



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 152994

(13) U

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2022 02653**

(22) Дата подання заявки: **25.07.2022**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **11.05.2023**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **10.05.2023, Бюл.№ 19**

(72) Винахідник(и):

**Серединська Наталія Миколаївна (UA),
Хавич Ольга Олександрівна (UA),
Карацуба Тетяна Анатоліївна (UA),
Суворова Олександра Сергіївна (UA),
Марченко-Толста Катерина Сергіївна
(UA),
Марченко Олена Миколаївна (UA)**

(73) Володілець (володільці):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН
УКРАЇНИ",
вул. Антона Цедіка, 14, м. Київ, 03680 (UA)**

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ,
КОМОРБІДНОГО З ОНКОПРОЦЕСОМ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання експериментального ревматоїдного артриту, коморбідного з онкопроцесом, що досягається шляхом підшкірного уведення у підшовний апоневроз білих нелінійних щурів повного ад'юванту Фрейнда в об'ємі 0,1 мл та наступного, на четверту добу, перевивання пухлинних клітин саркоми-45 (S-45) в концентрації $1,5 \times 10^6$ в 0,5 мл фізіологічного розчину за підшкірного їхнього введення в область правого боку спини тварини.

UA 152994 U

Корисна модель належить до галузі експериментальної медицини, зокрема фармакології, ревматології, онкофармакології, патофізіології, кардіології, і є способом моделювання експериментального коморбідного стану, за якого ревматоїдний артрит поєднується з онкопроцесом, здійснюється на живому організмі - на білих нелінійних щурах. Він (винахід) стосується способу відтворення онкопроцесу шляхом перевивання експериментальної пухлини (саркома 45-S-45) на тлі експериментального ревматоїдного артрити (AA), індукованого повним ад'ювантом Фрейнда.

Даний спосіб відтворення коморбідного патологічного стану може бути використаний для вивчення ефективності та безпечності оригінальних сполук та медичних препаратів за тривалого застосування, для вивчення взаємодії хворобомодифікуючих та симптоматичних протиревматичних засобів за їхнього комбінованого тривалого застосування з препаратами різних фармакологічних груп (цитостатиками, імуносупресорами синтетичного та біологічного походження, антрацикліновими антибіотиками тощо), що використовуються за онкопатології, для дослідження механізмів дії та побічної дії ліків різних фармакотерапевтичних груп, для вивчення протипухлинної, протиревматичної, протизапальної, імуномодулюючої активності оригінальних сполук та відомих ліків на тлі хронічних патологічних процесів.

Аналогами до пропонованого способу моделювання коморбідного стану є відомі способи моделювання окремих патологічних станів:

- спосіб індукції AA, зазначений вище [1];
- спосіб перевивання експериментальних пухлинних клітин саркома 45 (S-45) [13].

Однією з найчастіше відтворюваних моделей експериментального ревматоїдного артрити є модель ад'ювантного артрити (AA), що індукується підшкірним введенням повного ад'юванту Фрейнда у підшовний апоневроз задньої кінцівки тварини (щура, миші, мурчака, кролика або мавпи) [1-3].

За численними літературними даними, саме модель AA вважають найінформативнішою моделлю для оцінки протизапальної (знеболювальної, антиексудативної) активності фармакологічних засобів на тлі ревматичних захворювань, оскільки саме вона відображає імунні механізми патогенезу ревматоїдного артрити, у тому числі - за експериментальних досліджень, що проводять найчастіше на білих щурах [4-9]. Крім того, саме за відтворення цієї моделі можна вивчати ефективність та безпечність ліків за їхнього тривалого застосування у різні фази розвитку AA.

За AA вирізняються гострий період (7-14 діб від підшкірного введення в плантарний апоневроз повного ад'юванту Фрейнда в об'ємі 0,1 мл, коли спостерігається максимум розвитку місцевої реакції на введення патогенного агента), період генералізації (маніфестації) запалення (від 14-ї доби до 42-ї доби), період згасання запального процесу (до 56-ї - 60-ї доби від індукції AA). Виходячи з цього, зрозуміло, що визначення критеріальних показників, що характеризують ступінь болю, запалення, набряку тощо, необхідно проводити в динаміці у кожний з періодів (фаз) розвитку AA. Крім того, фактично, упродовж усіх фаз розвитку AA потрібна або щоденна, або за відповідними схемами (раз на тиждень, раз на два тижні та ін., у залежності від препарату, що застосовується) фармакологічна корекція порушених органів та функцій організму за допомогою протиревматичних засобів різних фармакологічних груп.

Одним з найвідоміших методів індукції онкопроцесу є перевивання 30 % пухлинною суспензією, яка готується із пухлинної тканини шляхом її подрібнення. Середня тривалість життя тварин за даного способу перевивання експериментальних пухлин складає від 15 до 25 днів [10-12]. Саме тому зазначений та інші відомі методичні підходи до перевивання експериментальних пухлин не дозволяють проводити довготривалі динамічні контрольовані дослідження (до прикладу, вивчення специфічної дії, безпечності ліків на тлі хронічних захворювань, на тлі поєднаної (коморбідної) патології тощо). Тому, свого часу, нами був запропонований новий спосіб перевивання експериментальних пухлин з метою більш уповільненого розвитку експериментального онкопроцесу, що не призводив би до загибелі тварин у зазначені вище терміни, а дозволив би подовжити їхнє життя і, тим самим, збільшити термін дослідження різних функцій систем та стану органів у тварин як за умов патології, так і за тривалого застосування лікарських засобів, чого, зрозуміло, й потребує хронічна патологія, в тому числі - коморбідні стани. Запропонований нами спосіб перевивання пухлинних клітин ґрунтується на здатності контролювати фази росту пухлин (приживлення, логарифмічна та стаціонарна) і досліджувати протипухлинну дію оригінальних сполук та лікарських засобів за тривалого (понад 60 днів) застосування у різні фази росту пухлин на тлі онкопатології та коморбідних станів [2], а також дозволяє уповільнити ріст пухлини і досягти подовження терміну власне онкологічного процесу та терміну життя тварин. Онкопатологія також має фази розвитку - приживлення пухлини, логарифмічна, активного поділу клітин, активації ангіогенезу,

збільшення пухлинної маси, стаціонарна (фаза плато). Тому відповідні показники активності онкопроцесу також повинні визначатися в динаміці упродовж усіх фаз розвитку пухлини.

Найбільш близьких аналогів до пропонованого способу не знайдено.

В основу корисної поставлена задача розробити спосіб моделювання тривалого експериментального коморбідного стану, за якого експериментальний ревматоїдний артрит поєднується з онкопатологією у однієї тварини.

Поставлена задача вирішується шляхом підшкірного уведення у підшовний апоневроз білих нелінійних щурів повного ад'юванту Фрейнда в об'ємі 0,1 мл та наступної, на четверту добу, перевивання пухлинних клітин саркоми-45 (S-45) в концентрації $1,5 \times 10^6$ в 0,5 мл фізіологічного розчину за підшкірного їхнього введення в область правого боку спини тварини.

Спосіб моделювання коморбідного стану має на меті поєднати ад'ювантний артрит та онкопатологію у однієї тварини. Важливими характеристиками коморбідного стану повинні залишатися клінічні прояви у однієї тварини власне АА та ознаки власне онкопатології. Один патологічний стан не повинен нівелювати (усувати), значно послаблювати або значно посилювати ознаки іншого. Водночас, за коморбідного стану можуть несуттєво змінюватися рівні (величини) деяких (окремих) показників відносно таких, що зареєстровані для окремих патологічних станів - АА та онкопатології. Як і окремі патологічні стани, так і коморбідний стан потребує оцінки стану органів та систем, реакцій організму та клінічних ознак. За коморбідного стану не повинно змінюватися функціонування різних органів та систем більш суттєво, ніж за окремих патологій.

Тривалість життя тварин з коморбідним станом повинна перевищувати тривалість життя у тварин лише з онкопатологією та може перевищувати тривалість життя у тварин лише з АА і не повинна бути меншою у більшості (80 %) тварин за тривалість загального запального процесу (60 діб для АА), що характеризується фазністю розвитку (гострий період, фаза генералізації (або маніфестації) запалення, період згасання запального процесу).

Коли на тлі ревматоїдного артриту розвивається онкопатологія, то це потребує тривалого комбінованого застосування протиревматичних засобів та препаратів з протипухлинною активністю за відповідними схемами, а також ліків, здатних корегувати функціонування різних органів та систем. Тому за експериментальної коморбідної патології слід досліджувати (реєструвати та аналізувати) численні показники, що характеризують активність як АА, так і онкопроцесу. Зважаючи на зазначені періоди розвитку окремих патологічних станів, на необхідність тривалої фармакологічної корекції, на клінічні ознаки окремих патологій та загальноновизнані методи оцінки больової та запальної реакцій й активності онкопроцесу, пропонуються не лише спосіб формування коморбідного стану, а й критеріальні показники, що доводять наявність як АА, так і онкопатології у однієї тварини.

Після акліматизації та адаптації тварин (білі нелінійні щури) упродовж 14 діб за звичайного режиму харчування, за умов вільного доступу до їжі та води, були проведені маркування, зважування тварин та рандомізація за групами методом випадкової вибірки. До кожної з чотирьох груп щурів входило по 45 тварин. У тварин 1-ї групи викликали АА, у тварин 2-ї групи - онкопатологію, у тварин 3-ї групи формували коморбідний стан способом. Тварини четвертої групи були інтактними. Середня маса (вихідна) тварин першої та четвертої груп (щури, у яких формували АА та інтактні тварини) була ($166,25 \pm 8,2$ г, $n=90$), до другої та третьої груп віднесено щурів з середньою масою ($130,2 \pm 10,2$; $n=90$) г на початок експерименту.

Експериментальний РА (АА) викликали за підшкірного уведення в підшовну частину задньої кінцівки (лівої) щура (1-ша група тварин) повного ад'юванту Фрейнда в об'ємі 0,1 мл, що, за даними літератури, є одним з найбільш адекватних агентів, здатних відтворювати згаданий патологічний стан, викликаючи імунологічні та структурно-метаболическі порушення, що є типовими для людини [1, 14-16]. Таким чином був відтворений окремий патологічний - АА у кожної тварини 1-ї групи.

Для моделювання онкопатології (2-га група тварин) готували розведення пухлинних клітин саркоми 45 (S-45) для перевивання, як описано у [13]. Шкіру тварин-пухлиноносіїв після евтаназії, що була проведена шляхом передозування ефірного наркозу, обробляли 70 % етиловим спиртом і навколо пухлини робили широкий розріз на шкірі. Пухлину асептично вилущували і поміщали в стерильний 0,9 % розчин натрію хлориду. З пухлини видаляли ділянки тканини без видимих ознак некрозу і промивали стерильним фізіологічним розчином. Потім тканину ретельно подрібнювали стерильними ножицями і готували суспензію, яку відфільтровували через капроновий фільтр. З отриманого фільтрату готували розведення пухлинних клітин саркоми-45 (S-45) $1,5 \times 10^6$ в об'ємі 0,5 мл, і кожній тварині для формування онкопатології вводили пухлинні клітини підшкірно у зоні правого боку спини, попередньо продезінфікувавши місце ін'єкції. Підрахунок пухлинних клітин проводили в камері MMC-SR.

Вибір концентрації пухлинних клітин $1,5 \times 10^6$ для перевивання зумовлений необхідною досягнення, відповідної до різних фаз запалення на тлі АА тривалості життя - понад 60 діб, а також збереженням та розвитком відповідних фаз росту пухлин. За застосування методу перевивання S-45 клітинами в концентрації $1,5 \times 10^6$, спостерігалось збільшення тривалості фази приживлення до 12 днів, логарифмічної фази - понад 15 (до 22) днів, фази плато - понад 22 дні [13].

Таким чином, тривалість життя тварин була подовжена з (25-27) днів до понад 60 днів за перевивання пухлинних клітин у концентрації $1,5 \times 10^6$. Фактично, за перевивання пухлинних клітин S-45 у зазначеній концентрації забезпечується продовження тривалості життя тварин на 60 % [13].

Моделювання коморбідного стану здійснювалося на тваринах 3-ї групи наступним чином: спочатку тваринам вводили повний ад'ювант Фрейнда, як зазначено вище, в об'ємі 0,1 мл, а потім, на четверту добу, проводили підшкірну ін'єкцію пухлинних клітин S-45 у зоні правого боку тварини. Таким чином, кожна тварина отримала 0,1 мл повного ад'юванту Фрейнда та 0,5 мл (кількість клітин - $1,5 \times 10^6$) пухлинних клітин S-45.

Тривале дослідження проводилося для динамічної реєстрації об'єктивних показників, що характеризують наявність як АА, так і онкопатології, а також поєднаної патології у однієї тварини.

Оцінку клінічних проявів за патологічних процесів, в тому числі - за коморбідної патології, проводили за показниками зовнішнього вигляду тварин, рухової активності, змін поведінки, здатності споживати воду та їжу, зоосоціальних відносин, здатності реагувати на зовнішні подразники (звукові, механічні), станом вегетативних функцій.

Оцінку больової реакції здійснювали за динамічної реєстрації порогу больової чутливості (ПБЧ) на анальгезиметрі UgoBasil (Італія) за методом "tail flick" (подразнення проксимальної частини хвоста шляхом фокусування інфрачервоного променя) з відбором для подальших досліджень тварин з вихідним порогом больової чутливості від 4 с до 12 с [17]. Доречно наголосити, що запропонований спосіб моделювання коморбідної патології не перешкоджає застосуванню, фактично, будь-якого іншого валідованого методу реєстрації больової чутливості. Реєстрацію ПБЧ відбувалася у різні фази запального процесу.

Ступінь запалення визначали за величиною набряку стопи, що характеризується зростанням її об'єму. Реєстрацію об'єму (V, у. о.) стопи здійснювали на волюмометрі UgoBasil (Італія) у всі фази запалення (АА).

У тварин з онкопатологією та з коморбідним станом, крім реєстрації ПБЧ, V стопи та клінічних ознак патологічного процесу, проводили визначення об'єму пухлини.

Всі досліджувані показники визначалися до початку моделювання будь-якого патологічного стану (вихідні дані - 0), через 7, 14, 28 діб, (42-49) та через 60 діб від індукції АА. Через те, що моделювання онкопатології на тлі АА здійснювалося на четверту добу, значення показників, що характеризують наявність онкопатології (зокрема, об'єму пухлин), були зареєстровані у різні періоди розвитку АА (гостра фаза, фаза маніфестації (генералізації) запалення, фаза згасання запалення - АА), що збігалось з відповідними термінами від перевивання пухлинних клітин та фазами розвитку онкопатології - через 10, 26, 42 та 56 діб.

Досліди проведено відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), що узгоджується з положенням "Європейської конвенції з захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986 р.) [18].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Дані представлені як середнє арифметичне значення та похибка середнього арифметичного ($M \pm m$). Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично достовірною за значення $p \leq 0,05$.

Результати дослідження. Анонсуєчи спосіб моделювання коморбідної патології, необхідно зазначити, що за умов її розвитку у тварин повинні зберігатися ознаки кожного з двох патологічних станів, що розвиватимуться у однієї тварини. До того, у тварин не повинні суттєво відносно кожного з окремих патологічних станів змінюватися показники функціонування різних органів та систем. У кожної особини повинні проявлятися симптоми кожного із захворювань (кожного з патологічних станів).

Тому результатами власних досліджень ми повинні підтвердити наявність та ступінь клінічних ознак кожної з моделей патології, охарактеризувати (за наявності) характер, спрямованість та ступінь змін у функціонуванні різних органів та систем, визначити критеріальні показники, що доводять наявність і розвиток коморбідної патології, а також обґрунтувати можливість використання запропонованого способу моделювання коморбідного стану для

дослідження численних патогенетичних, фармако- та токсикодинамічних, фармако- та токсикокінетичних особливостей дії препаратів різних фармакологічних груп.

Динаміка змін у функціонуванні різних органів та систем, клінічні симптоми на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА + ОП).

5 За умов розвитку АА, онкопатології та за коморбідного стану упродовж 60 діб після однократного застосування ад'юванту Фрейнда не спостерігалось загибелі тварин.

Первинна запальна реакція за АА характеризувалася почервонінням та набряком у місці введення повного ад'юванту Фрейнда, вона виникала через кілька годин після ін'єкції. Клінічні ознаки місцевого запального процесу посилювалися впродовж перших трьох діб: зростав набряк та гіперемія шкіри, набрякали гомілкові та колінні суглоби і у тварин відмічалася болісність за їхньої пальпації, про що свідчила вокалізація. Шерстний покрив в області суглобів був м'якуватим, на вигляд - зволженим; спостерігався набряк вентральної частини стопи. Уражена кінцівка була менш рухомою, ніж не уражена; у тварин спостерігався щадний режим натиснення на уражену кінцівку за ходи. Первинна реакція за АА характеризувалася ціанозом вухних раковин, носа та появою еритематозних вузликів на вухних раковинах.

15 Запальна реакція розвивалася та посилювалася упродовж гострого періоду запалення - (7-14) доби і характеризувалася, насамперед, системною патологією суглобів. Зміни у суглобах різного ступеня проявлялися фактичному всіх тварин, супроводжувалися набряком ступні, гомілковостопного, колінного суглобів, набряком м'яких тканин стегна, обмеженням рухливості ураженої кінцівки, а також вокалізацією тварини за умов пальпації кінцівки в цілому або будь-якого з суглобів ураженої кінцівки. За АА суглоби набували синюшного кольору, тварини були малорухливими. Генералізований АА, починаючи з 14 доби, супроводжувався запально-дистрофічними змінами суглобів. На 6-му - 7-му тижнях (42-50) доба в усіх тварин розвивався поліартрит, що характеризувався переважною локалізацією у колінних, кульшових та плечових суглобах, з менш вираженим ураженням мілких суглобів. Клінічно відмічалися больова реакція за пальпації суглобів, обмеження рухової активності в них, особливо у задніх кінцівках, зниження м'язового тону та плюскість м'язів упродовж усього терміну спостереження за тваринами з АА.

30 У тварин реєструвалися зростання частоти дихання, його аритмічність (у перші 28 діб спостереження), екзофтальм, птоз, зміна реакції на зовнішні подразники. У жодної тварини з АА не відмічалось тремору, посмикування, судом. Підвищена больова чутливість, що супроводжувалася підвищеною агресивністю та дратівливістю, спостерігалися на тлі АА (табл. 1). Рухова активність тварин помітно знижувалася; уповільнювалися рефлекси та їх інтенсивність, про що свідчили зміни реакцій на звукове та механічне подразнення. Про генералізоване ураження за розвитку АА свідчили й факти щодо змін у функціонуванні ЦНС, серцево-судинної системи, ШКТ. Фактично, суттєвих відмінностей між станом шкіри та шерсті, станом суглобів та м'яких тканин, функціонуванням ЦНС, видільної та дихальної систем, а також змінами у функціонуванні органу зору за АА, за онко- та коморбідної патології не відзначено. За АА відзначався розвиток гіпертензії, починаючи з перших діб після індукції запалення, про що свідчить значне підвищення артеріального тиску на 14,9 % через 14 діб введення ад'юванту Фрейнда та подальше зростання цього показника, навіть у період згасання АА - через (56-60) діб на (30-37,3) % (див. табл. 1).

45 На фоні розвитку онкопатології у тварин реєструвалось зростання артеріального тиску на (18-23) % через (14-28) діб, що було вірогідно значимим до вихідних даних, що становили $(98,45 \pm 2,47)$ мм рт. ст. Суттєве підвищення артеріального тиску на 44,9 % і 50,2 % відзначалося через 49 діб та через (56-60) діб відповідно за онкопатологією, причому значення на (56-60) доби спостереження було достовірно вищим відносно значень у тварин з АА.

50 Коморбідний стан характеризувався значним підвищенням артеріального тиску, за ступенем аналогічним до такого, що реєструвався у тварин лише з онкопатологією у всі терміни спостереження. На 60 добу (період згасання власне АА) артеріальний тиск був на рівні значень у тварин з онкопатологією і дещо вищим (як і за самостійного патологічного стану - онкопатологія) порівняно до значень у щурів з самостійним АА. Фактично, за коморбідного стану не відбувається більш суттєвої негативної зміни артеріального тиску, ніж за окремих патологічних станів - за АА та за онкопатології.

55 На тлі АА у гострий період у щурів відзначалося підвищення частоти серцевих скорочень (ЧСС) майже на (6-9) % від вихідного значення, що становило $(367,8 \pm 6,07)$ уд/хв. В подальші терміни спостереження (до 42 доби) ЧСС у щурів була аналогічною до вихідних даних. Суттєве зниження ЧСС відносно даних у гострий період АА необхідно відмітити через 60 діб від індукції запалення (див. табл. 1). На фоні онкопатології та коморбідного стану не спостерігалось суттєвих та закономірних змін ЧСС.

- Отримані результати щодо змін критеріальних показників функціонування серцево-судинної системи свідчать про зміни артеріального тиску, як і частоти серцевих скорочень, за умов коморбідного стану аналогічні, фактично, у всі періоди спостереження до таких, що реєструються за окремих патології - АА та за онкопатології. Отже, АА, асоційований з онкопатологією, не призводить до більш суттєвих негативних, статистично достовірних змін у функціонуванні серцево-судинної системи, ніж самостійний АА та онкопатологія.

Таблиця 1

Динаміка змін у функціонуванні органів та систем за наявністю (%) клінічних симптомів на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Клінічні симптоми	Час спостереження, доба				
	7	14	28	42	56-60
1	2	3	4	5	6
Стан шкіри та шерсті					
Патологічні стани - АА та (АА + ОП)					
Наявність виразок на ступні (%)	-#	-	33,3	44,5	15,6
Еритематоз вушних раковин (%)	2,5	2,5	-	-	-
Еритематоз хвоста та інших органів	-	-	-	-	-
Ціаноз вушних раковин, носа (%)	99	80	6	-	-
Згущування епідермального шару шкіри на стопі (%)	-	-	11,4	-	-
ОП					
Наявність виразок на ступні	-	-	-	-	-
Еритематоз вушних раковин	-	-	-	-	-
Еритематоз хвоста та інших органів	-	-	-	-	-
Ціаноз вушних раковин, носа	-	-	-	-	-
Стан серцево-судинної системи					
АА					
Артеріальний тиск, мм рт.ст.	95,67±2,75 -2,7	113,07±2,23* +14,9	128,5± 5,82* +30,7	132,0±6,04* +34,2	135,0±6,71* +37,3
Частота серцевих скорочень, уд/хв	396,0±10,31* +8,4	386,8±7,2 +6,0	368,2±5,73 +0,7	360,0±6,78 -2,5	354,1±6,40 -2,5
ОП					
Артеріальний тиск, мм рт.ст.	104,67±1,87 +6,08	113,67±2,04* +15,2	121,50±3,58* +23,1	143,0±7,80* +44,9	158,25±5,21** +50,2
Частота серцевих скорочень, уд/хв	393,3±6,08 +7,1	390,3±7,44 +6,3	352,0±5,54 -4,2	362,0±2,0 -1,4	365,0±8,41 -0,6
АА + ОП					
Артеріальний тиск, мм рт.ст.	97,86±2,21 +2,7	114,29±4,35* +19,9	119,44±8,01* +25,3	140,0±6,77* +46,9	155,0±2,04** +62,6
Частота серцевих скорочень, уд/хв	366,4±8,09 +2,2	377,9±10,85 +5,4	363,3±10,54 +1,3	361,3±21,63 +0,8	355,0±11,90 -0,8
Стан суглобів та м'яких тканин					
Патологічні стани - АА та (АА + ОП)					
Набряк вентральної частини ступні (%)	2,2	-	2,2	20,5	15,8
Набряк ступні (%)	97,8	100,0	91,4	72,7	73,7

Таблиця 1

Динаміка змін у функціонуванні органів та систем за наявності (%) клінічних симптомів на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Клінічні симптоми	Час спостереження, доба				
	7	14	28	42	56-60
1	2	3	4	5	6
Набряк гомілковостопного суглобу (%)		20		6,8	
Набряк колінного суглобу (%)	33,3	33,3	28,6	36,4	63,1
Набряк м'яких тканин стегна (%)	-	-	-	4,6	15,8
Обмеження рухливості ураженої кінцівки (%)	88,9	100,0	100,0	84,5	77,8
Болісність(вокалізація за пальпації) (%)	100,0	100,0	88,9	77,8	66,7
Ціаноз ураженої кінцівки (%)	0,0	51,1	60,0	60,0	28,9
Стан ЦНС					
Патологічні стани - АА, ОП та (АА + ОП)					
Рухова активність тварин (%)	↓100,0	↓100,0	77,8	40,0	28,9
Наявність та зміна (4Т) рефлексів	↓51,1	↓51,1	↓40,0	↓40,0	↓40,0
Судоми	-	-	-	-	-
Стан шлунково-кишкового тракту					
АА					
Гіперемія слизової оболонки шлунка (%)	80,0	40,0-50,0	60,0	100,0	36,0
Наявність набряку (%)	10	20,0	20,0	50,0	50,0
Наявність ерозій та виразок (%)	-	-	10,0	10,0	0
ОП					
Гіперемія слизової оболонки шлунка(%)	10,0	20,0	40,0	40,0	50,0
Наявність набряку (%)	20,0	60,0	90,0	80,0	80,0
Наявність ерозій та виразок (%)	30,0	30,0	60,0	60,0	60,0
АА + ОП					
Гіперемія слизової оболонки шлунка(%)	50,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Наявність набряку (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Наявність ерозій та виразок (%)	0	0	0	0	0
Стан видільної системи					
Патологічний стан - АА, ОП та (АА + ОП)					
Характеристика сечі (колір, прозорість, кількість, мл)	10,0 % (прозора, солом'яного кольору); 25,0 % (темно-руда)	30,0 % (темно-руда)	10,0 % (темно-руда)	-	-
Система дихання					
Патологічні стани - АА, ОП та (АА + ОП)					
Зміна (Ц) частоти (%)	↑100,0	↑100,0	-	-	-
Глибина, ритм	Поверхнєве, неритмічне	Поверхнєве, неритмічне	-	-	-

Таблиця 1

Динаміка змін у функціонуванні органів та систем за наявності (%) клінічних симптомів на тлі ад'ювантного артриту (AA), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (AA+ОП)

Клінічні симптоми	Час спостереження, доба				
	7	14	28	42	56-60
1	2	3	4	5	6
Офтальмологічні показники					
Патологічні стани - AA та (AA + ОП)					
Екзофтальм (%)	-	20,0	-	-	-
Лакримация (%)	-	15,6	-	-	-
Кон'юнктивіт (%)	-	-	10,0	-	-

Примітки: 1.[#] - відсутність симптому. 2. * - $p < 0,05$ відносно вихідних даних. 3. ^{*} - $p < 0,05$ відносно даних у тварин з AA на відповідний термін спостереження.

Суттєві ураження слизової оболонки шлунка (СОШ) за AA характеризувалися її гіперемією, набряком та появою ерозій і виразок, особливо, у гострий період та період маніфестації AA. Дані табл. 1 свідчать, що у більшості щурів з AA відмічалися гіперемія та набряк СОШ упродовж усього терміну спостереження; у деяких тварин спостерігалися крапкові крововиливи протягом 28 діб після введення повного ад'юванту Фрейнда. На 14 добу спостереження та на початку періоду маніфестації запального процесу відзначалися поодинокі випадки наявності виразок невеликих розмірів. Набряк СОШ, в т. ч. за рахунок набухання крипт, збільшувався у період згасання патологічного процесу (AA).

Ураження СОШ спостерігалось за розвитку онкопатології і характеризувалося гіперемією, що посилювалася з часом розвитку патології, суттєвим набряком слизової оболонки та крипт, а також появою виразок та ерозій вже у гострий період запалення. У щурів з коморбідним (AA + ОП) станом реєструвалася гіперемія та сильний набряк СОШ у всіх щурів даної групи, однак у жодної тварини не зареєстровано виразок (див. табл. 1).

Реєструвався фізіологічний приріст маси тіла в інтактних тварин впродовж періоду спостереження. На тлі AA у щурів спостерігався приріст маси тіла, що вірогідно перевищував фізіологічний, що відзначався в інтактних щурів (табл. 2), від початку періоду згасання запального процесу. Маса тіла у тварин з AA зростала на (51,8-57,2) % через (42-60) діб від індукції AA, тоді як в інтактних тварин у цей же термін спостереження - на (38,3-41,8) %.

Суттєвий приріст маси тіла спостерігався у тварин з онкопатологією, про що свідчило зростання даного показника на (25,7-78,8) %, починаючи з 14 доби від введення повного ад'юванту Фрейнда (10-та доба від перевивання пухлини S-45). Вочевидь, даний факт зумовлений ростом пухлини, збільшення її маси та об'єму, а не власне зростанням маси тіла тварини.

За коморбідного стану у період гострого періоду запального процесу спостерігався значно менший приріст маси тіла на (2,3-7,3) % порівняно до інтактних тварин, у яких даний показник зростав на (9-12,4) %. Починаючи з 42 доби на тлі коморбідного стану до кінця терміну спостереження реєструвалося значне пригнічення приросту маси тіла тварин (на 20 % відносно значень в інтактних тварин), не зважаючи на збільшення пухлин, що зумовлено, вірогідно, загальним запальним процесом, спричиненим і AA, і онкопроцесом. Особливої уваги заслуговує той факт, що на тлі асоційованого патологічного стану запального генезу упродовж 14 діб відбувалося значне пригнічення приросту маси тіла (у понад три рази) відносно значень у тварин лише з онкопатологією, про що свідчило зростання маси тіла відносно значення у тварин з онкопатологією на 25,6 %, тоді як у тварин з асоційованою патологією маса тіла зростала лише на 7 % (див. табл. 2). Значне пригнічення приросту маси тіла у тварин з коморбідним станом спостерігалось відносно значень у тварин як лише з онкопатологією, так і лише з AA в подальші терміни спостереження (до 60-ї доби). Зважаючи на суттєве пригнічення приросту маси тіла тварин на фоні коморбідного стану, на клінічні симптоми окремих патологічних станів, що можуть супроводжуватися змінами апетиту та/або метаболізму їжі, вочевидь, можливе застосування моделі коморбідного стану, що пропонується, для проведення дослідження ефективності препаратів, що впливають на апетит (до прикладу - проти анорексичних). Зрозуміло, що дане передбачення потребує додаткового дослідження.

Таблиця 2

Маса тіла ($M \pm m$, г) та її приріст (Δ) у тварин з ад'ювантним артритом (АА), з онкопатологією (ОП) та з коморбідним станом (АА+ОП)

Група тварин, показник	Термін спостереження, доба					
	Вихідні дані	7	14	28	42-49	56-60
Інтактні	163,4±5,5	178,4±7,5	183,6±4,8*	195,0±5,5*	226,0±6,1*	231,7±9,0*
Δ	-	15,0	20,2	31,6	62,6	68,3
% змін	-	9	12,4	19,3	38,3	41,8
ОП (аналог)	134,0±1,49	151,9±1,68	168,5±2,86*	185,1±4,03*	212,6±6,77*	239,6±6,47*
Δ	-	17,9	34,5	51,1	78,6	105,6
% змін	-	13	25,7	38	58,7	78,8
АА (аналог)	135,0±3,58	148,5±4,07*	152,5±4,3*#	185,9±4,27*	205±4,08*	212,2±4,21*
Δ	-	13,5	17,53	50,9	70,0	77,2
% змін	-	10	13	37,7	51,8	57,2
АА+ОП	140,6±3,00	143,9±3,46#	150,8±3,98#	165,8±4,01*#	180,8±8,17*#	183,5±7,7*#
Δ	-	3,3	10,2	25,2	40,2	42,9
% змін	-	2,3	7,3	17,9	28,8	30,5

Примітки: 1. *- $p < 0,05$ на відповідний термін відносно вихідних даних у тварин даної групи.
2. "- $p < 0,05$ на відповідний термін відносно даних у інтактних тварин.

Зміни коефіцієнтів маси майже всіх органів у тварин не мали односпрямованого закономірного характеру (табл. 3). Водночас, за АА відзначалося зростання коефіцієнту маси печінки у гострий період розвитку запалення та зниження цього показника у періоди його маніфестації та згасання (табл. 3). На тлі АА спостерігалось суттєве зростання коефіцієнта маси шлунка у різні фази запалення порівняно до значення в інтактних тварин - на (8-9) % Можна припустити, що масовий коефіцієнт шлунка у щурів з АА через набряк слизової оболонки.

Таблиця 3

Коефіцієнти маси внутрішніх органів ($M \pm m$, мг) у білих щурів на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Орган	Термін спостереження, доба		
	14	28	56-60
1	2	3	4
Інтактні тварини			
Серце	0,27±0,004	0,30±0,01	0,28±0,01
Легені	0,69±0,11	0,63±0,06	0,63±0,01
Печінка	3,63±0,18	3,90±0,08	3,89±0,23
Селезінка	0,24±0,002	0,29±0,02	0,22±0,02
Нирки	0,71±0,03	0,74±0,07	0,65±0,02
Наднирники	0,02±0,002	0,03±0,002	0,21±0,002
Тимус	0,19±0,01	0,18±0,01	0,13±0,02
Шлунок	0,66±0,04	0,66±0,01	0,66±0,01
АА			
Серце	0,29±0,01	0,28±0,01	0,24±0,01
Легені	0,87±0,07	0,86±0,11	0,55±0,03
Печінка	4,58±0,26*	3,14±0,10*	2,46±0,21*
Селезінка	0,29±0,02*	0,25±0,02	0,25±0,01
Нирки	0,72±0,02	0,60±0,03	0,56±0,01
Наднирники	0,03±0,003	0,03±0,003	0,03±0,002
Тимус	0,23±0,05	0,19±0,02	0,17±0,05
Шлунок	0,71±0,04*	0,72±0,04*	0,71±0,03*

Таблиця 3

Коефіцієнти маси внутрішніх органів ($M \pm m$, мг) у білих щурів на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Орган	Термін спостереження, доба		
	14	28	56-60
1	2	3	4
ОП			
Серце	0,33±0,01*	0,31±0,03	0,28±0,01
Легені	0,76±0,12	0,72±0,10	0,67±0,06
Печінка	4,36±0,12*	4,46±0,17*	2,89±0,03*
Селезінка	0,29±0,01*	0,49±0,04*	0,22±0,03
Нирки	0,78±0,02	0,64±0,01	0,64±0,003
Надирники	0,04±0,002*	0,04±0,003	0,03±0,002
Тимус	0,34±0,01* ' '	0,13±0,01*	0,21±0,04
Шлунок	0,89±0,015*	0,74±0,04	0,69±0,05
АА + ОП			
Серце	0,31±0,01*	0,27±0,01	0,27±0,01
Легені	0,82±0,07	0,76±0,06	0,55±0,04
Печінка	3,06±0,15*	4,3±0,22	3,83±0,12
Селезінка	0,37±0,06	0,52±0,06*	-
Нирки	0,66±0,03	0,64±0,01	0,65±0,01
Надирники	0,04±0,003*	0,05±0,01	0,04±0,012
Тимус	0,16±0,03	0,13±0,001*	0,19±0,02*
Шлунок	0,76±0,04*	0,65±0,0	0,65±0,03

Примітка. * - $p < 0,05$ порівняно до значення в інтактних тварин.

За онкопатології відзначалися зміни коефіцієнтів маси досліджуваних органів у гостру фазу після перевивання пухлинних клітин (14 доба), за виключенням легень та нирок.

Зростання коефіцієнту маси печінки за онкопатології реєструвалося й у період маніфестації запалення, а у період (56-60) діб спостерігалось різке зниження цього показника. Суттєве зростання коефіцієнта маси шлунка відзначено у тварин з онкопатологією упродовж 28 діб спостереження.

За коморбідного стану відзначається зростання порівняно до інтактних щурів відносної маси серця та надирників і зменшення - печінки. За поєднаної патології (АА+ОП) реєструвалося зростання коефіцієнта маси шлунка на 15 % лише у гострий період АА. Однак, коефіцієнти маси усіх органів у тварин з коморбідним станом та у тварин з окремими патологічними станами суттєво не відрізнялися. Тобто, не виникало більш значних відмінностей між коефіцієнтами маси органів за самостійних патологічних станів (аналоги) та за розвитку коморбідної патології.

Необхідно звернути увагу на масовий коефіцієнт органу, що відповідальний за імунний статус - тимусу, зважаючи на те, що АА нині вважають автоімунним процесом, а за онкопатології, як відомо, також відзначаються суттєві зміни в імунному статусі. На тлі АА зареєстровані зміни масового коефіцієнта тимусу (табл. 4). За АА реєструвалося суттєве зростання коефіцієнта маси тимусу (КМТ) впродовж 42 діб спостереження на (92-116) %, а в подальші терміни спостереження, коли, фактично, й відбувається згасання патологічного процесу, викликаного однократним введенням патогенного агента (повного ад'юванту Фрейнда), КМТ знижувався.

Таблиця 4

Коефіцієнт маси тимусу ($M \pm m$, мг) на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Група	вихідні дані	Термін спостереження, доба				60
		7	14	28	42-49	
Інтактні тварини	0,12±0,01	0,14±0,009	0,14±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01	0,125±0,02
АА	0,12±0,01	0,14±0,019	0,23±0,04*	0,26±0,021*	0,24±0,027*	0,15±0,016
ОП	0,12±0,01	0,19±0,019*	0,34±0,01*#	0,15±0,012*#	0,15±0,02*#	0,21±0,04*
АА + ОП	0,12±0,01	0,15±0,012	0,16±0,03*#	0,13±0,01#	0,14±0,01#	0,19±0,02*

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ порівняно до вихідного значення. 2. # - $p < 0,05$ порівняно до групи тварин з АА та з онкопатологією (аналог).

До суттєвого зростання КМТ на 183 % на 14 добу від перевивання пухлинних клітин призводила онкопатологія, а в подальші терміни спостереження КМТ залишався збільшеним на 25 % від вихідного значення.

Порівнюючи значення КМТ за АА та за ОП, можна констатувати, що більш значущі зміни через 14 діб викликає онкопатологія. На 28 добу зареєстровані більш значущі зміни КМТ за АА. Але навіть через 60 діб від індукції запалення КМТ залишався підвищеним від вихідного значення на 25 % на тлі АА і на 75 % за онкопатології. Суттєве зростання КМТ на 33 % і на 58 % від вихідного значення реєструвалося через 14 діб і 60 діб відповідно від початку коморбідної патології.

Таким чином, на тлі коморбідного стану не реєструється більш значного зростання КМТ, ніж за окремих патологічних станів, що може бути його (коморбідного стану) додатковою характеристикою як імунодепресивного та/або аутоімунного процесу.

Ознаки, що характеризують наявність коморбідної патології (АА+ОП)

Пропонований спосіб моделювання коморбідного стану базується на поєднанні двох патологічних станів у однієї тварини, серед яких - експериментальний РА (ад'ювантний артрит) та онкопатологія. Як відомо, ад'ювантний артрит проявляється виразним запальним процесом, що характеризується, зокрема, больовою реакцією та набряком. Ці клінічні прояви ад'ювантного артриту визначаються досить швидко як візуально (суб'єктивна оцінка дослідника), так і кількісно за застосування простих у використанні приладів. Модель онкопатології характеризується наявністю, розвитком пухлини та її об'ємом, що також визначаються як візуально, так і за допомогою приладу (для виміру об'єму). Тому ознаками (клінічними проявами) коморбідного стану повинні бути ступінь больової та запальної реакції і наявність пухлини та зміна її об'єму. Зазначені клінічні прояви можуть визначатися при життєво, що дозволяє відслідковувати тривалість життя та ефективність та безпечність ліків за тривалого застосування. Звідси - критеріальні показники коморбідного стану, що повинні обов'язково при життєво визначатися за пропонованого способу його відтворення: поріг больової чутливості, ступінь набряку (об'єм ураженої стопи), наявність та об'єм пухлини.

Додатковими показниками, що характеризуватимуть розвиток коморбідної патології можуть бути ступінь ексудативних процесів, активність медіаторів запалення, цитокіновий профіль, маса пухлини, дані патоморфологічних досліджень (різні органи, в т. ч. - пухлинні клітини, процеси ангиогенезу тощо), маркерні ферменти запалення та численні інші.

Дослідження больової чутливості у тварин на тлі коморбідного стану та на тлі окремих патологічних станів (аналоги). В інтактних тварин не спостерігалось суттєвих змін ПБЧ. Деяке зростання зазначеного показника, вочевидь, зумовлено звиканням тварин до процедури реєстрації та до дослідника. Від початку розвитку АА зростала больова чутливість у тварин, про що свідчило зниження ПБЧ у щурів, починаючи з перших діб після ураження. Зазначений показник у гострий період АА - (7-14) доба - знижувався на (56,1-62,6) % порівняно до вихідного значення та значень у інтактних тварин (табл. 5). Суттєве зниження ПБЧ спостерігалось впродовж маніфестації АА - (28-49) доба, коли він був на (37-40) % нижчим за вихідні значення.

Отримані факти, зрозуміло, свідчать про зростання больової чутливості у білих щурів на тлі АА. Відновлення значення ПБЧ відбувалося за згасання патологічного процесу - на 60-у добу від початку дослідження.

Таблиця 5

Динаміка порогу больової чутливості ($M \pm m$, с) та ступінь його зміни (%) у щурів на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Група	Термін спостереження, доба					
	Вих. дані	7	14	28	42-49	56-60
Інтактні	8,77 $\pm$ 0,34	8,87 $\pm$ 0,41	8,80 $\pm$ 0,43	9,0 $\pm$ 0,39	8,90 $\pm$ 0,31	8,92 $\pm$ 0,42
АА, % до вих.	9,07 $\pm$ 0,23	3,9 $\pm$ 0,02*	3,39 $\pm$ 0,5*	5,5 $\pm$ 0,7*	5,7 $\pm$ 0,5*	8,9 $\pm$ 0,6*
	-	-56,1	-62,6	-39,7	-37,0	-1,9
ОП, % до вих.	9,41 $\pm$ 0,27	9,5 $\pm$ 0,88*#	9,01 $\pm$ 0,34**	10,3 $\pm$ 0,79*	10,70 $\pm$ 0,97**	11,6 $\pm$ 0,63**
	-	+0,96	-4,3	+9,5	+13,7	+23,3
АА+ОП, % до вих. % до АА	9,42 $\pm$ 0,64	10,3 $\pm$ 0,88*	9,97 $\pm$ 0,44*	10,4 $\pm$ 1,36*	10,5 $\pm$ 0,95*	11,7 $\pm$ 0,67**
	-	+9,3	+5,8	+10,4	+11,5	+24,2
	-	+164,0*	+194,0*	+89,1*	+84,2*	+31,5*

Примітки: 1. * - $p < 0,05$ відносно вихідного значення у тварин даної групи. 2. # - $p < 0,05$ відносно значення у тварин з АА.

За онкопатології реєструвався ПБЧ, що перевищував вихідні значення на (9-13,7)% у різні терміни спостереження, і на 23,3 % через (56-60) доби від індукції запалення. Ці значення суттєво перевищували рівень ПБЧ за АА і свідчили про менш виразне сприйняття больового відчуття у щурів з онкопатологією. Як зазначалося вище, тварини з онкопатологією відрізнялися апатичним станом, зниженою руховою активністю (адинамія), пригніченням реакцій на зовнішні подразники, що пов'язано з функціонування ЦНС. Можливо, зазначений рівень больового відчуття, що спричинений подразненням периферичних ноцицепторів, зумовлений саме апатичним, адинамічним станом і, власне, пригніченням ЦНС.

На тлі коморбідного стану також реєструвалося зростання ПБЧ відносно вихідних значень у щурів упродовж усього періоду спостереження, особливо значуще, але, фактично, рівнозначне до ПБЧ у щурів лише з онкопатологією, наприкінці дослідження - (56-60) доба - на 24,2 %. Даний результат може бути свідченням зниження больової чутливості, що зумовлена саме онкопроцесом, а також усвідомленням необхідності з'ясування питань щодо стану ноцицептивних реакцій у тварин на тлі лише онкопатології. Тому, дослідження протибольової активності препаратів на тлі запропонованої моделі коморбідного стану необхідно проводити з урахуванням ступеня больового відчуття у тварин як на тлі самостійних патологічних процесів, так і на фоні асоційованої патології.

Тобто, для оцінки знеболювальної дії сполук (ліків) на тлі коморбідного стану необхідне формування трьох контрольних груп (негативний контроль) - контроль на АА, на онкопатологію та на коморбідний стан, а також проведення порівняльної оцінки рівня ПБЧ у тварин дослідної групи зі значеннями у тварин усіх контрольних груп. Такі модельні патологічні стани як онкопатологія (аналог) та коморбідна патологія дозволять науковцям-експериментаторам, крім вивчення ефективності та безпечності ліків та оригінальних сполук, досліджувати механізми розвитку хвороб, використовуючи запропонований спосіб моделювання коморбідного стану. Отримані результати щодо підвищення ПБЧ у щурів за онкопатології та за онкопатології, що розвивалася на тлі АА, передбачає доцільність дослідження центральних механізмів болю на тлі коморбідного стану.

Дослідження запальної реакції за показником набряку стопи у тварин на тлі коморбідного стану та на тлі окремих патологічних станів (аналоги). Найбільш маніфестною ознакою початку розвитку АА у щурів є набряк ураженої кінцівки. Поява набряку пояснюється запаленням синовіальної оболонки та збільшенням кількості синовіальної рідини, що зумовлено гіперактивацією окремих компонентів імунної системи *in situ*. В інтактних тварин зареєстровані фізіологічні зміни об'єму стопи щурів, що пояснюються зростанням органів з віком упродовж, фактично, восьмижильного дослідження (табл. 6).

За умов власне АА реєструвалося суттєве зростання об'єму ушкодженої стопи у щурів, починаючи з 1-ї доби після індукції запалення. На 7 добу об'єм стопи, визначений в у.о., зріс у тварин з АА на 79 % відносно цього показника, притаманного інтактним тваринам, і залишався суттєво більшим упродовж усього терміну спостереження. Навіть у період згасання патологічного процесу (60 доба) об'єм стопи у щурів з АА був значно більшим, ніж у інтактних тварин (див. табл. 6).

За онкопроцесу спостерігався приріст об'єму стопи дещо вищий за фізіологічний (порівняно до інтактних тварин), але значно нижчий, ніж у тварин з АА. На (56-60) добу спостереження приріст об'єму стопи у щурів з онкопатологією відповідав такому, що реєструвався в інтактних тварин.

- 5 Коморбідний стан характеризувався, зокрема, суттєвим зростанням об'єму стопи у щурів, що перевищував такий і в інтактних тварин, і в щурів з онкопатологією. Більш суттєве зростання об'єму стопи (на 32,2 %) реєструвалося у тварин з поєднаною патологією порівняно до даного показника у тварин з АА через 7 діб після введення повного ад'юванту Фрейнда. Надалі, до 49 доби, спостерігалися аналогічні зміни показника до таких, що реєструвалися у тварин з АА.
- 10 Через (56-60) діб від індукції запалення на тлі коморбідного стану було зареєстроване значуще (на 19, 6 %), порівняно до тварин тільки з АА, зниження об'єму. Загалом, на тлі коморбідного стану відзначалося значуще зростання, порівняно до вихідного значення, об'єму стопи у тварин у гострий період запалення - на (151-194,8) %, у період маніфестації АА та розвитку онкопатології (до 49 доби) - на (128,1-163,5) %, а через (56-60) діб від введення повного ад'юванту Фрейнда - на 101 %.
- 15

Таблиця 6

Зміни об'єму стопи у щурів ($M \pm m$, у.о. та Δ - приріст об'єму) на тлі ад'ювантного артриту (АА), онкопатології (ОП) та коморбідного стану (АА+ОП)

Група	Термін спостереження, доба					
	Вих. дані	7	14	28	42-49	56-60
Інтактні, $M \pm m$ % (до вих) Δ	1,02 $\pm$ 0,02 - 0,04	1,06 $\pm$ 0,10 +3,9 0,04	1,06 $\pm$ 0,07 +3,9 0,04	1,16 $\pm$ 0,05* + 3,7 0,14	1,17 $\pm$ 0,03* + 4,7 0,15	1,28 $\pm$ 0,10* + 25 0,26
АА, $M \pm m$ % (до інт.) % (до вих) Δ	1,03 $\pm$ 0,1 - - -	1,90 $\pm$ 0,06* +70 +110 1,12	2,30 $\pm$ 0,07* +116,9 +130,1 1,27	2,50 $\pm$ 0,09* +115,5 +142,7 1,47	2,44 $\pm$ 0,14* +108,6 +136,9 1,41	2,40 $\pm$ 0,11* +87,5 +133,0 1,37
ОП, $M \pm m$ % (до інт.) % (до вих) Δ	1,03 $\pm$ 0,01 - - -	1,2 $\pm$ 0,01** + 10,4 +13,6 0,14	1,11 $\pm$ 0,02** +4,7 +7,8 0,08	1,38 $\pm$ 0,02** +19,0 +34,0 0,35	1,32 $\pm$ 0,01** +12,8 + 28,2 0,29	1,29 $\pm$ 0,03** +0,7 +25,3 0,26
АА+ОП, $M \pm m$ % (до АА) % (до вих) Δ	0,96 $\pm$ 0,02 - - -	2,83 $\pm$ 0,2** λ +32,2 +194,8 1,87	2,41 $\pm$ 0,09* λ + 4,8 +151,0 1,45	2,53 $\pm$ 0,16* λ + 1,2 +163,5 1,57	2,19 $\pm$ 0,2* λ -10,2 +128,1 1,23	1,93 $\pm$ 0,09** λ -19,6 +101,0 0,97

Примітки: 1.* - $p \leq 0,05$ відносно вихідного значення показника у тварин даної групи. 2. # - $p \leq 0,05$ відносно значень у тварин лише з АА на відповідний термін спостереження. 3. λ - $p \leq 0,05$ відносно значень у тварин з ОП.

- 20 Таким чином, на тлі коморбідного стану ступінь одного з основних показників розвитку запального процесу - набряку стопи - у різні періоди спостереження, фактично, була асоційованою величиною, що властива і АА, і онкопатології, що дозволяє свідчити про збереження ознак запалення.

- 25 Дослідження об'єму пухлин у тварин на тлі коморбідного стану та на тлі онкопатології (аналог). За самостійного патологічного стану - онкопатології (S-45) - спостерігалось збільшення об'єму пухлин у всіх тварин упродовж періоду спостереження (52 доби від перевивання пухлинних клітин; табл. 7). Підтвердженням розвитку онкопатології на тлі АА були результати щодо об'єму пухлин, що оцінювався в динаміці у різні фази запального процесу.

За перевивання пухлинних клітин на тлі АА відзначався ріст пухлин, фактично, до 42-ї доби від перевивання, причому об'єм пухлин на тлі коморбідного стану суттєво не відрізнявся від об'єму пухлин у щурів лише з S-45. Від 42-ї доби після перевивання пухлинних клітин не

відзначалося пухлин у тварин з коморбідним станом. Феномен цього явища на сьогодні не має пояснення.

Таблиця 7

Об'єм пухлин (V, cm^3) у тварин з онкопатологією (S-45) та з коморбідним станом (S-45 + AA)

Групи тварин	Термін дослідження після пересадки саркоми 45 (S-45) на тлі AA, доба			
	14	26	42	52
S-45	6,08±1,54	22,19±5,43	25,63±22,16	117,13±11,64
(AA+S-45)	4,79±1,64	24,77±7,35	пухлин немає	пухлин немає

5 Зважаючи на можливість перевивання пухлинних клітин у різних концентраціях [2], доцільно зауважити, що за потреби (відповідні завдання дослідження), можна застосувати іншу (вищу) концентрацію пухлинних клітин, чим забезпечиться, вочевидь, наявність пухлин на тлі коморбідного стану впродовж більш тривалого терміну. 1, навпаки, можна моделювання онкопатології, як зазначалося вище, застосувати меншу концентрацію пухлинних клітин, тим самим подовжуючи тривалість життя тварин і збільшуючи період застосування препаратів. 10 Водночас, зазначений термін (до 42-ї доби від перевивання пухлинних клітин) є досить тривалим та достатнім терміном для проведення досліджень (за більшості випробувань) щодо ефективності та безпечності ліків. Таким чином, збереження критеріальної ознаки щодо розвитку онкопроцесу на тлі AA (об'єм пухлин) свідчить про можливість дослідження ефективності та безпечності протипухлинних засобів, препаратів ад'ювантної терапії тощо на тлі коморбідної патології.

Дослідження тривалості життя у тварин з коморбідним станом та з онкопатологією. З сорок п'ятої до сорок дев'ятої доби була зафіксована загибель шістьох тварин (13,3 %) з коморбідним станом і трьох тварин (6,7 %) з онкопатологією. У загиблих тварин за 2-3 доби до загибелі спостерігалось суттєве швидкоплинне збільшення об'єму пухлини, що призводило до апатичного, адинамічного стану, зволоженості шерстного покриву, відсутності реакцій на зовнішні подразники, зникнення рефлексів (рогівкового і згинання, розгинання кінцівок), до неможливості здійснювати будь-які рухи, споживати їжу та воду. Отримані результати щодо загибелі певної кількості тварин, ймовірно, можна пояснити їхнім вихідним імунним статусом. 25 Вочевидь, за моделювання як онкопатології, так і коморбідного стану, слід враховувати потенційну загибель тварин у віддалені терміни спостереження з метою формування дослідних груп з необхідною, відповідною до задач дослідження, кількістю особин у групі.

За дослідження тривалості життя, виживання тварин на тлі коморбідного стану за дії ліків (як і за визначення критеріальних показників онкопроцесу, зокрема) доцільно зазначити, що продовження (скорочення) терміну спостереження за тваринами можливе за перевивання пухлинних клітин у різних концентраціях, що, власне, і дозволить змінювати тривалість життя і кількість загиблих тварин контрольних груп [2].

Спосіб моделювання коморбідного стану базується на асоціації двох нозологій - ад'ювантного артриту та онкопатології у однієї особини, розроблений вперше для використання в експериментальній медицині, зокрема, в галузях фармакології, онкофармакології, онкології, патофізіології, ревматології та інших для дослідження фармако- і токсикодинаміки, фармако- і токсикокінетики оригінальних сполук та препаратів, для вивчення взаємодії ліків різних фармакологічних груп, для дослідження різних видів активності новосинтезованих сполук та відомих ліків (зокрема, протиревматичної, протипухлинної, протизапальної, імунологічної), для з'ясування механізмів розвитку коморбідної патології.

На тлі пропонованого способу відтворення коморбідного стану, що базується на асоціації двох нозологій - ад'ювантного артриту та онкопатології у однієї особини, зберігаються ознаки ад'ювантного артриту і онкопатології, про що свідчать критеріальні показники, які характеризують окремі патологічні моделі (аналоги).

45 За ад'ювантного артриту, асоційованого з онкопатологією, функціонування різних органів та систем, які безпосередньо не залучені до власне патологічних процесів - ад'ювантного артриту та онкопатології, не відрізняється від такого, що спостерігається за окремих патологічних станів, що дозволяє на тлі пропонованого експериментального коморбідного стану досліджувати можливий вплив на них ліків різних фармакотерапевтичних груп.

50 Критеріальними показниками коморбідного стану є поріг больової чутливості, об'єм ураженої стопи, наявність та об'єм пухлини, реєстрація яких можлива за життя тварин.

Додатковими показниками наявності коморбідної патології можуть бути маса пухлини (після евтаназії та розтину тварини), дані рентгенологічного дослідження суглобів і кісток, різноманітні біохімічні маркери запального та/чи онкопроцесу, активність метаболічних процесів, дані патоморфологічних досліджень органів, пухлини тощо.

На моделі пропонованого коморбідного стану можна застосовувати будь-які методи оцінки больової та запальної реакцій.

Застосування пропонованого способу розвитку коморбідного стану, що базується на асоціації двох нозологій - ад'ювантного артриту та онкопатології у однієї особини, в експериментальній медицині сприятиме пошуку шляхів фармакологічної корекції функціонування різних органів та систем та оптимізації терапевтичної стратегії.

Джерела інформації:

1. Саратиков, А. С. Ад'ювантная болезнь (морфология, патогенез, экспериментальная терапия) / А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, Т. П. Прищеп. - Томск, 1983. - 104 с.

2. Патент на корисну модель 149330 UA МПК (2021.01) G09B 23/28 (2006/01) C12N 5/00 C12N 15/00сi6 перевивання експериментальних пухлин (Саркома 45 (S-45) та карцинома Уокера W256) [Текст] / Серединська Н. М. (UA), Шарикіна Н. І. (UA), Хавич О. О. (UA), Карацуба Т. А. (UA), Бухтіарова Т. А. (UA), Марченко О. М. (UA); володілець Державна установа "Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України". - u202100710; заявл. 17.02.2021; опубл. 10.11.2021, Бюл. № 45, 2021 р.

3. Bendele, A. M. Animal model of rheumatoid arthritis / A. M. Bendele // J. Musculoskel. Neuron Interact. - 2001. - Vol.1, N4. - P. 377-385.

4. Ісаєнко, О. Ю. Ад'юванти в сучасній вакцинології / О. Ю. Ісаєнко, Є. М. Бабич, І. В. Єлисеєва // Ann. Mechnikov Institute. - 2013. - N 4. - P. 5-21.

5. Bevaart, L. Evaluation of Therapeutic Targets in Animal Model of Arthritis. How Does it Relate to Rheumatoid Arthritis? / L. Bevaart, M. J. Vervordeldonk, P.P. Tak // Arthritis & Rheumatism. - 2010. - Vol.62, N 8. - P.2192-2205.

6. Brand, D.D. Rodent Models of Rheumatoid Arthritis / D.D. Brand // Comp Med. - 2005. - Vol. 55, № 2 (April 2005). - P. 114-122.

7. Colpaert, F.C. Further evidence validating adjuvant arthritis as an experimental model of chronic pain in the rat / F.C. Colpaert, T. Meert, P. De Witte, P. Schmitt // Life Sci. - 1982. - Vol.31, N3. - P. 67-75.

8. Currey, H.L.F. Effect of intraperitoneal injection of either whole dead mycobacteria or tuberculin / H.L.F. Currey // Ann. Rheum. Dis. - 1970. - N29. - P. 314-320.

9. Darren, L. A. Animal models of rheumatoid arthritis / L.A. Darren, M.M. Ashley, B.Mc. Iain, Y.L. Foo // Eur. J. Immunol. - 2013. - Vol. 39, N 8. - P.2040-2044.

10. Henson, E.C. Studies of adjuvant-induced arthritis in the albino rat (CFN strain) / E.C. Henson, J.G. Brunson // Ann. Rheum. Dis. - 1970. - N29. - P. 185-189.

11. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Под ред. З. П. Софьиной, А. Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). - М.: Медицина, 1979. - 296 с.

12. Метастазирование опухолей: Патогенетические аспекты / Балицкий. К.П., Воронцова А.Л., Лисняк И.А. и др.; Под ред. Балицкого К.П.; АНУССР. Ин-т проблем онкологии им. Кавецкого. - Киев: Наук, думка, 1991. - 200 с.

13. Experimental rat lung tumor model with intrabronchial tumor cell implantation [Електронний ресурс] / Antero Gomes Neto [et al.] Режим доступу: <https://doi.org/10.1590/S0102-8650200800Q100014>

14. Kannan, K. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease / K. Kannan, R.A. Ortmann, D. Kimpe // Z Pathophysiology. - 2005. - Vol. 12, N3. - P. 167-181.

15. Wim, B. Berg. Lessons from animal models of arthritis over the past decade / B. Berg Wim // Arthritis Research & Therapy. - 2009. - Nil. - P.250-262.

16. Tanushree, R. Animal models of rheumatoid arthritis: correlation and usefulness with human rheumatoid arthritis / R Tanushree, G. Saikat // Am. J. Pharm. Res. - 2013. - Vol.3, N8. - P. 6131-6142.

17. Серединська Н. М., Мохорт М. А., Киричок Л. М. Больова чутливість та адекватність її оцінки за тестом "tail flick" у білих щурів / Н. М. Серединська, М. А. Мохорт, Л. М. Киричок // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2014. - №3 (39). - С. 45-51.

18. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Council of Europe. - Strasbourg, 1986. - 52 p.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Спосіб моделювання експериментального ревматоїдного артриту, коморбідного з онкопроцесом, що досягається шляхом підшкірного уведення у підшовний апоневроз білих нелінійних щурів повного ад'юванту Фрейнда в об'ємі 0,1 мл та наступного, на четверту добу, перевивання пухлинних клітин саркоми-45 (S-45) в концентрації $1,5 \times 10^6$ в 0,5 мл фізіологічного розчину за підшкірного їхнього введення в область правого боку спини тварини.