

Разработка модели хламидийного артрита на крысах

Н. И. Колкова, О. И. Роздина, Е. А. Королева, Е. Д. Федина, Л. А. Шабалина, Е. Ю. Моргунова, Н. А. Зигангирова

ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Цель. Создание и детальная характеристика модели экспериментального хламидийного артрита на крысах.

Материал и методы. В опытах использовали крыс-самцов линии Wistar, которым вводили в суставную полость по 0,15–0,20 мл очищенных элементарных телец *Chlamydophila (Chlamydia) trachomatis* L2/Bu-434 или *Chlamydophila (Chlamydia) muridarum* Nigg. Животные были разделены на две группы – молодые самцы весом 350–380 г и взрослые крысы весом 450–500 г.

Результаты. У крыс, зараженных штаммом Nigg *C. muridarum*, никаких изменений в зараженных суставах не отмечено. У крыс, инфицированных штаммом L2/Bu-434 *C. trachomatis*, уже на следующий день отмечали болевой синдром. У зараженных животных были типичные для артрологической патологии функциональные, морфологические и гистологические изменения. Молодые крысы отвечали на инфек-

цию меньшим отеком и быстрее восстанавливались. У второй возрастной группы животных отмечалась сильная воспалительная реакция, которая выражалась в более значительном увеличении суставов; процесс восстановления шел медленнее, чем у молодых крыс. Было показано, что возбудитель размножается в клетках синовиальной ткани, и пик накопления соответствует клинической картине.

Выводы. Разработанная модель может быть использована для изучения эффективности известных антибактериальных препаратов для лечения осложненной хламидийной инфекции, связанной с поражением суставов. Эта модель необходима для поиска новых антихламидийных препаратов.

Ключевые слова: артрит, крысы, экспериментальная модель, хламидии, культуральный метод, ПЦР.

Development of Chlamydial Arthritis Model in Rats

N. I. Kolkova, O. I. Rozdina, E. A. Korolyova, E. D. Fedina, L. A. Shabalina, E. Yu. Morgunova, N. A. Ziganigirova

Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Objective. To develop and characterize experimental model of chlamydial arthritis in rats.

Material and Methods. Wistar male rats received an intra-articular injection of 0.15–0.20 ml of purified elementary bodies of *Chlamydophila (Chlamydia) trachomatis* L2/Bu-434 or *Chlamydophila (Chlamydia) muridarum* Nigg. Animals were divided into two groups: young rats (body weight: 350–380 g) and adult rats (body weight: 450–500 g).

Results. No changes in the affected joints were observed in rats infected with *C. muridarum* Nigg. In contrast, rats infected with *C. trachomatis* L2/Bu-434 exhibited pain syndrome on the next day after exposure. Infected rats had functional, morphological, and histological changes corresponding to arthritis. Young rats responded to the infection with lesser edema and

Контактный адрес:

Наталья Ивановна Колкова

Эл. почта: kolkova.natalia@yandex.ru

recovered more rapidly. Adult rats had severe inflammatory response with more significant joint enlargement and slower recovery than young rats. The pathogen was shown to grow in synovial tissue cells, and peak accumulation corresponds to clinical presentation.

Conclusions. This model can be successfully used for evaluating efficacy of known antimicrobial agents in the

treatment of chlamydial infection with joint involvement. This model may be useful for a search of new antichlamydial drugs.

Key words: arthritis, rats, experimental model, *Chlamydia*, culture, PCR.

Введение

Иммуновоспалительные заболевания суставов, которые возникают одновременно с инфекционным процессом или вскоре после него, получили название *реактивные артриты* (РеА). До недавнего времени эта болезнь носила имя немецкого врача Рейтера. Термин РеА был предложен финскими учеными К. Аho и Р. Ahvonen в 1969 г. для обозначения артритов, развивающихся после перенесенной иерсиниозной инфекции. В настоящее время предпочтение отдается термину «реактивный артрит» [1–4].

В преобладающем большинстве случаев РеА ассоциируется с острой или персистирующей инфекцией, вызываемой энтеробактериями (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* и *Yersinia*) и с острой или персистирующей урогенитальной инфекцией, вызываемой *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *trachomatis*. Инфекции дыхательных путей, связанные с *Mycoplasma pneumoniae* и, особенно, *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *pneumoniae*, также могут предположительно служить причиной РеА. Случаи РеА, ассоциированные с кишечной инфекцией и инфекцией, вызванной *C. trachomatis*, развиваются преимущественно у генетически предрасположенных лиц. Хламидии, первично обитающие в мочеполовых органах, являются источником суставной патологии, возникающей на фоне генетической предрасположенности у лиц, имеющих HLA-B-27 антиген. В среднем 1–4% больных с наличием инфекционного агента подвержены заболеванию РеА [5–8].

Первые исследования, указавшие на возможную роль хламидий в этиопатогенезе РеА, были проведены еще в 60-е годы прошлого столетия А. Siboulet и Р. Galistin [9], в нашей стране — И.А Жодзишским [10–11]. Они выявили хламидии в соскобах из уретры больных РеА.

Выделение хламидий не только из уретры и конъюнктивы, но и из пораженных суставов больных было достигнуто в 1968 г J. Schachter и соавт. Ими был выделен из коленного сустава штамм 25-Sm *C. trachomatis* [12–13]. В 1973 году А.А. Шаткиным и сотр. из коленных суставов двух больных с диагнозом РеА были выделены два

штамма CP-1 и AP-23 *C. trachomatis* и изучены их биологические свойства. Проведено сравнительное изучение особенностей штаммов, выделенных из суставов больных РеА, штамма *C. trachomatis*, выделенного из урогенитального тракта при РеА, и штаммов, выделенных из конъюнктивы и уретры у больных с хламидийной патологией. Установили, что штаммы *C. trachomatis*, выделенные из суставов при РеА, обладают широким спектром патогенности для лабораторных животных, легко культивируются в культуре клеток, проявляют резистентность к сульфониламидам и вызывают характерные артриты у кроликов [14–18].

Изучение клинических проявлений суставной патологии и общей патологии при артритах, связанных с урогенитальной инфекцией, в том числе и при РеА, было начато в 70-е годы в Институте ревматологии АМН Э.Р. Агабабовой, С.М. Сидельниковой и С.В. Шубиным [19–21].

К настоящему времени показано, что в структуре РеА хламидийные артриты составляют до 80%. Наиболее подверженная заболеванию группа населения — мужчины в возрасте от 20 до 40 лет. Воспалительный процесс в суставах обычно продолжается в течение 3–6 месяцев, но у части больных (20–50%) приобретает хронический характер. Тяжелое нарушение функции суставов возникает у 15% больных. Наиболее тяжелое течение отмечают у ВИЧ-инфицированных [22, 23].

В настоящее время связь хламидий и РеА может быть установлена по выявлению патогенного микроорганизма в мочеполовых путях, суставах, конъюнктиве больного, по серологическим и иммунологическим показателям.

Создание экспериментальной хламидийной модели на лабораторных животных — важный инструмент изучения патогенеза заболевания, необходимый для установления сходства и отличий в патологии человека, вызываемой этими микроорганизмами, и для дальнейшей разработки новых противохламидийных препаратов.

В 1973 году появились сообщения D.E. Smith et al. об экспериментальном хламидийном артрите у новозеландских кроликов и у обезьян *Maca mulatta*. Животных заражали в полость коленно-

го сустава штаммом 25-Sm *C. trachomatis*. У 12 зараженных обезьян первые признаки воспаления сустава обнаруживали через 24–48 часов при средней длительности клинических проявлений артрита до 33 дней. У двух обезьян, умерщвленных на 2-й день после заражения, инфекционный агент был выделен из синовиальной жидкости и синовиальной оболочки пораженного сустава. В последующие сроки до 123-го дня инфекционный агент в суставных тканях выявить не удалось [24].

По данным тех же авторов, внутрисуставное заражение штаммом 25-Sm *C. trachomatis* 48 кроликов привело к возникновению у 47 животных острого локализованного артрита на 1–4-е сутки. Авторы сообщили также, что у 44 из 47 длительно наблюдаемых кроликов артрит принимал хроническое течение, у некоторых из них — до 13 месяцев. Попытки выделения инфицирующего агента показали его присутствие непосредственно в зараженных суставах на 2-й, 17-й и в одном случае на 107-й день.

Важно отметить, что, по данным D. E. Smith et al., артриты у обезьян и кроликов развивались не только при заражении штаммом 25-Sm *C. trachomatis*, но и при использовании лабораторных культур родственных микроорганизмов: возбудителя орнитоза *C. psittaci* (штамм HAV), венерической лимфогранулемы *C. trachomatis* штамм 33 L, штамма *C. trachomatis*, выделенного из уретры больного артритом и простатитом (69 SF). Возбудитель конъюнктивита с включениями *C. trachomatis* (штамм ICCal 3) при прямом введении в коленный сустав обезьянам вызывал артрит, но не сопровождался подобными патологическими проявлениями при введении его кроликам.

Обсуждая результаты изучения патогенности артритного штамма 25-Sm *C. trachomatis* для кроликов, авторы на основании клинической картины и патоморфологических изменений выявили способность изученного микроорганизма вызывать хронический артрит, аналогичный артритам, наблюдаемым у людей при РеА.

В 1980 году Н. И. Щербаковой моделирование хламидийного артрита проводилось на 23 кроликах, которых заражали непосредственно в коленный сустав штаммами CP-1 и AP-23 *C. trachomatis*. У подопытных кроликов уже на 2–5-й день после заражения отмечали первые признаки функциональных и воспалительных изменений инфицированных коленных суставов. Воспалительные явления в зараженных суставах сохранялись в течение 1–3 месяцев, однако даже через 6–13 месяцев наблюдались остаточные формы нарушения движений в коленном суставе. Результаты обнаружения

микроорганизма в синовиальной оболочке и синовиальной жидкости, в коленном суставе кролика были положительными до 18–20-го дня после заражения. Характер патоморфологических изменений, выявляемых в пораженных суставных тканях, вызванных этими штаммами хламидий, напоминал признаки хронических артритов, наблюдаемых у людей, в том числе и при РеА [17, 18, 25, 26].

Ограниченные возможности использования обезьян и кроликов при моделировании хламидийного артрита привели к поиску других модельных систем.

R. D. Inman и В. Chiu смоделировали экспериментальный артрит у взрослых крыс. В работе использовали крыс линии Levis. Животных заражали в коленный сустав серотипом L2 *C. trachomatis*. Предварительно авторы получали перевиваемую линию синовиальных фибробластов из коленных суставов крыс этой линии. Заражали клетки серотипом L2 и, получив зрелые включения, вводили их в дозе 2×10^5 ВОЕ/мл в сустав крысы. Первые признаки воспаления сустава авторы наблюдали через 48 часов. Морфогистологические изменения в зараженных суставах наблюдали до 50-го дня. Возбудитель из зараженного сустава выделяли до 14-го дня с момента заражения. Через три недели возбудитель выделить из сустава не удалось [27].

Сравнивая данные Н. И. Щербаковой, полученные при изучении биологических особенностей штаммов CP-1 и AP-23 *C. trachomatis*, штамма 25-Sm, полученного от J. Schachter (штаммы выделены из суставов больных РеА), с данными D. E. Smith et al., использовавших в своих работах по моделированию штамм 25-Sm *C. trachomatis*, а также возбудителей орнитоза и венерической лимфогранулемы, и работу R. D. Inman и В. Chiu на крысах, следует предположить наличие выраженного суставного тропизма не только у хламидий, выделенных из суставов больных людей, но также и у ряда других биологически родственных представителей порядка *Chlamydiales*. Тем самым, экспериментальное моделирование хламидийного артрита на животных убедительно доказало роль *C. trachomatis* как пускового фактора при данной патологии.

Задачей данной работы явилось создание и детальная характеристика модели экспериментального хламидийного артрита на крысах с целью поиска новых антихламидийных препаратов, эффективных при РеА.

Материал и методы

Культивирование хламидий в культуре клеток. Для получения культур *C. trachomatis* штамма L2/

Bu434 и *C. muridarum* штамма Nigg использовали суточный монослой клеток McCoу, выращенный в культуральных флаконах площадью 25 см². Заражение клеток хламидиями проводили в соотношении бактерия:клетка 1:1 в необходимом объеме транспортной среды (среда DMEM с 5% фетальной сыворотки, 25 мМ раствора глюкозы, 5 мкг/мл амфотерицина, 4 мкг/мл гентамицина, с добавлением циклогексимида 2 мкг/мл). Для стимуляции взаимодействия инфекции с клетками флаконы центрифугировали при 3000 об/мин в течение часа при температуре 25 °С. Затем флаконы помещали в среде СО₂ на 48 ч при 37 °С. Это обеспечивало получение 80–90% инфицированных клеток. Надосадок удаляли, а клетки снимали с помощью стеклянных бус 5 мл сахарозно-фосфатно-глутаминового буфера (SPG), после чего лизировали ультразвуковым дезинтегратором. Очистку *элементарных телец* (ЭТ) проводили путем осаждения детрита клеток при 1000 об/мин с последующим центрифугированием надосадка при 14 000 об/мин в течение 1 часа при 4 °С. Полученный осадок ЭТ суспендировали в 1 мл SHG и хранили при температуре –70 °С.

Заражение животных. В опытах использовали крыс — взрослых самцов линии Wistar, весом от 300 до 500 г Очищенные ЭТ *C. trachomatis* штамм L2/Bu-434 или *C. muridarum* штамм Nigg вводили подопытным животным в суставную полость по 0,1–0,15 мл латерально.

Контролем служили крысы, которым в коленный сустав вводили: 1) препарат, приготовленный из незараженных клеток McCoу по методике, аналогичной выделению ЭТ; 2) ЭТ, инактивированные УФ в течение 30 мин.

Зараженных животных наблюдали ежедневно до 42 дней. Критериями оценки заболевания служили: изменение поведения крыс; воспалительные явления и болезненные проявления в зараженных суставах, определяемые при осмотре; нарушение движения в инфицированных суставах; патоморфологические изменения суставов; выявление хламидий в пораженных тканях сустава, осуществляемое иммуногистохимическим методом, выделением возбудителя культуральным методом и определением ДНК в сыворотке крови методом ПЦР.

Иммуногистохимический метод окраски мазков-отпечатков. Крыс умерщвляли на 3, 6, 7, 9, 10, 20, 30 и 42 дни после заражения. Сустав обрабатывали спиртом, вскрывали скальпелем и ножницами. Раскрывали суставную полость и из тканей пораженных суставов делали мазки-отпечатки на поверхности обезжиренного предметного стекла, подсушивали на воздухе, после чего фиксировали

холодным ацетоном в течение 15 мин. Затем наносили моноклональные меченные ФИТЦ антитела к основному белку наружной мембраны *C. trachomatis* и инкубировали в течение 30 мин во влажной камере при 37 °С. После инкубации стекла тщательно промывали 2 раза раствором ФСБ. Препарат полностью высушивали, монтировали при помощи монтирующей жидкости покровными стеклами и исследовали в люминесцентном микроскопе.

Заражение клеток McCoу соскобным материалом. Для выделения возбудителя культуральным методом с поверхности головок сустава — синовиальной оболочки, синовиальной жидкости и хряща — одноразовыми клеточными щетками брали соскоб, щетки помещали во флаконы с 1 мл транспортной среды (среда DMEM с добавлением 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 25 мМ глюкозы) и помещали в холодильник при –70 °С. Материал, исследуемый на наличие хламидий, перед заражением оттаивали, тщательно пипетировали.

Заражение проводили в 24-луночных стерильных одноразовых планшетах с 24-часовым монослоем клеток McCoу. В каждую лунку вносили по 0,5 мл исследуемого материала. Планшеты центрифугировали (3000 об/мин, 1 час), 2 часа инкубировали в термостате с СО₂, инокулят удаляли, дважды промывали средой DMEM, после чего в лунки добавляли транспортную среду с циклогексимидом из расчета 2 мкг/мл и инкубировали при температуре 37 °С. Оценку результатов проводили через 48 часов при окрашивании мечеными ФИТЦ *C. trachomatis* специфическими моноклональными антителами и просмотре в люминесцентном микроскопе Nikon (окуляры 1.3, объектив ×100).

Выделение ДНК из органов. Для исследования использовали образцы сыворотки крови объемом 1 мл. Проводили лизис при температуре 65 °С в течение 1 часа в 1 мл лизирующего буфера с протеиназой К (ЗАО «Синтол»). Далее выделение ДНК проводили на приборе NucliSens easyMAG (bioMerieux, Франция) в соответствии с протоколом.

ПЦР-РВ. Количественное определение ДНК хламидий в органах проводили с использованием количественного варианта ПЦР-РВ. Использовали набор реагентов для обнаружения ДНК *C. trachomatis* (ЗАО «Синтол»). Для постановки ПЦР-РВ использовали амплификатор АНК-32 и амплификатор CFX96 фирмы Bio-Rad (США).

Статистическую обработку данных и построение графиков осуществляли с использованием программ GraphPad Prizm 4 и Microsoft Office Excel.

Результаты исследования

Создание модели хламидийного артрита проводили на самцах-крысах линии Wistar. Крыс заражали непосредственно в правый коленный сустав.

На первом этапе сравнивали эффективность заражения при использовании двух видов: *C. trachomatis* штамм Вu-434 серотип L2 и *C. muridarum* штамм Nigg.

Крысам весом 350–450 г латерально в коленный сустав вводили суспензию ЭТ *C. trachomatis* в количестве 1×10^6 ВОЕ и *C. muridarum* в количестве 7×10^5 ВОЕ.

Контролем служили крысы, которым в коленный сустав вводили препарат, приготовленный из незараженных клеток McCoу по методике, аналогичной выделению ЭТ.

Крыс наблюдали в течение двух недель. В контрольной группе на протяжении всего опыта изменений в коленных суставах у всех крыс не отмечали: животные оставались активными, зараженные суставы были подвижными, признаков отека не было.

У крыс, зараженных штаммом Nigg *C. muridarum*, так же как и в контрольной группе, никаких изменений отмечено не было: животные были подвижными и активными. Зараженные конечности оставались подвижными, болевого синдрома не было, латеральная ширина зараженных суставов не отличалась от размеров незараженных суставов. В мазках-отпечатках, сделанных из тканей коленных суставов, зараженных штаммом Nigg, на 6-й, 10-й и 13-й день после инфицирования возбудитель не был выявлен.

У крыс, инфицированных штаммом Вu-434 серотип L2 *C. trachomatis*, уже на следующий день отмечали болевой синдром. При пальпации опытного коленного сустава животные отдергивали конечность. В течение первой недели состояние зараженных конечностей с каждым днем заметно ухудшалось. Подвижность конечностей уменьшалась. Объем активных и пассивных движений снижался. Суставы увеличивались в размере. К седьмому дню общее состояние крыс улучшилось, несмотря на хорошо заметные воспаленные суставы. Однако крысы оставались малоактивными и вялыми. У крыс, умерщвленных на 10-й и 13-й дни после заражения, в мазках-отпечатках ткани коленных суставов, инфицированных штаммом L2, выявляли морфологические структуры хламидий (рис. 1).

Дальнейшая работа проводилась на крысах линии Wistar с использованием штамма Вu-434 серотип L2 *C. trachomatis*.

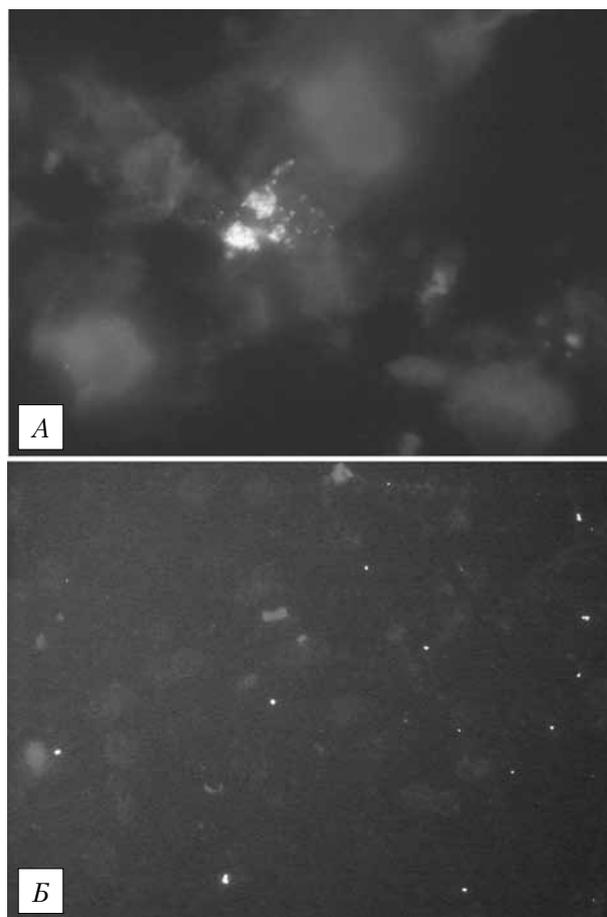


Рис. 1. Морфологические структуры (А) и включения (Б) хламидий в мазках-отпечатках ткани коленных суставов крысы (10-й день после заражения).

В опытах использовали самцов разных возрастных групп: первая группа — молодые самцы весом 350–380 г, вторая группа — взрослые животные весом 450–500 г.

Всем животным вводили в коленный сустав взвесь элементарных телец *C. trachomatis* в количестве 6×10^6 ВОЕ.

Контролем служила взвесь ЭТ штамма Вu-434 серотип L2 *C. trachomatis* в том же количестве, но убитая в течение 30 мин УФ. Оценку сохранения жизнеспособности у убитых хламидий проводили по показателям накопления включений в культуре клеток McCoу. Для этого 24-часовой монослой клеток заражали взвесью убитой культуры по классической методике и оценивали через 48 часов. Включения не были выявлены. Результаты двух последующих слепых пассажей были отрицательными.

В контрольной группе поведение крыс не менялось, они оставались активными. Зараженные суставы были без изменения на протяжении опыта. Гипертермии не отмечалось.

Таблица 1. Результаты рентгенологического исследования суставов крыс (инфицированных и интактных) в разные сроки от начала заражения

День от начала инфекции	Правый сустав (инфицированный)	Левый сустав (интактный)
3-й	 Ø12,0 мм	 Ø8,1 мм
6-й	 Ø11,6 мм	 Ø8,2 мм
9-й	 Ø12,9 мм	 Ø7,9 мм
11-й	 Ø12,1 мм	 Ø7,8 мм
42-й	 Ø мм	 Ø мм
Контроль (заражение инактивированной культурой)		
	 Ø7,8 мм	 Ø7,7 мм

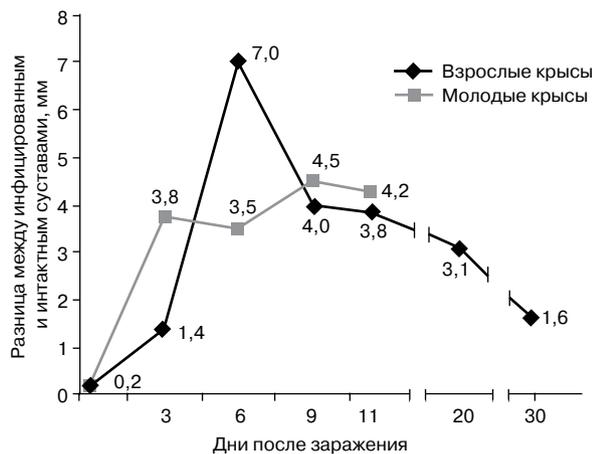


Рис. 2. Динамика изменения размера инфицированных суставов (по дням с момента заражения).

В опыте на следующий день после заражения в обеих группах состояние крыс менялось, они становились менее активными, берегли зараженную лапу, очень осторожно на нее наступали, при пальпации отдергивали лапу. Отмечалась гипертермия. Первую неделю состояние крыс оставалось угнетенным, шерсть была взъерошена, активность низкая. Была нарушена опорная функция зараженной конечности из-за отека и болевой реакции. Животные старались лежать на левом боку, держа инфицированную лапу на весу. Ступня выворачивалась и вытягивалась вдоль тела. Зараженные суставы со второго дня заметно увеличились. Была отмечена гипертермия зараженных суставов. Объем активных и пассивных движений в суставе был снижен.

На третий день после заражения в первой группе (молодые самцы) среднее значение диаметра незараженных суставов составляло 7,7 мм, а у зараженных увеличилось до 11,5 мм, т. е. разница между латеральной шириной зараженных и интактных суставов составляла в среднем 3,8 мм. На 6-й день после заражения инфицированные суставы молодых крыс оставались увеличенными в тех же пределах.

Во второй (возрастной) группе самцов на 3-й день среднее значение диаметра незараженных суставов составляло примерно 9,3 мм, зараженных — 10,7 мм, т. е. разница между латеральной шириной зараженных и незараженных суставов составляла в среднем 1,4 мм. При этом к 6 дню после начала опыта в этой группе разница между латеральной шириной зараженных и незараженных суставов увеличилась в среднем на 7 мм (рис. 2).

С 6-го дня после заражения состояние крыс в обеих группах несколько улучшилось, хотя они оставались малоактивными и апатичны-

ми. Животные пытались наступать на зараженную лапу. К 8-му дню они наступали на зараженную конечность и начали пользоваться пальцами. С 11-го дня крысы стали активными. Однако инфицированные суставы оставались увеличенными. В группе молодых крыс среднее значение диаметра незараженных суставов было 7,8 мм, зараженных — 12,3 мм, т. е. разница между латеральной шириной зараженных и незараженных суставов была 4,5 мм. В этой группе крыс суставы оставались воспаленными до 11 дня.

Как видно из рис. 2, в группе молодых крыс явное воспаление суставов отмечали на 3-й день и наибольшее воспаление приходилось на 9-й день. Но в целом до 11 дня зараженные суставы оставались у всех крыс этой группы воспаленными.

Животных возрастной группы наблюдали до 30 дня. В отличие от первой группы, у этих крыс на 3-й день зараженные суставы были менее воспалены. Пик воспаления суставов пришелся на 6-й день после заражения. С 9-го дня отек начинал спадать, но даже на 30-й день сустав оставался увеличенным.

Рентгенологическое исследование суставов молодых крыс проводили на 3-й, 6-й, 9-й, 11-й и 42-й дни с начала заражения. На рентгеновском снимке (табл. 1) представлены попарно зараженные и незараженные коленные суставы и контрольная пара коленных суставов, инфицированная ЭТ, инактивированными УФ (6-й день с момента заражения).

На рентгеновском снимке в зараженных правых коленных суставах виден отек мягких тканей, максимальный размер которого приходится на 9-й день с момента инфицирования.

На левых неинфицированных коленных суставах, так же как и в контрольной паре суставов, изменений не отмечено, отека не видно, кожа плотно прилегает к поверхности головки сустава.

Заметна нечеткость контуров мышечков. За счет изменений в синовиальной и хрящевой тканях происходит нарушение конгруэнтности, т. е. увеличение расстояния между мышечками бедренной кости и надколенником.

К 42 дню от начала инфекции явные изменения исчезли. Однако можно предположить формирование субхондрального склероза суставных поверхностей правого коленного сустава.

Суставы, вскрытые на 3-й, 6-й, 9-й и 11-й дни после заражения, оценивали визуально. При вскрытии суставов на 3-й день после заражения, в обеих возрастных группах хрящевые головки суставов оставались неизменными, блестящими. Однако окружающие ткани и сухожилия были сильно отечны и гиперемированы.

На 6-й день после заражения у крыс в обеих возрастных группах поверхность хрящевых головок становилась сероватого цвета и была неровной. Между головками сустава выявлялась бесформенная хрящеподобная ткань. На суставе и коже вокруг сустава были отмечены многочисленные очаги гиперемии.

На 9-й день после заражения (срок наибольшего воспаления суставов у молодых крыс) отмечено явление капсуляции. Опухоль вокруг сустава была твердой, разрезалась с хрустом. В обеих группах животных между сероватыми изъеденными хрящевыми головками была зернистая хрящеподобная ткань. У некоторых крыс сустав был багрового цвета, у других гиперемии не было.

На 11-й и 13-й дни после заражения в обеих группах цвет хрящей становился белым, практически нормальным. Но на головках суставов у некоторых крыс оставались небольшие участки гиперемии. На коже вокруг сустава гиперемии не было.

В эти же сроки проводили патоморфологическое исследование пораженных суставов. При микроскопическом исследовании препарата сустава, окрашенного гематоксилином и эозином, просматривалась картина нарушения гистоархитектоники хрящевой ткани, а также нарушенная конгруэнтность суставных поверхностей вследствие их деструктивных изменений (частичного разрушения хрящевой ткани с разрастанием грануляционной ткани). В строме сустава увеличено количество кровеносных сосудов со слабо выраженными периваскулярными инфильтрациями, состоящими из лимфоцитов, макрофагов и небольшого количества плазматических клеток. В зоне сохраненного хряща отмечается также незначительное уменьшение количества хондроцитов со слабо выраженной фрагментацией ядер. Общая картина хрящевых клеток демонстрирует умеренно выраженный полиморфизм. Было установлено, что «выявленные патоморфологические изменения более всего соответствуют ревматоидному артриту».

Наличие хламидийной инфекции в суставе оценивали методом ПИФ при использовании моноклональных антител и методом выделения в культуре клеток. В мазках-отпечатках тканей суставов, взятых у крыс на 3-й и 6-й дни после заражения, выявляли характерные для хламидий включения и морфологические структуры — *элементарные* и *ретикулярные тельца* (ЭТ и РТ). На 9-й и 11-й дни в мазках-отпечатках хламидии не выявляли.

Оценку жизнеспособности хламидий, выделенных из зараженных суставов, проводили культуральным методом. С внутренней поверхности вскрытого зараженного сустава одноразовым ершиком брали соскоб и помещали в 1 мл транспортной среды. Этим материалом заражали 24-часовой монослой клеток McCoу. У первой (молодой) группы крыс материал брали на 3-й, 6-й, 9-й и 11-й день, у второй (возрастной) группы — на 3-й, 6-й, 9-й, 20-й и 30-й дни. У всех крыс первой группы на 3-й, 6-й, и 9-й день в культуре клеток наблюдали рост типичных хламидийных включений. На 11-й день с момента заражения возбудитель не выделялся. У крыс второй группы удалось выделить возбудитель и в более поздние сроки — до 20-го дня (табл. 2).

Была показана генерализация инфекции с выходом в кровеносную систему. Для оценки генерализации инфекции при внутрисуставном заражении на 3-е, 6-е, 9-е, 20-е и 30-е сутки у животных первой и второй групп отбирали сыворотку крови и методом количественной ПЦР определяли наличие ДНК *S. trachomatis*. Результаты показали, что на 6-й день наблюдалась генерализация инфекции в сыворотке крови животных. В первой группе число копий в 1 мл составляло 5×10^4 и во второй — 1×10^4 . При этом в первой и во второй группе ДНК выявляли до 10-го дня примерно в одинаковых количествах (см. табл. 2).

Таким образом, в наших экспериментах мы получили модель артрита при использовании штамма

Таблица 2. Оценка результатов развития инфекции: при культивировании и ПЦР в реальном времени для двух возрастных категорий животных

Дни от начала инфекции	Результаты при инфицировании культуры клеток		Число копий хламидий в 1 мл по результатам ПЦР в реальном времени	
	молодые крысы	взрослые крысы	молодые крысы	взрослые крысы
3-й	+	+	0	0
6-й	+	+	$5 \times 10^3 - 10^4$	10^4
9-й	+	+	$0 - 10^3$	10^3
11-й	—		0	
20-й		+		0
30-й		—		0

Vu-434/L2 *C. trachomatis*. Модель соответствовала типичным для суставной патологии функциональным, морфологическим и гистологическим изменениям. Молодые крысы отвечали на инфекцию меньшим отеком, хотя патоморфологические изменения проходили очень интенсивно. Эти крысы быстрее восстанавливались. У второй (возрастной) группы животных отмечалась сильная воспалительная реакция, которая выражалась более значительным увеличением суставов. Процесс восстановления шел медленнее. На полученной модели мы показали, что возбудитель размножается в клетках синовиальной ткани и пик накопления соответствовал клинической картине. У молодых крыс культураль-

ным методом жизнеспособные хламидии выделяли до 9-го дня, у возрастных животных — до 20-го дня включительно.

Разработанная модель может быть использована для изучения эффективности известных антибактериальных препаратов при лечении осложненной хламидийной инфекции, связанной с поражением суставов. Кроме того, эта модель необходима для поиска новых антихламидийных препаратов. Полученные данные по особенностям течения инфекции позволят оценивать эффективность терапии в данной *in vivo* модели на разных стадиях инфекции и в зависимости от возрастных характеристик.

Литература

- Aho K., Ahvonen P. HL-A 27 in reactive arthritis, a study of *Yersinia arthritis* and Reiter's disease. *Arth Reum* 1974; 17:521-6.
- Kwiatkowska B., Filipowics-Sosnowskam A. Reactive arthritis. *Polskie archiwum medycyny wewnetrznej* 2009; 119:1-2.
- Townes J.M. Reactive arthritis after enteric infections in the United States: The Problem of Definition *Clinical Infectious Diseases*, 2010; 50:247-54.
- Kingsly G., Sieper J. Third international Workshop on Reactive Arthritis: an overview. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:564-70.
- Жолобова Е.С., Чистякова Е.Г., Дагбаева Д.В. Реактивные артриты у детей - диагностика и лечение. Коллоквиум. Ревматология. Лечащий врач #02/07.
- Мазуров В.И. Классификация реактивных артритов. Болезни суставов, Руководство для врача. СПб.: СпецЛит, 2008. - 408 с.
- Appel H. Use of HLA-B-27-tetramers to identify low-frequency antigen-specific T-cells in *Chlamydia*-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:521-34.
- Yu D., Kuipers J.G. Role of bacteria and HLA-B 27 in the pathogenesis of reactive arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003; 29:21-36.
- Siboulet A., Galistin P. Arguments in favour of a virus aetiology of non-gonococcal urethritis illustrated by three cases of Reiter's disease. *Brit J Ven Dis* 1962; 38:209.
- Жодзишский И.А. В кн. Актуальные вопросы теоретической и клинической медицины. Тюмень. 1967; 173-5.
- Жодзишский И.А. Заболевания мочеполовых путей, обусловленные окуло-генитальным хламидозоонозом. *Здравоохранение Казахстана* 1968; (2):56-8.
- Schachter J. Isolation of *Bedsoniae* from human arthritis and abortion tissues. *Am J Ophthalmol* 1967; 63:1082-6.
- Schachter J. Isolation of *Bedsoniae* from the joints of patients with Reiter's syndrome. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122:283.
- Шаткин А.А. и соавт. Изучение этиологической роли гальпровий – микроорганизмов группы ПЛТ при заболеваниях суставов. *Вопросы ревматизма* 1973; (2):9-12.
- Шаткин А.А., Боровик В.З., Сумарокова Н.И. Получение лабораторной культуры гальпровий – микроорганизма группы ПЛТ, выделенной из сустава при синдроме Рейтера. *Вест дерматол и венерол* 1973; (9):47-50.
- Шаткин А.А., Попов В.Л., Щербакова Н.И. Морфология гальпровий (хламидий), выделенных при синдроме Рейтера. *ЖМЭИ* 1976; (5):40-6.
- Щербакова Н.И. К вопросу об этиопатогенетической роли гальпровий (хламидий) при артрологической патологии. «Экология вирусов», Баку, 1976, 246.
- Щербакова Н.И., Шаткин А.А., Агабабова Э.Р. Гальпровии (хламидии) и синдром Рейтера. В сб. Гальпровиозы (хламидиозы) человека и животных. М. 1979; 61-3.
- Агабабова Э.Р., Сидельникова С.М., Шубин С.В. и соавт. Урогенитальная инфекция при болезни Рейтера, ревматоидном артрите и болезни Бехтерева. *Тер архив* 1980; (12):94-8.
- Агабабова Э.Р. Реактивный артрит и синдром Бехтерева. *Ревматические болезни*. Под ред. Насоновой В.А. М. Медицина. 1997, 324-31.
- Агабабова Э.Р., Бунчук Н.В., Шубин С.В. и соавт. Критерии урогенных и энтерогенных реактивных артритов. Проект. Научно-практич ревматология 2003; (3):82-3.
- Sokka T. Reactive Arthritis. *Clinical Guidance from ACP*, 2004.
- Toivanen A., Toivanen P. Reactive arthritis. *Isr Med Assos* 2001; 3:681-5.
- Smith D.E. et al. Experimental bedsonial arthritis. *Arth Rheum* 1973; 16:21.
- Щербакова Н.И. Гальпровии (хламидии) при болезни Рейтера (выделение из суставов и микробиологическая характеристика. Автореф. канд. дисс. М. 1980.
- Дуляпин В.А., Щербакова Н.И. Патоморфология гальпровиального (хламидиального) экспериментального артрита. *РЖ, Общие вопросы патол анатомии* 1972; 76(2):381.
- Inman R.D., Chiu B. Synovocyte-packaged *Chlamydia trachomatis* induces a chronic aseptic arthritis. *J Clin Infect* 1998; 102:1776-82.