

ДИНАМИКА УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ

Захватов А.Н., Козлов С.А., Аткина Н.А., Дудоров И.И.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Резюме. В эксперименте на 105 белых нелинейных крысах изучена динамика некоторых показателей цитокинового профиля при моделировании посттравматического артрита коленного сустава на фоне комбинированного зондового перорального введения нимесулида и внутрисуставного введения этоксида. Установлено, что при травме коленного сустава наблюдается высокий уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что свидетельствует о развитии местного иммунновоспалительного процесса. Использование комбинированного введения нимесулида и этоксида способствовало значительному снижению уровня всех пулов цитокинового профиля к концу эксперимента, приближая их значения к данным интактных животных.

Ключевые слова: посттравматический артрит, цитокины, нимесулид, этоксидол

TIME COURSE OF CYTOKINE LEVELS IN EXPERIMENTAL POSTTRAUMATIC ARTHRITIS

Zahvatov A.N., Kozlov S.A., Atkina N.A., Dudorov I.I.

N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Abstract. An experimental model of post-traumatic arthritis of knee was developed in a series of 105 white non-inbred rats. Time-dependent changes of some cytokines were studied upon combined treatment with oral nimesulide and intra-articular etoxydole injections. It was found that the knee joint injury we observed increased levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, which may reflect a development of local immunological response. Combined application of nimesulide and etoxydole contributed to significant reduction in all cytokine pools at the end of observation, bringing their levels to normal ranges typical to the intact animals.

Keywords: post-traumatic arthritis, cytokines, nimesulide, etoxydol

Адрес для переписки:

Захватов Алексей Николаевич
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет
имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия
431510, Россия, Республика Мордовия, Лямбирский район,
с. Лямбиров, ул. Ленина, 53-17.
Тел.: 8 (917) 072-87-83.
E-mail: zachvatan78@mail.ru

Address for correspondence:

Zahvatov Alexey N.
N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation
431510, Russian Federation, Republic of Mordovia, Lyambir,
Lenin str., 53-17.
Phone: 7 (917) 072-87-83.
E-mail: zachvatan78@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Захватов, С.А. Козлов, Н.А. Аткина, И.И. Дудоров,
«Динамика уровня цитокинов при экспериментальном
посттравматическом артрите» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 91-96.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-91-96

© Захватов А.Н. и соавт., 2016

For citation:

A.N. Zahvatov, S.A. Kozlov, N.A. Atkina, I.I. Dudorov, "Time
course of cytokine levels in experimental posttraumatic arthritis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 1, pp. 91-96.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-91-96

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-91-96>

Введение

Патогенетические механизмы посттравматического артрита, приводящие к развитию дегенеративно-деструктивных процессов в суставе, отличаются многофакторностью и до сих пор до конца не выяснены. Есть основания полагать, что определенное значение в разрушении суставного хряща может играть иммунная система [5, 6, 7].

Важная роль в развитии посттравматического воспалительного процесса в суставе отводится цитотоксическим эффектам провоспалительных цитокинов, обуславливающим деструктивные поражения хряща и субхондральной кости [1]. В последние годы немалое значение в патогенезе посттравматического артрита также отводится процессам перекисного окисления липидов и состоянию защитной антиоксидантной системы [3, 9].

Цитокин-опосредованная иммунная реакция, возникающая при травме в ответ на повреждение тканей, на раннем этапе играет роль защитного механизма, но гиперреактивность и связанная с ней избыточная и не контролируемая секреция провоспалительных и противовоспалительных цитокинов трансформирует первоначально защитный механизм в патологический процесс [8]. Это приводит к иммунологической перестройке организма, следствием чего является развитие нарушений в поврежденном суставе, приводящих к дегенеративно-деструктивным изменениям хрящевой ткани и синовиальной оболочки [4].

С этой точки зрения патогенетическое обоснование имеет применение препаратов, обладающих ингибирующим влиянием на синтез провоспалительных цитокинов, а также оказывающих антиоксидантное и антигипоксантное действие. В этом плане наше внимание привлекли препараты нимесулид и этоксидол, комбинированное введение которых наиболее целесообразно при посттравматическом артрите. За счет оказания противовоспалительного эффекта нимесулида и антиоксидантного и антигипоксантного действия этоксидола происходит потенцирование лечебных эффектов обоих препаратов.

Учитывая вышеизложенное, **целью исследования** явилось изучение динамики цитокинового профиля при травматическом повреждении коленного сустава в эксперименте на фоне комбинированного перорального введения нимесулида и внутрисуставного введения этоксидола.

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева». Эксперименты проведены на 105 белых нелинейных крысах обоего пола массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева».

Животные были разделены на 4 серии. Первую серию составили интактные животные в количестве 15 особей. Во второй (30 крыс), третьей (30 крыс), четвертой (30 крыс) производилось моделирование травмы коленного сустава механическим путем по методике Г.М. Дубровина (2005) [2]. Под ингаляционным наркозом в асептических условиях рассекали кожу, фасцию и капсулу сустава. В полость сустава вводили иглу Дюфо, обточенную под углом 90° и ориентированную на хрящ внутреннего мыщелка бедренной кости. Ввинчивающими движениями перфорировали суставной хрящ до упора в субхондральную кость, затем иглу удаляли. Получение фрагмента суставного хряща контролировали мандреном. Швы на рану накладывали через все слои.

Во второй (контрольной) серии лечение не проводилось. Животные третьей опытной серии получали нимесулид перорально через зонд в среднетерапевтической дозе 2 мг/кг ежедневно в течение 10 дней. На животных четвертой экспериментальной серии изучалась эффективность комбинированной пероральной терапии нимесулидом в дозе 2 мг/кг по вышеуказанной схеме введения и внутрисуставной терапии 3-гидроксиэтилпиридина малатом (этоксидолом) в дозе 5 мг/кг через день. Продолжительность курса составляла 5 инъекций. На данную методику получен патент на изобретение № 2516951 от 26.03.14 г.

Цитокиновый профиль исследовали по уровню провоспалительных (IL-1 β , IL-17, TNF α), регуляторных (IL-2, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа в «sandwich» варианте с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента с использованием набора реагентов фирмы Bender Medsystems (Австрия) для крыс. Для регистрации результатов использовали иммуноферментный анализатор «Multiscan». Количество цитокинов выражали в пикограммах на мл (пг/мл). Исследования проводились на 3, 15 и 28 сутки эксперимента. Животных выводили из эксперимента в соответствии с Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях, при-

нятой Советом Европы в 1986 г. путем декапитации после предварительного внутривенного введения раствора тиопентала натрия в дозе 100 мг/кг. Статистическая обработка результатов исследований проведена с помощью t-критерия Стьюдента. Изменения считали достоверными при p меньше 0,05; 0,01; 0,001.

Результаты и обсуждение

Моделирование посттравматического артрита в эксперименте уже в ранние сроки сопровождалось значительным повышением уровня всех пулов цитокинов, а также нарушением баланса между ними. Происходило нарушение физиологического равновесия между провоспалительными (IL-1, TNF α) и противовоспалительными (IL-4, IL-10) цитокинами со сдвигом в сторону первых, под действием которых хондроциты синтезируют протеолитические ферменты (матриксные протеиназы, коллагеназы), вызывающие деградацию коллагена и протеогликана хряща. Высокие уровни всех пулов цитокинов в крови животных контрольной серии сохранялись вплоть до конца эксперимента (рис. 1). Данный факт указывает на необходимость медикаментозной коррекции цитокинового дисбаланса, приводящего к хронизации процесса и дальнейшей деструкции хряща.

При применении нестероидной противовоспалительной терапии в виде зондового перорального введения нимесулида в дозе 2 мг/кг к концу эксперимента происходило снижение уровня

провоспалительных цитокинов по сравнению с данными контрольной серии. Так, концентрации TNF α , IL-1 β и IL-17 были ниже на 19,1%, 12,4% и 22,7% соответственно. Также получены статистически значимые отличия в отношении регуляторных цитокинов — снижение уровня IL-6 на 36,6% и IL-2 на 39,2%. Подобные изменения наблюдались и при исследовании противовоспалительных цитокинов. Отмечалось уменьшение концентраций IL-4 и IL-10 на 36,1% и 30,1% соответственно. Несмотря на данную положительную динамику, уровни маркеров воспаления значительно превышали значения животных интактной серии, что говорит о недостаточной эффективности нимесулида в виде монотерапии посттравматических артритов.

При комбинации нимесулида с внутрисуставным введением этиоксидола наблюдался наибольший положительный эффект в лечении посттравматических изменений суставов. Так, уровни провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-17 по сравнению с данными контрольной серии уменьшились на 59,8% ($p_3 < 0,001$), 50,2% ($p_3 < 0,001$) и 48,2% ($p_3 < 0,001$) соответственно. Также достоверно отличались регуляторные и противовоспалительные цитокины — наблюдалось снижение уровня IL-6 на 58% ($p_3 < 0,001$), IL-2 на 67,1% ($p_3 < 0,001$) и IL-4 на 62,5% ($p_3 < 0,001$), IL-10 на 64,3% ($p_3 < 0,001$).

По сравнению с данными серии с применением нимесулида в соответствующие сроки уровни деструктивных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-17

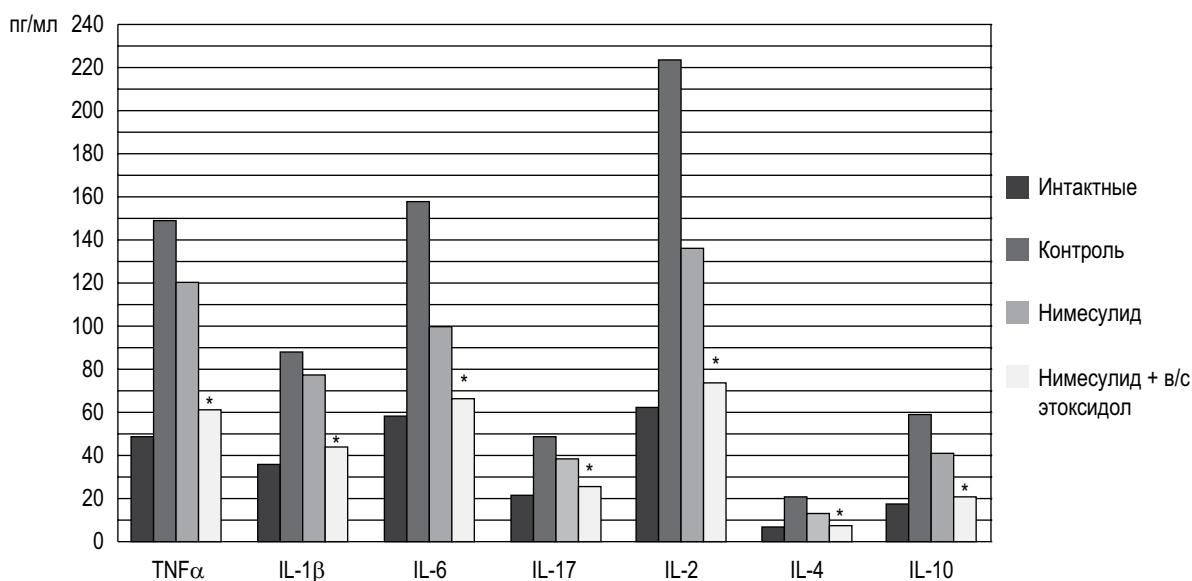


Рисунок 1. Сравнительная характеристика уровня цитокинов в плазме крови лабораторных животных всех серий при посттравматическом артрите. 28 суток эксперимента

Примечание. * — достоверность показателя по отношению к данным контрольной серии ($p_3 < 0,001$).

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ НА 28 СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА (M±m)

Показатель, пг/мл	Интактные животные (n = 15)	Контрольная серия (n = 30)	Нимесулид per os (n = 30)	Нимесулид per os и в/с этоксиол (n = 30)
TNF α	48,69±0,72	148,4±2,12 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	120,15±3,13 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,001	61,14±2,17 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-1 β	35,61±1,04	87,76±2,03 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01	76,97±2,07 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001	43,69±1,54 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-6	57,43±0,85	157,94±2,39 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	100,24±2,58 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,001 p ₃ < 0,001	66,37±2,41 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-17	21,43±0,18	48,52±1,19 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	37,51±1,13 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001	25,04±1,21 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL -2	62,72±1,43	223,46±4,03 p < 0,001 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	135,87±3,42 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001	73,57±2,62 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-4	6,59±0,49	19,25±0,53 p < 0,001 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	12,34±0,53 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,001	7,23±0,31 p > 0,05 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-10	17,04±0,68	58,39±0,82 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	40,82±1,45 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,001	20,84±0,89 p > 0,05 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001

Примечание. p – достоверность отличий к данным интактных животных; p₁ – к данным соответствующей серии на 3 сутки; p₂ – к данным соответствующей серии на 15 сутки; p₃ – достоверность отличий к данным контрольной серии на соответствующие сутки; p₄ – достоверность отличий к данным НПВС-терапии на соответствующие сутки.

снижались на 49,1% ($p_4 < 0,001$), 43,2% ($p_4 < 0,001$) и 33,3% ($p_4 < 0,001$) соответственно. Позитивная тенденция наблюдалась в отношении регуляторных и противовоспалительных цитокинов. Отмечалось уменьшение концентраций IL-6 и IL-2 на 33,8% ($p_4 < 0,001$) и 44,1% ($p_4 < 0,001$) и IL-4 и IL-10 на 34,3% ($p_4 < 0,001$) и 45,9% ($p_4 < 0,001$) соответственно.

При сравнительной оценке полученных данных с показателями интактных животных было выявлено, что на фоне сочетанного применения антиоксиданта этоксида и НПВС нимесулида уровни маркеров воспаления приближались к должным величинам. Так, концентрация деструктивных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-17 к концу эксперимента превышала нормальные показатели в 1,25 ($p < 0,001$), 1,22 ($p < 0,001$) и 1,16 раза ($p < 0,001$) соответственно. Если сравнить данные контрольной серии на 28 суток с данными интактной серии, мы увидим, что TNF α , IL-1 β и IL-17 превышали нормальные показатели в 3,04 раза ($p < 0,001$), 2,46 раза ($p < 0,001$) и 2,26 раза ($p < 0,001$) соответственно. Регуляторные цитокины IL-6 и IL-2 к концу комбинированной терапии также незначительно превышали нормальные показатели — в 1,15 ($p < 0,001$) раза и 1,17 ($p < 0,001$) раза соответственно. В отношении противовоспалительных

цитокинов статистически значимых различий не наблюдалось ($p > 0,05$) (табл. 1).

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что наиболее эффективным методом коррекции показателей цитокинового профиля при посттравматическом артрите в эксперименте является комбинированное пероральное введение НПВС (в данном случае — нимесулида в дозе 2 мг/кг) и внутрисуставное введение антиоксиданта этоксида в дозе 5 мг/кг массы тела. При использовании данной методики к концу эксперимента маркеры воспаления максимально приближались к нормальным показателям, что обусловлено действием препаратов на разные звенья патогенеза, реализуя при этом один и тот же эффект. Так, противовоспалительное действие нимесулида связано с подавлением синтеза простагландинов в очаге воспаления, вызывающих агрегацию тромбоцитов, отек и ноцицептивную сенсibilизацию, что является предрасполагающими факторами для развития процессов перекисного окисления липидов. В свою очередь, этоксидол, воздействуя на иммунокомпетентные клетки и обладая мембранопротекторной активностью, затрудняет доступ к остаткам жирных кислот активных форм кислорода, которые активно синтезируются под действием провоспалительных цитокинов.

Список литературы / References

1. Берглезов М.А., Андреева Т.М. Остеоартроз (этиология, патогенез) // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2006. № 4. С. 79-86. [Berglezov M.A., Andreeva T.M. Osteoarthritis (etiology, pathogenesis). *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova* = *N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics*, 2006, no. 4, pp. 79-86. (In Russ.)]
2. Дубровин Г.М., Блинков Ю.А., Нетяга С.В., Нетяга А.А. Обоснование применения миелопида для профилактики посттравматического остеоартроза (экспериментальное исследование) // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2005. № 2. С. 60-62. [Dubrovin G.M., Blinkov U.A., Netyaga S.V., Netyaga A.A. The rationale for the use of mielopid for the prevention of posttraumatic osteoarthritis (experimental study). *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova* = *N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics*, 2005, no. 2, pp. 60-62. (In Russ.)]
3. Есина Е.Ю. Новые подходы к терапии остеоартроза // ИнВестРегион, 2008. № 2. С. 48-50. [Esina E.Yu. New approaches to the treatment of osteoarthritis. *InVestRegion = Investigation*, 2008, no. 2, pp. 48-50. (In Russ.)]
4. Королева С.В., Львов С.Е., Григорьев Э.В., Мясоедова С.Е. Медикаментозное лечение остеоартроза // Травматология и ортопедия России, 2006. № 3. С. 76-81. [Koroleva S.V., Lvov S.E., Grigoriev E.V., Myasoedova S.E. Medical treatment of osteoarthritis (review of literature). *Travmatologiya i ortopediya Rossii* = *Traumatology and Orthopedics of Russia*, 2006, no. 3, pp. 76-81. (In Russ.)]
5. Миронов С.П., Ветрилэ С.Т., Космиади Г.А., Швеце В.В. Роль клеток иммунной системы в дегенеративных изменениях межпозвоночного диска // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2007. № 3. С. 16-22. [Mironov S.P., Vetrile S.T., Kosmiadi G.A., Shvets V.V. Role of immune cells in degenerative changes of the intervertebral disc. *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova* = *N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics*, 2007, no. 3, pp. 16-22. (In Russ.)]
6. Фатеева Е.И., Скачилова С.Я., Митрохин Н.М. Липидрегулирующая активность нового оригинального производного 3-оксипиридина (этоксида) // Кубанский научный медицинский вестник,

2008. № 6 (105). С. 84-86.[Fateev E.I., Skahcilova S.J., Mitrokhin N.M. Operagoers activity new original derived 3-hydroxypyridine (etoxazole). *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Research Medical Journal*, 2008, no. 6 (105), pp. 84-86. (In Russ.)]

7. Derry S., Loke Y.K. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin. *BMJ*, 2000, no. 321, pp. 1183-1187.

8. Hogue J.H., Mersfelder T.L. Pathophysiology and first-line treatment of osteoarthritis. *The Annals of Pharmacotherapy*, 2002, Vol. 36, no. 4, pp. 679-686.

9. Savage R. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors: when should they be used in the elderly. *Drugs Aging*, 2005, Vol. 22, no. 3, pp. 185-200.

Авторы:

Захватов А.Н. — к.м.н., доцент кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова с курсами оториноларингологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Козлов С.А. — д.м.н., профессор кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова с курсами оториноларингологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Аткина Н.А. — студентка 4 курса Медицинского института ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Дудоров И.И. — аспирант кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова с курсами оториноларингологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Authors:

Zahvatov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, N.I. Atyasov Department of General Surgery with a Course of Otorhinolaryngology, Stomatology and Maxillofacial Surgery, N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Kozlov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, N.I. Atyasov Department of General Surgery with a Course of Otorhinolaryngology, Stomatology and Maxillofacial Surgery, N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Atkina N.A., Medical Student (4th acad. year), N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Dudorov I.I., Postdoc Fellow, N.I. Atyasov Department of General Surgery with a Course of Otorhinolaryngology, Stomatology and Maxillofacial Surgery, N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Поступила 07.07.2015
Принята к печати 30.08.2015

Received 07.07.2015
Accepted 30.08.2015