентную для мышей дозу *Y. enterocolitica* O:8 [28].

Парадоксально, но повышенное количество Fe, а также терапевтический его контроль при употреблении ДФ, дополнительно поставляет Fe штаммам серогруппы O:8, продуцирующим сидерофоры. Лишь ДФ поставляет Fe сидерофоры непродуцирующим серогруппам O:3 и O:9, в то же самое время вызывая изменения фагоцитирующей способности нейтрофилов и функции иммунной системы [28]. Следовательно, действуя на обмен Fe, можно усилить иерсиниозную инфекцию и тем самым увеличить артритогенность микробов. Однако также имеются экспе-

риментальные данные о том, что даже на фоне инъекции ДФ не удалось вызвать РеА у Lewis крыс, сероваром *Y. enterocolitica* O:8 [12].

Целью нашей работы было усиление выраженности и продолжительности иерсиниозного РеА у крыс при помощи дополнительного введения Fe, ДФ и инъекций *Y. enterocolitica* O:8, способствуя более длительному выживанию и персистенции данных патогенов в организме животных.

Материал и методы. *Опыты проведены на 143 Lewis крысах обоего пола, полученных из питомника “Биорегламент” (Литва), массой 250-300г, содержащихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде. Однократное в/в заражение проводилось *Y. enterocolitica* штаммом O:8, любезно предоставленным проф. П. Тойваненом (Департамент медицинской микробиологии Университета Турку, Финляндия) и содержащимся в стандартизованных условиях. Бактериальная культура для проведения экспериментов приготавливалась по стандартизированной методике [16] и вводилась в хвостовую вену.*

В 1-ом эксперименте было использовано 40 Lewis крыс-самцов, которым за 4 часа до в/в заражения иерсиниями (доза - 3×10^8 микробных тел), была проведена в/б инъекция ДФ (СІВА-GEIGY, Швейцария) (40мг/кг) в объеме 0,5 мл физиологического раствора. На 17-й день эксперимента животные были разделены на две аналогичные по опуханию суставов группы. 1-ой группе была введена повторная в/б инъекция ДФ (75 мг/кг), а 2-ой – физиологический раствор. Через 5 дней процедуры были повторены.

Таблица 1

Схема опыта при моделировании РеА у Lewis крыс-самцов на фоне десферала и препарата железа Ferrum Lek

Группы	Дни опыта												Декапитация животных
	1	2-3	4	5-6	7	8	9-13	20	21	22	23-27	28	
1	ДФ+Ye (1×10^8)	-	ДФ	-	ДФ	-	-	ДФ+Ye (3×10^8)	-	ДФ	-	-	Декапитация животных
2	ДФ+Fe+Ye (1×10^8)	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe	-	ДФ+Fe+Ye (3×10^8)	Fe	Fe	Fe		
3	Fe+Ye (1×10^8)	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe	Fe+Ye (3×10^8)	Fe	Fe	Fe	Fe	
4	Физ. раствор +Ye (1×10^8)	-	Физ. раствор	-	Физ. раствор	-	-	Физ. раствор +Ye (3×10^8)	-	Физ. раствор	-	-	

ПРИМЕЧАНИЕ: ДФ – десферал (50 мг/кг); Fe – препарат железа Ferrum Lek (20 мг/кг); Ye – *Y. enterocolitica* O:8 .

Во 2-ом эксперименте было изучено влияние различных агентов с целью продлить персистенцию бактерий и продолжительность РеА. 40 Lewis крыс-самцов были разделены на 4 группы. Схема опыта представлена в таблице 1.

1-я группа за 4 часа до заражения иерсиниями получила в/б инъекцию ДФ (50 мг/кг) и две последующие его инъекции в течение недели, 2-я группа – ДФ и препарат железа Ferrum Lek (Lek d.d. фармацевтическая компания, Люблиана, Словения) (20 мг/кг) внутримышечно (в/м) в объеме 0,1 мл ежедневно. 3-я группа - препарат Ferrum Lek за день до в/в заражения иерсиниями и далее (в течение 13 дней). 4-я группа - физиологический раствор. Доза иерсиний -1×10^8 микробных тел. С целью получения большей численности животных с развитием РеА на 20-й день эксперимента были проведены те же процедуры, что и в начале опыта, только доза иерсиний была увеличена в 3 раза (3×10^8).

3-й эксперимент был проведен на 43 Lewis самках, разделенных на 3 группы. В первый день опыта была использована только половина животных из каждой группы. 1-ой(а) группе за 4 часа до заражения иерсиниями (2×10^8) в/б введен ДФ (60 мг/кг), 2-ой(а) – в/б ДФ (60 мг/кг) и в/м Ferrum Lek (20 мг/кг). 3-я(а) группа до заражения получила в/б инъекцию физиологического раствора и служила контролем. Повторная инъекция ДФ 1-ой(а) группе была произведена через 2 дня, а 2-я(а) группа в течение недели получала препарат Fe. На 3-й день эксперимента, определив летальность животных и уточнив дозу иерсиний, мы провели те же процедуры остальным животным, за исключением того, что в 1-ой(б) группе была уменьшена доза иерсиний до $1,5 \times 10^8$.

Во время экспериментов следили за динамикой массы тела и опухания суставов. В конце экс-

перимента, после декапитации животных, были проведены исследования крови: лейкоциты и эритроциты подсчитаны при помощи аппарата “Пикоскале” (Венгрия) и определена СОЭ. Для патоморфологических исследований брали материал из пораженных суставов и печени, и изменения в них определялись по стандартизированным методикам. Результаты микроскопических исследований оценивались по 4-балльной (0-3) системе. Для определения наличия иерсиний в посевах внутренних органов (селезенка, кишечник, лимфатические узлы) и суставах использовали селективную среду (Oxoid, № СМ653).

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывались при помощи метода вариационной статистики, показатель “Р” определяли по таблице Стьюдента. Отклонение показателей от контроля в % определялось по формуле: % отклонение = $(П - К) / К \times 100$, где П – показатель подопытной группы; К – показатель контрольной группы.

Результаты и обсуждение

1. Моделирование иерсиниозного РеА у Lewis крыс-самцов на фоне десферала.

В 1-ом эксперименте сочетанное введение ДФ и высокой дозы иерсиний вызвало значительную гибель животных: в течение недели погибло 45% крыс (таблица 2). Суставы у оставшихся в живых животных начали опухать с 8-го дня опыта и в течение двух недель опухли у 90,9% крыс. С 17 дня эксперимента, когда животных разделили на две аналогичные группы, у крыс 1-ой группы, получивших две дополнительные инъекции ДФ, опухание суставов было более выраженным по сравнению со 2-ой группой, получившей физиологический раствор, что прослеживалось вплоть до конца эксперимента. Ди-

Таблица 2

Схема эксперимента, летальность животных и опухание суставов при моделировании РеА у Lewis крыс-самцов на фоне десферала.

n	Дни опыта						Группы	n	Дни опыта				
	1	2	3	6-7	8	11-17			17	22	Опухание суставов		
											Летальность		
40	ДФ	10/40	5/30	3/25	18/22 81,8%	20/22 90,9%	1	11	ДФ	ДФ	9/11 81,8%	6/10 60%	6/10 60%
									Физ. раст	Физ. раст	8/11 72,7%	5/11 45,5%	3/11 27,3%

ПРИМЕЧАНИЕ: слева – число погибших крыс или крыс с опухшими суставами и справа – общее число исследуемых животных; % - процентная численность животных с опухшими суставами. ДФ - десферал (40 мг/кг – первая в/б инъекция; 75 мг/кг – повторные в/б инъекции).

Таблица 3

**Динамика средней выраженности опухания суставов (в баллах)
при моделировании РеА на фоне десферала.**

n	Дни опыта				Группы	n	Дни опыта						
	8	11	15	17			18	22	24	28	30	32	37
22	1,61±0,32	3,21±0,52	3,23±0,49	1,98±0,23	1	11	2,23±0,42	1,95±0,42	1,32±0,36	1,40±0,52	0,90±0,35	0,80±0,32	0,60±0,20
					2	11	1,73±0,34	1,45±0,30	1,00±0,33	0,55±0,26	0,41±0,22	0,36±0,21	0,40±0,23

ПРИМЕЧАНИЕ: 1-я гр. – 3 инъекции ДФ; 2-я гр. – 1 инъекция ДФ.

динамика средней выраженности опухания суставов представлена в таблице 3, из которой видно, что дополнительные инъекции ДФ ее усилили.

Бактериологические исследования образцов органов, проведенные у животных на 37 день после инъекции иерсиний, показали, что заражение микробами на фоне ДФ способствовало их персистенции в организме. Положительные посевы из внутренних органов были обнаружены у части животных в обеих группах, хотя различия между ними незначительны (таблица 4). Результаты посевов из суставов были отрицательны как в 1-ой, так и во 2-ой группах.

Масса тела и внутренних органов существенно не различалась между исследуемыми группами, а показатели крови СОЭ (5,20±0,65 и 3,40±0,47; P<0,05) и

лейкоциты ($10,25 \pm 0,43 \times 10^9/\text{л}$ и $9,81 \pm 0,40 \times 10^9/\text{л}$), хотя и не указывали на острый воспалительный процесс, были выше на 52,9% и 4,5% соответственно, в 1-ой подопытной группе, получившей 3 инъекции ДФ. Количество эритроцитов в данной группе было ниже на 16% ($4,09 \pm 0,11 \times 10^{12}/\text{л}$ – 1-я гр. и $4,87 \pm 0,44 \times 10^{12}/\text{л}$ – 2-я гр.).

При патоморфологическом исследовании печени и мягких периартикулярных тканей не обнаружено существенных различий между группами. Воспалительная инфильтрация, фиброз в синовии и пролиферация синовиальных ворсинок незначительно выше в 1-ой группе, однако эдема более выражена во 2-ой группе, получившей лишь одну инъекцию ДФ (таблица 5). Признаки эрозий, узур и

Таблица 4

**Высеивание *Y. enterocolitica* из внутренних органов
при моделировании РеА на фоне десферала**

Органы	1-ая группа	2-ая группа
Селезенка	3/10 (30%)	6/10 (60%)
Лимфатические узлы	3/10 (30%)	4/10 (40%)
Кишечник	5/10 (50%)	3/10 (30%)

ПРИМЕЧАНИЕ: слева – число животных с положительными посевами и справа – общее число обследованных животных. % - процентная численность образцов с высеиванием *Y. enterocolitica*

Таблица 5

**Патоморфологические изменения в суставах у Lewis крыс
при моделировании РеА на фоне десферала**

Морфологические изменения	Группы	
	1-я (3 инъекции ДФ)	2-я (1 инъекция ДФ)
Синовиальная оболочка		
Пролиферация ворсинок	0,8±0,12	0,6±0,17
Эдема	0,1±0,06	0,4±0,14
Воспалительная инфильтрация	0,4±0,09	0,2±0,11
Фиброз	1,4±0,15	0,6±0,27
Хрящ		
Эрозия	0,3±0,11	0,25±0,17
Узура	0,1±0,04	0,1±0,06
Паннус	0,03±0,01	-

слабое формирование паннуса в хряще обнаружены в группе животных, получивших 3 инъекции ДФ.

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно констатировать, что, несмотря на большую численность гибели животных, ДФ вызвал опухание суставов у 90,9% животных, которое продолжалось в течение трех недель а у 27% у крыс оно наблюдалось в течение всего опыта. Две повторные инъекции ДФ увеличивали численность животных с опухшими суставами, что наблюдалось до конца опыта у 60% крыс (таблица 2).

2. Моделирование иерсиниозного РеА у Lewis крыс на фоне десферала и препарата железа Ferrum Lek.

Во 2-ом опыте заражение в три раза меньшей дозой микробов (таблица 1) на фоне ДФ и Ferrum Lek не сопровождалось гибелью животных в первые дни после заражения.

Первые признаки поражения суставов передних или задних конечностей у отдельных животных возникали уже на 7-й день после заражения (таблица 6) и к 19-ому дню опыта

Опухание было обнаружено у 50% животных 1-ой группы и у 20% 2-ой и 4-ой групп. В группе, получавшей препарат Fe, ни у одного животного не было выявлено воспаления в суставах. Повторное заражение животных на 20-й день эксперимента, в три раза увеличенной дозой иерсиний на фоне ДФ и Fe, повысило число животных с опухшими суставами, что достигло максимума на 27-й день эксперимента, т.е. через неделю после последней инъекции микробов.

Наибольшее число крыс с опухшими суставами обнаружено в 1-ой и во 2-ой группах, получивших ДФ. Далее, на протяжении всего периода наблюдения, регистрировалось последовательное снижение как опухания суставов, так и числа животных с

Таблица 6

Опухание суставов при моделировании РеА у Lewis крыс-самцов на фоне десферала и препарата Ferrum Lek

Группы	Дни опыта													
	7-8	11-13	14-15	19	22	25	27	28	32	34	36	38	42	46
1	Крысы с опухшими суст.	2/10	4/10	4/10	5/10	6/10	7/10	9/10	8/10	5/10	5/10	5/10	5/10	5/10
	Опухание суст. (баллы)	1	2	2	2,5	4,5	6,5	7,5	6	4	4,5	4,5	3,5	3,5
	Среднее опухание суст.	0,50±0	0,50±0	0,50±0	0,50±0	0,75±0,2	0,93±0,2	0,83±0,2	0,75±0,2	0,80±0,2	0,90±0,3	0,90±0,3	0,88±0,2	0,70±0,3
2	Крысы с опухшими суст.	1/10	1/10	2/10	2/10	2/10	2/10	8/10	5/10	5/10	4/10	3/10	2/10	4/9
	Опухание суст. (баллы)	1,5	0,5	1,5	1,5	4,5	4,5	6,5	5,5	2,5	2,5	1,5	1	±
	Среднее опухание суст.	1,50±0	0,50±0	0,75±0,2	0,75±0,2	2,25±1,7	2,25±1,7	0,81±0,2	1,10±0,2	0,50±0	0,63±0,1	0,50±0	0,50±0	±
3	Крысы с опухшими суст.	0/10	0/10	0/9	0/9	1/9	1/9	4/9	4/9	2/8	2/8	2/7	2/7	3/7
	Опухание суст. (баллы)	-	-	-	-	0,5	0,5	4,5	4,5	1,5	2,5	2	1	±
	Среднее опухание суст.	-	-	-	-	0,50±0	0,50±0	1,13±0,7	1,13±0,6	0,75±0,2	1,25±0,7	1,00±0,5	0,50±0	±
4	Крысы с опухшими суст.	1/10	2/10	2/10	2/10	3/9	4/9	4/9	4/9	1/9	2/9	3/9	2/8	2/8
	Опухание суст. (баллы)	2	2	1,5	2	2,5	2,5	3,5	3	1,5	1,5	2,5	2	1
	Среднее опухание суст.	2,0±0	1,0±0,50	0,75±0,2	1,0±0,50	0,83±0,2	0,63±0,1	0,87±0,1	0,75±0,2	0,75±0,2	0,75±0,2	0,83±0,1	1,00±0	0,50±0,5

ПРИМЕЧАНИЕ: слева – животные с опухшими суставами/ справа – общее число животных.

опухшими суставами, причем наиболее низкие значения были обнаружены к концу эксперимента в 3-ей и 4-ой группах. Так, опухание суставов в 1-ой группе обнаружено у 50% животных. Во 2-й, 3-ей и 4-ой группах наблюдалось слабое опухание у 44,4%, 43% и 25% крыс соответственно.

Не выявлено существенных различий между группами в массе тела (таблица 7), однако масса печени была достоверно выше в группе, получавшей препарат Fe ($p < 0,02$).

Отмечено и существенное понижение массы тимуса ($P < 0,05$) во всех подопытных группах, что указывает на супрессию клеточного иммунитета.

При макроскопическом исследовании поражения внутренних органов изменения были наиболее выражены в 1-ой группе (у 20% животных инфаркты в почках и у 10% - изменения в печени). Во 2-ой группе не выявлено макроскопически видных изменений во внутренних органах. Однако при патоморфологическом исследовании печени обнаружена более выраженная, чем в контроле, альтерация па-

ренхимы как в 1-ой, так и во 2-ой группах ($1,4 \pm 0,07$ – 1-я гр., $1,4 \pm 0,2$ – 2-я гр. и $0,7 \pm 0,15$ – контроль; $P < 0,001$; $P < 0,02$ – соответственно). В синовиальной оболочке у животных 1-ой группы достоверно повышена пролиферация ворсинок ($1,0 \pm 0,12$; $P < 0,02$), эдема ($0,8 \pm 0,20$; $P < 0,05$) и фиброз ($0,6 \pm 0,19$; $P < 0,02$) по сравнению с контрольной группой ($0,5 \pm 0,12$ – пролиферация ворсинок; $0,2 \pm 0,15$ – эдема) в которой признаки фиброза отсутствуют. В хряще у животных первых двух групп более выражены эрозии ($1,1 \pm 0,10$ – 1-я гр.; $0,7 \pm 0,31$ – 2-я гр.), чем в контроле ($0,5 \pm 0,25$). Слабые признаки формирования паннуса ($0,1 \pm 0,08$) отмечены лишь во 2-ой подопытной группе.

При исследовании показателей крови не обнаружено явлений сильного воспалительного процесса и существенных различий между группами. Тем не менее они были наиболее выраженными в 3-ей группе, где СОЭ и число лейкоцитов было соответственно на 34,5% и 11,4% выше показателей контрольной группы (таблица 7).

Таблица 7

Масса тела и органов и показатели крови при моделировании РеА у Lewis крыс-самцов на фоне десферала и препарата железа.

Группы	Масса				Показатели крови		
	Масса тела (г)	Печень (г)	Почки (г)	Тимус (мг)	СОЭ (мм/час)	Лейкоциты ($10^9/л$)	Эритроциты ($10^{12}/л$)
1-ая ДФ+Ye	$286,36 \pm 14,08$	$9,82 \pm 0,56$	$1,96 \pm 0,08$	$305,00 \pm 20,63$ $P < 0,05$	$4,73 \pm 0,73$	$7,51 \pm 0,57$	$6,32 \pm 0,26$
2-ая ДФ+Fe+Ye	$271,11 \pm 15,49$	$10,55 \pm 0,55$	$2,05 \pm 0,11$	$274,67 \pm 29,54$ $P < 0,05$	$4,22 \pm 0,55$	$7,52 \pm 0,30$	$6,91 \pm 0,32$
3-я (Fe+Ye)	$286,43 \pm 12,43$	$11,76 \pm 0,55$ $P < 0,02$	$2,11 \pm 0,12$	$304,0 \pm 19,82$ $P < 0,05$	$5,57 \pm 0,97$	$8,71 \pm 0,64$	$7,14 \pm 0,24$
4-ая (Ye) контроль	$286,87 \pm 16,42$	$9,53 \pm 0,54$	$2,09 \pm 0,11$	$380,75 \pm 29,54$	$4,14 \pm 0,26$	$7,82 \pm 0,33$	$6,65 \pm 0,16$

ПРИМЕЧАНИЕ: ДФ – десферал (50 мг/кг); Fe – препарат железа Ferrum Lek (20 мг/кг); Ye – *Y. enterocolitica* O:8. Различия достоверны по сравнению с контрольной группой.

Таблица 8

Летальность животных и опухание суставов при моделировании РеА у Lewis крыс-самок на фоне десферала и препарата железа.

Группы	Дни эксперимента														
	1	3	Летальность							Опухание суставов					
			2	13	15	20	23	25	6	8	9-13	15	17	20	23-27
I	1a	ДФ+Ye	5/8	0/3	1/3	1/2	0/1	0/1	2/3	2/3	3/3	2/2	2/2	1/1	1/1
	1б	ДФ+Ye		1/7	1/6	1/5	0/4	0/4	1/7	2/7	1/6	1/5	2/5	2/4	2/4
II	2a	ДФ+ FeYe	0/7	1/7	1/6	0/5	0/5	0/5	5/7	5/7	4/6	5/6	4/5	4/5	4/5
	2б	ДФ+Fe+Ye		0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	2/7	3/7	1/7	1/7	2/7	3/7	4/7
III	3a	Физ.р +Ye	0/7	0/7	1/7	1/6	0/5	0/5	0/7	1/7	1/7	1/6	1/6	1/5	1/5
	3б	Физ.р +Ye		0/7	0/7	1/7	1/6	1/5	1/7	1/7	1/7	1/7	1/7	1/7	1/4

ПРИМЕЧАНИЕ: слева – число погибших животных или животных с опухшими суставами/ справа – общее число исследованных животных.

Результаты посевов внутренних органов, проведенные на 26 день после последнего заражения *Y. enterocolitica*, показали, что у 20% животных 2-ой группы иерсинии высевались из лимфатических узлов, а в контроле у 20% крыс - из селезенки и кишечника. Результаты посевов в других группах отрицательны.

В третьем эксперименте при моделировании РеА у Lewis крыс-самок доза ДФ была несколько выше (60 мг/кг), но в отличие от предыдущего опыта, 1-ой группе животных он был введен только два раза (за 4 часа до заражения и на 3-ий день эксперимента). В связи с тем, что из взятой половины животных I-ой группы, зараженных дозой микробов 2×10^8 , на следующий день погибло 62,5% крыс [1-я(а) гр.], второй половине животных доза иерсиний была уменьшена до $1,5 \times 10^8$ микробов [1-я(б) гр.]. Таким образом была исключена их гибель в течение первых суток после инфицирования (таблица 8).

Первые признаки поражения суставов во всех трех группах возникли на 6-й день эксперимента, только различалась их численность. Так, в I-ой [1-я(а)+1-я(б)] группе, к концу опыта они выявлены у 60% оставшихся в живых крыс, во II-ой группе [2-я(а)+2-я(б)] – у 66,7% и в III-ей [3-я(а)+3-я(б)] у – 22% животных. Общий балл опухания суставов и средняя его величина представлены в таблице 9.

Наиболее выраженным опуханием было в 1-ой группе животных, получавших ДФ. Добавление к ДФ препарата Fe также сохранило опухание суставов на более высоком уровне, чем в контроле. Следовательно, как десферал, так и его сочетание с Fe усиливали развитие РеА.

Результаты посевов из внутренних органов на 27 день после заражения показали, что у части животных во всех группах они были положительными. Так, у 20% крыс 1-ой группы иерсинии были обнаружены в селезенке, лимфатических узлах и кишечнике. Во 2-ой группе, где наряду с ДФ вводился Fe, присутствие иерсиний в лимфатических узлах выявлено у 25% животных, в кишечнике у 16,7% и селезенке – у 8,33% крыс.

При исследовании массы тела и органов не выявлено существенных различий между группами, хотя масса печени ($9,35 \pm 0,31$ г во 2-ой гр. и $8,45 \pm 0,5$ г в контроле) и тимуса ($312,5 \pm 24,81$ мг во 2-ой гр. и $274,9 \pm 22,59$ мг в контроле) были на 10,7% и 13,7% выше контроля у животных, получавших наряду с ДФ и Fe.

Показатели крови не указывали на развитие сильного воспалительного процесса в суставах и существенно не различались между группами, только СОЭ у животных 1-ой группы на 27% превышало уровень контроля ($7,2 \pm 1,62$ мм/час и $5,67 \pm 0,96$ мм/час соответственно). При патоморфологичес-

Таблица 9

Опухание суставов (в баллах) у Lewis-самок при моделировании РеА на фоне десферала и препарата железа Ferrum Lek.

Группы		Дни опыта								
		6	8	9	13	15	17	20	23	27
I ДФ+Ye	Опух. в баллах	1,5	2	2	3	4,5	4,5	4,0	4,0	4,0
	Средняя величина опухания	$0,5 \pm 0,29$	$0,67 \pm 0,17$	$0,75 \pm 0,25$	$0,75 \pm 0,25$	$1,5 \pm 0,57$	$1,13 \pm 0,47$	$1,33 \pm 0,60$	$1,33 \pm 1,09$	$1,33 \pm 1,09$
II ДФ+Fe+Ye	Опух. в баллах	5,0	7,5	5,0	4,0	4,5	3,5	3,5	3,5	2,5
	Средняя величина опухания	$0,714 \pm 0,24$	$1,06 \pm 0,27$	$0,79 \pm 0,27$	$0,80 \pm 0,30$	$0,75 \pm 0,11$	$0,58 \pm 0,08$	$0,5 \pm 0$	$0,56 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,09$
III Ye	Опух. в баллах	1,5	1,5	2,5	1	1	1	0,5	0,5	±
	Средняя величина опухания	$0,5 \pm 0,25$	$0,5 \pm 0$	$0,67 \pm 0,17$	$0,5 \pm 0$	$0,5 \pm 0$	$0,5 \pm 0$	$0,25 \pm 0,25$	$0,25 \pm 0,25$	±

ком исследовании суставов отмечены лишь незначительные изменения, существенно не различающиеся между группами.

Дать однозначную оценку обнаруженным фактам достаточно трудно, хотя полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о том, что частота и тяжесть иерсиниозного РеА в определенной мере зависят от повышения вирулентности и артритогенности бактерий, что вызвано применением ДФ. Он увеличивал летальность животных при заражении иерсиниями и повышал частоту развития артрита, хотя повторные его введения не показывали такого существенного действия. РеА у Lewis самцов, получавших как три, так и одну инъекцию препарата, развивался примерно у одинакового числа животных, хотя опухание суставов было более выраженным у первых. Видимо, во втором случае определенную роль сыграло и применение Fe.

Полученные нами результаты по некоторым признакам отличаются от данных других исследователей. Артритогенная доза в наших экспериментах в 4-7 раз выше, чем у других авторов, а признаки артрита появляются на 7-8 день после заражения. Другие исследователи [17] наблюдали появление РеА на 10-20 день после заражения. Поскольку септический артрит обычно начинается на 2-3 день после инфицирования, мы предполагаем, что на 7-8 день уже начинается РеА. Возможно, в самые первые дни после заражения развивается септический процесс в суставах. Как показывают данные других авторов и наши исследования, не удается обнаружить иерсиний в суставах в более поздние сроки после заражения [29], хотя продолжение опухания суставов указывает на возможное присоединение реактивного компонента.

Развитие артритов существенно зависит от применяемой дозы иерсиний, однако большая доза часто связана с высокой летальностью животных. В эксперименте, проведенном на самках, доза микробов 2×10^8 после введения ДФ, вызвала не только большую летальность, но и высокую частоту возникновения артритов [в 1-ой(а) и 2-ой(а) – группах они обнаружены почти у всех оставшихся в живых крыс]. При снижении дозы иерсиний до $1,5 \times 10^8$, уменьшилась гибель животных, однако и артриты развивались также у меньшего числа крыс [40-43% в 1-ой(б) и 2-ой(б) группах].

Аналогичные результаты были получены и в первом эксперименте, где гибель животных при заражении иерсиниями на фоне десферала достигала

45%, а артриты были обнаружены у 90,9% оставшихся в живых крыс.

При помощи повторных заражений удалось умеренно усилить интенсивность РеА и продлить его течение. Появились и новые случаи возникновения артрита у крыс, которым после первой инъекции микробов он не развивался. Так как при повторных заражениях была использована более высокая доза бактерий, можно предполагать, что первичная доза иерсиний для некоторых животных была недостаточной.

Результаты наших экспериментов не исключают возможности, что бактериальный статус организма крыс влияет на развитие РеА. Тот факт, что частота и выраженность опухания суставов зависят от вводимой дозы микробов, а также обостряющий патогенный процесс эффект ДФ, указывают на то, что существуют и другие факторы, играющие важную роль в способности иерсиний вызывать РеА. Выявленная нами зависимость воспроизведения РеА у большего числа животных под действием в/б инъекций ДФ и в/м инъекций Fe, позволяет рассматривать их в числе дополнительных факторов для реализации более выраженного и тяжелого патологического процесса.

Описанная нами экспериментальная модель РеА не связана с антигеном HLA-B27, в то время как 90% иерсиниозного РеА у людей развивается у пациентов с HLA-B27 [20]. Существует мнение, что HLA-B27, модифицируя отношения иммунных клеток с иерсиниями, ухудшает реактивность организма к бактериям [30]. По мнению П.Тойванена [20], существуют различные механизмы развития РеА, связанные и не связанные с HLA-B27. Автор предлагает разделять все РеА на две группы: HLA-B27⁺ и HLA-B27⁻. Очевидно, что для моделирования РеА в эксперименте более целесообразно использовать HLA-B27-трансгенных животных [30], у которых развивающийся патологический процесс лучше отражал бы процессы, происходящие во время РеА у людей.

Выводы

1. Способность *Y. enterocolitica* O:8 вызывать РеА у Lewis крыс зависит от введенной дозы микробов. Артритогенная доза бактерий близка к летальной, и заражение часто сопровождается гибелью значительной части животных.

2. Введение ДФ до заражения крыс иерсиниями ускоряет их гибель, однако как начальная, так и по-

вторные его инъекции сопровождаются обострением и более выраженной продолжительностью опухания суставов, что свидетельствует об увеличении вирулентности и артритогенности *Y. enterocolitica* O:8 под действием экзогенных сидерофоров.

3. Препарат Ferrum Lek, увеличивающий концентрацию свободного Fe в сыворотке крови, не оказывает существенного действия на вирулентность и артритогенность *Y. enterocolitica* O:8.

4. Модель иерсиниозного РеА довольно трудно воспроизвести, так как частота развития артритов варьирует в широком диапазоне, опухание суставов в большинстве случаев довольно слабое и без дополнительного воздействия в течение 2-3 недель постепенно угасает.

5. Повторное заражение иерсиниями с последующим применением ДФ и Fe обостряет признаки артрита и увеличивает его продолжительность, что свидетельствует о важной роли длительного существования патогена в макроорганизме в патогенезе РеА. Однако при реинфекции нельзя исключить тот факт, что повторный, хотя и кратковременный септический процесс в суставах, также может иметь немаловажное значение.

6. В связи с тем, что у крыс отсутствует антиген HLA-B27 и, следовательно, он не играет роли в патогенезе экспериментального иерсиниозного артрита, данная модель не может достаточно точно отражать процессы, происходящие при РеА у людей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yu D. Pathogenesis of reactive arthritis. Intern. Med. 1999; Vol. 38; №.2: 97-101.
2. Toivanen A., Toivanen P. Reactive arthritis. Curr. Opin. Rheumatol. 1997; Vol. 9: 321-7.
3. Агабабова Э.Р. Развитие исследований по проблеме связанных с инфекциями артритов в институте ревматологии РАМН в 70-90-х годах. Вестн. Росс. Акад. Мед. Наук. 1998; №.12: 23-6.
4. Wuorela M., Granfors K. Infectious agents as triggers of reactive arthritis. Am. J. Med. Sci. 1998; Vol. 316; N. 4: 264-70.
5. Autenrieth I.B., Beer M., Bohn E., et al. Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. Infect. Immun. 1994; Vol. 62: 2590-9.
6. Autenrieth I.B., Heesemann J. In vivo neutralization of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* infection in mice. Med. Microbiol. Immunol. 1992; Vol. 181: 333-8.
7. Braun J., Sieper J. Rheumatologic manifestations of gastrointestinal disorders. Curr. Opin. Rheumatol. 1999; Vol. 11; N. 1: 68-74.
8. Бутримене И. Реактивные артриты. Семинары Ревматологии. 1998; №. 1: 56-64.
9. Toivanen A., Toivanen P. Reactive arthritis. Curr. Opin. Rheumatol. 1996; Vol. 8: 334-340.
10. Сидельникова С.М., Ющенко Г.В., Асеева Э.М. Реактивные артриты: терминология, этиология, патогенез. Клиническая медицина. 1996; №.8: 38-40.
11. Van der Heijden I., Res P., Wilbrink B., et al. *Yersinia enterocolitica*: the cause of chronic polyarthritis. Clin. Infect. Dis. 1997; Vol. 25: 831-6.
12. Gripenberg-Lerche C. Experimental yersinia associated arthritis in rats. Effect of environment and bacterial modification. In: Turun Yliopiston Julkaisuja Annales Universitatis Turkuensis. Sarja - Ser. D Osa - Medica - Odontologica. Turun Yliopisto. Turku; 1995; T. 177: 1-48.
13. Сидельникова С.М. Клинико-патогенетические аспекты реактивных артритов при некоторых кишечных и урогенитальных инфекциях. Дис: д-ра мед. наук. М.: 1991.
14. Merilahti-Palo R., Gripenberg-Lerche C., Soderstrom K.O., Toivanen P. Long term follow up of SHR rats with experimental yersinia associated arthritis. Ann. Rheum. Dis. 1992; Vol. 51; N.1: 91-6.
15. Hill J.L., Yu D.T.Y. Development of an experimental animal model for reactive arthritis induced by *Yersinia enterocolitica* infection. Infect. Immun. 1987; Vol. 55: 721-6.
16. Gripenberg-Lerche C., Toivanen P. Variability in the induction of experimental arthritis: *Yersinia* associated arthritis in Lewis rats. Scand. J. Rheum. 1994; Vol. 23: 124-7.
17. Gripenberg-Lerche C., Toivanen P. *Yersinia* associated arthritis in SHR rats: effect of the microbial status of the host. Ann. Rheum. Dis. 1993; Vol. 52: 223-8.
18. Toivanen P., Merilahti-Palo R., Gripenberg C., et al. *Yersinia* associated arthritis in the rat. Experimental model for the human reactive arthritis? Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1986; Vol. 94: 261-9.
19. Granfors K. Persistence of bacteria in HLA-B27 diseases. J.Rheumatol. 1998; Vol. 25; (Suppl 54): 11.
20. Toivanen P., Toivanen A. Two forms of reactive arthritis? Ann. Rheum. Dis. 1999; Vol. 58: 737-41.

21. Weinberg E.D. Iron loading and disease surveillance. *Emerging infectious diseases*. 1999; Vol.5; N. 3: 346-52.
22. Weinberg E.D. Microbial pathogens with impaired ability to acquire host iron. *BioMetals* 2000; Vol. 13: 85-9.
23. Cantinieaux B., Janssens A., Boelaert J.R., et al. Ferritin-associated iron induces neutrophil dysfunction in hemosiderosis. *J. Lab. Clin. Med.* 1999; Vol. 133; N. 4: 353-61.
24. Mavrommati P., Ladis V., Lagona E., et al. ARDS in a patient with homozygous beta-thalassemia due to yersiniosis. *Intensive Care Med.* 1999; N. 25: 226-9.
25. Adamkiewicz T.V., Berkovitch M., Krishnan C., et al. Infection due to yersinia enterocolitica in a series of patients with b-thalassemia: incidence and predisposing factors. *Clin. Infect. Dis.* 1998; Vol. 27: 1362-6.
26. Naktin J., Beavis K.G. Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. *Clin. Lab. Med.* 1999; Vol. 19; N. 3: 64.
27. Fishbane S. Review of issues relating to iron and infection. *Am. J. Kidney Dis.* 1999; Vol. 34; N. 4 (suppl 2): 47-52.
28. Bottone E.J. Yersinia enterocolitica: The Charisma Continues. *Clinical microbiology reviews.* 1997; Vol. 10; N. 2: 257-76.
29. Toivanen P., Toivanen A. Role of micro-organisms in the pathogenesis of arthritis: Lessons from reactive and Lyme arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 1995; Vol. 24 (Suppl. 101): 191-7.
30. Breban M. Animal models and in vitro models for the study of aetiopathogenesis of spondyloarthropathies. *Bailliere's Clinical Rheumatology.* 1998; Vol. 12; N. 4: 611-26.