

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-207-214>
УДК 615.454; 615.276



Оригинальная статья / Research article

Оценка эффективности мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита: влияние на уровень провоспалительных цитокинов

У. В. Ногаева¹✉, В. Е. Ковансков¹, Д. Ю. Ивкин¹, Е. В. Флисюк¹, К. Д. Якимов¹,
Е. И. Елецкая¹, Е. Д. Семивеличенко¹, В. Г. Антонов²

¹ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (СПбГПМУ), 194100, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

✉ Контактное лицо: Ногаева Ульяна Валерьевна. E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: У. В. Ногаева – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; В. Е. Ковансков – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>;

Д. Ю. Ивкин – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Е. В. Флисюк – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

К. Д. Якимов – <https://orcid.org/0000-0001-5591-2558>; Е. И. Елецкая – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>;

Е. Д. Семивеличенко – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; В. Г. Антонов – <https://orcid.org/0000-0001-9910-5395>.

Статья поступила: 30.12.2022

Статья принята в печать: 10.02.2023

Статья опубликована: 24.02.2023

Резюме

Введение. В настоящее время остеоартрит считается медленно протекающим воспалительным заболеванием, полностью поражающим сустав. Немаловажную роль в развитии данной патологии играет воспаление синовиальной оболочки и связок (синовит), дополненное постоянными механическими нагрузками. В норме в хряще наблюдается баланс противовоспалительных и провоспалительных медиаторов, однако при воздействии факторов риска это равновесие сдвигается в сторону последних.

Цель. Оценка влияния ранее разработанной мягкой лекарственной формы, содержащей мелоксикам, производное пурина и иммуномодулятор М на уровень провоспалительных цитокинов: ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α при остеоартрите.

Материалы и методы. В эксперимент было включено 25 животных, которых методом простой рандомизации разделили на 5 групп: 1 – испытуемая (гель 0,5 %), 2 – испытуемая (гель 1 %), 3 – референтная (Амелотекс®, гель 1 %), 4 – контроль (гелевая основа); 5 – интакт. Доклиническое моделирование патологии было проведено путем сочетанного введения в полость скакательного (заплюсневое) сустава крыс самцов линии Brown Norway Catholic Rats по 0,1 мл смеси полного адьюванта Фрейнда с 10 % суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:10. Иммуноферментный анализ сыворотки крови животных на 28 день эксперимента проводили с помощью стандартных планшетных наборов ELISA (Cloud-Clone Corp., США). Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Разработанные составы способствовали снижению уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α) по сравнению с гелевой основной и референтным препаратом. При этом выявлены различия между эффектом, наблюдаемым от применения испытуемых средств (геля 0,5 %, геля 1 %) и референтного препарата по влиянию на уровень ИЛ-1α и ФНО-α, что свидетельствует о большей эффективности подобранной комбинации действующих веществ, ведь, в отличие от однокомпонентного геля Амелотекс®, разработанные нами составы дополнительно включали производное пурина и иммуномодулятор М. Полученные данные важны с точки зрения понимания механизма действия мягкой лекарственной формы.

Заключение. По результатам предыдущих и настоящих исследований предполагается, что наибольший интерес для клинической практики представляет комбинированный состав мягкой лекарственной формы с половинной (0,5 %) концентрацией мелоксикама, поскольку его применение при высоком уровне эффективности дополнительно позволяет снизить вероятность возникновения нежелательных реакций со стороны нестероидного противовоспалительного средства, что важно в случае длительной терапии остеоартрита.

Ключевые слова: остеоартрит, мелоксикам, доклинические исследования, воспаление, цитокины, иммуноферментный анализ, мягкие лекарственные формы

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. У. В. Ногаева и К. Д. Якимов под руководством Е. В. Флисюк разработали составы и изготовили мягкие лекарственные формы. В. Е. Ковансков, У. В. Ногаева, Д. Ю. Ивкин, Е. Д. Семивеличенко провели доклинические исследования сравнительной эффективности полученных составов. Е. И. Елецкая провела иммуноферментный анализ крови животных. Д. Ю. Ивкин, У. В. Ногаева, В. Е. Ковансков, В. Г. Антонов участвовали в обработке данных и в написании текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Ногаева У. В., Ковансков В. Е., Ивкин Д. Ю., Флисюк Е. В., Якимов К. Д., Елецкая Е. И., Семивеличенко Е. Д., Антонов В. Г. Оценка эффективности мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита: влияние на уровень провоспалительных цитокинов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):207–214. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-207-214>

© Ногаева У. В., Ковансков В. Е., Ивкин Д. Ю., Флисюк Е. В., Якимов К. Д., Елецкая Е. И., Семивеличенко Е. Д., Антонов В. Г., 2023

© Nogaeva U. V., Kovanskov V. E., Ivkin D. Yu., Flisyuk E. V., Yakimov K. D., Yeletskaia E. I., Semivelichenko E. D., Antonov V. G., 2023

Evaluation of the Efficiency of a Soft Dosage Form for the Treatment of Osteoarthritis: Influence on the Level of Pro-inflammatory Cytokines

Ulyana V. Nogaeva¹✉, Vladislav E. Kovanskov¹, Dmitry Yu. Ivkin¹, Elena V. Flisyuk¹, Kirill D. Yakimov¹, Elizaveta I. Yeletskaia¹, Evgeniy D. Semivelichenko¹, Victor G. Antonov²

¹ Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 2, Litovskaya str., Saint-Petersburg, 194100, Russia

✉ Corresponding author: Ulyana V. Nogaeva. E-mail: uljana.nogaeva@pharminnotech.com

ORCID: Ulyana V. Nogaeva – <https://orcid.org/0000-0002-8214-7553>; Vladislav E. Kovanskov – <https://orcid.org/0000-0001-5783-8339>;

Dmitry Yu. Ivkin – <https://orcid.org/0000-0001-9273-6864>; Elena V. Flisyuk – <https://orcid.org/0000-0001-8077-2462>;

Kirill D. Yakimov – <https://orcid.org/0000-0001-5591-2558>; Elizaveta I. Yeletskaia – <https://orcid.org/0000-0002-9423-7249>;

Evgeniy D. Semivelichenko – <https://orcid.org/0000-0002-8464-7711>; Victor G. Antonov – <https://orcid.org/0000-0001-9910-5395>.

Received: 30.12.2022

Revised: 10.02.2023

Published: 24.02.2023

Abstract

Introduction. Osteoarthritis is now considered to be a slowly progressive inflammatory disease that completely affects the joint. An important role in the development of this pathology is played by inflammation of the synovial membrane and ligaments (synovitis), supplemented by constant mechanical stress. Normally, a balance of anti-inflammatory and pro-inflammatory mediators is observed in cartilage, however, under the influence of risk factors, this balance shifts towards the latter.

Aim. Evaluation of the effect of a previously developed soft dosage form containing meloxicam, a purine derivative and an immunomodulator M on the level of pro-inflammatory cytokines: IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α in osteoarthritis.

Materials and methods. The experiment included 25 animals, which were divided into 5 groups by simple randomization: 1 – test (gel 0.5 %), 2 – test (gel 1 %), 3 – reference (Amelotex®, gel 1 %), 4 – control (gel base); 5 – intact. Preclinical modeling of the pathology was carried out by combined injection of 0.1 ml of a mixture of complete Freund's adjuvant with a 10 % suspension of talc in isotonic sodium chloride solution in a ratio of 1 : 10 into the cavity of the hock (tarsal) joint of Brown Norway Catholic Rats male rats. Enzyme immunoassay of animal blood serum on the 28th day of the experiment was performed using standard ELISA plate kits (Cloud-Clone Corp., USA). Statistical data processing was performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software Inc., USA), differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion. The developed compositions contributed to a decrease in the level of pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-6 and TNF- α) compared with the main and reference gel preparation. At the same time, differences were found between the effect observed from the use of the test agents (gel 0.5 %, gel 1 %) and the reference drug in terms of the effect on the level of IL-1 α and TNF- α , which indicates a greater effectiveness of the selected combination of active substances, because, unlike the single-component gel Amelotex®, the compositions developed by us additionally included a purine derivative and an immunomodulator M. The data obtained are important from the point of view of understanding the mechanism of action of a soft dosage form.

Conclusion. Based on the results of previous and present studies, it is assumed that the combined composition of the soft dosage form with a half (0.5 %) concentration of meloxicam is of greatest interest for clinical practice, since its use at a high level of effectiveness additionally reduces the likelihood of adverse reactions from the non-steroidal anti-inflammatory drug, which is important in the case of long-term therapy of osteoarthritis.

Keywords: osteoarthritis, meloxicam, preclinical studies, inflammation, cytokines, enzyme immunoassay, soft dosage forms

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Ulyana V. Nogaeva and Kirill D. Yakimov under the direction of Elena V. Flisyuk developed formulations and produced soft dosage forms. Vladislav E. Kovanskov, Ulyana V. Nogaeva, Dmitry Yu. Ivkin, Evgeniy D. Semivelichenko conducted preclinical studies of the comparative effectiveness of the obtained formulations. Elizaveta I. Yeletskaia conducted an enzyme immunoassay on the animals' blood. Dmitry Yu. Ivkin, Ulyana V. Nogaeva, Vladislav E. Kovanskov and Victor G. Antonov participated in data processing and in writing the text of the article. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Nogaeva U. V., Kovanskov V. E., Ivkin D. Yu., Flisyuk E. V., Yakimov K. D., Yeletskaia E. I., Semivelichenko E. D., Antonov V. G. Evaluation of the efficiency of a soft dosage form for the treatment of osteoarthritis: influence on the level of pro-inflammatory cytokines. *Drug development & registration*. 2023;12(1):207–214. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-207-214>

ВВЕДЕНИЕ

Остеоартрит (ОА) длительное время рассматривали как заболевание, связанное со старением и дегенерацией хрящевой ткани. Однако, благодаря последним исследованиям, представления о патогенезе

ОА, а, следовательно, и о подходах к терапии существенно изменились – особое место стало занимать иммунное воспаление [1].

Сегодня известно, что в развитии патологии принимает участие ряд факторов, взаимодействующих между собой на биохимическом и механическом

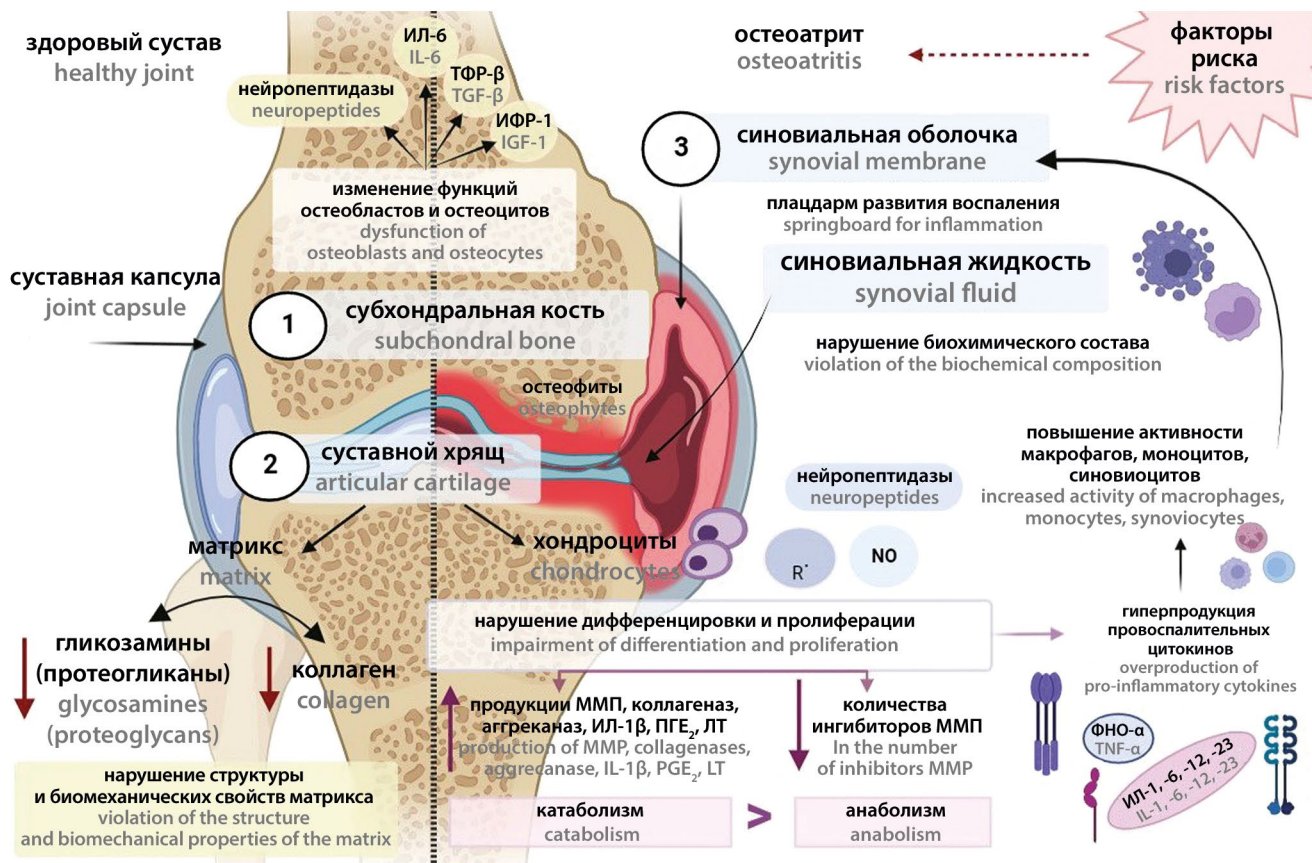


Рисунок 1. Патогенез остеоартрита (создано с помощью BioRender.com).

Примечания: ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста; ММП – матриксные металлопротеиназы; ПГЕ₂ – простагландин Е₂; ТФР-β – трансформирующий фактор роста; ЛТ – лейкотриены

Figure 1. Osteoarthritis pathogenesis (created with BioRender.com).

Notes: IGF-1 – insulin-like growth factor; MMP – matrix metalloproteinases; PGE₂ – prostaglandin E₂; TGR-β – transforming growth factor; LT – leukotrienes

уровнях. На рисунке 1 представлен патогенез ОА¹, из которого следует, что клиническая картина развивается на уровне субхондральной кости, суставного хряща и синовиальной оболочки [2, 3].

В субхондральной кости изменяются функции остеобластов и остеоцитов, на первых этапах повреждения повышается резорбция и в дальнейшем увеличивается костеобразование, формируются остеофиты, что нарушает плотность костной ткани, приводит к повреждению субхондральных сосудов, формируя костный венозный стаз. Одновременно остеобласты начинают избыточно продуцировать факторы роста и провоспалительные цитокины, повреждающие хрящ [4].

Основная функция хряща в суставе – амортизация механических нагрузок, что обеспечивают такие

структурные элементы, как матрикс и хондроциты. Матрикс содержит две главные макромолекулы: гликозамины (протеогликаны) и коллаген. Коллагеновая сеть матрикса удерживает протеогликаны в хряще, выполняя функцию каркаса. При патологии происходит снижение содержания коллагена и протеогликанов, в результате чего нарушается структура и биомеханические свойства матрикса [5].

Основные патологические процессы, проводящие к разрушению хряща, происходят в хондроцитах, которые содержат ферменты, в частности металлопротеиназы: сериновая протеиназа, коллагеназа, простромелизин. В норме эти ферменты находятся под контролем ингибиторов и не оказывают неблагоприятного воздействия, однако при патологии катаболические процессы превышают анаболические, и хондроцит получает гиперпролиферативный статус. Происходит гиперпродукция цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-23, ФНО-α, липидных медиаторов (простагландин Е₂, лейкотриены), фактора роста (ТФР-β), свободных радикалов, оксида азота, ги-

¹ Spence S. Osteoarthritis: Pathogenesis and clinical findings. The Calgary Guide to Understanding Disease. (Electronic resource). Available at: <https://calgaryguide.ucalgary.ca/osteoarthritis-oa-clinical-findings-2/> Accessed: 14.12.2022.

перекспрессия ЦОГ-2, в итоге наблюдается активация ферментов синовиальной жидкости, деградация протеогликанов и коллагена, развиваются процессы ремоделирования, поддерживается иммунное воспаление [6].

Клиническая картина при этом включает боль, нарушение функции пораженного сустава, уменьшение объема движения, утреннюю скованность.

Основная цель лечения и вторичной профилактики ОА – снизить выраженность проявлений заболевания и замедлить разрушение хряща и субхондральной кости, что позволяет уменьшить боль, улучшить функцию сустава, повысить мобильность пациента.

Ранее нами была разработана и изучена комбинированная мягкая лекарственная форма (МЛФ), обладающая противовоспалительной активностью, подтвержденной комплексными доклиническими исследованиями [7, 8]. Однако при всей надежности изучения размера поврежденного сустава, работоспособности животных и гистологической картины, проведенная оценка эффективности является весьма грубой, поэтому данная работа посвящена анализу влияния испытуемого средства на патогенез воспаления при ОА, а именно – на уровень ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- α , определенный с помощью ИФА.

Цель исследования: провести сравнительную оценку влияния испытуемой МЛФ для терапии ОА на уровень провоспалительных цитокинов.

Задачи исследования:

1. Смоделировать остеоартрит у крыс самцов Brown Norway Catholic Rats.
2. Провести сравнительную оценку противовоспалительной активности, разработанной МЛФ, изучив влияние на уровень маркеров: ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования стали:

1. Комбинированная МЛФ, содержащая мелоксикам 0,5, производное пурина 3,0, иммуномодулятор М 5,0, гелевую основу до 100,0 (далее – гель 0,5 %).
2. Комбинированная МЛФ, включающая мелоксикам 1,0, производное пурина 3,0, иммуномодулятор М 5,0, гелевую основу до 100,0 (далее – гель 1 %).

Испытуемые составы были получены в GMP тренинг-центре СПХФУ, основа гелей представляла собой комбинацию альгината натрия 2,0, пропиленгликоля 10,0, кремофора RH-40 2,0, твин-80 2,0 и воды очищенной до 100,0.

В качестве референтного препарата был выбран Амелотекс® гель 1 % (серия 661120, годен до 10.2023).

Методы

Моделирование остеоартрита

Для моделирования патологии в полость скакательного сустава крыс самцов линии Brown Norway Catholic Rats вводили по 0,1 мл смеси полного адъюванта Фрейнда с 10%-й суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:10 (рисунок 2).

Всего в эксперимент было включено 25 животных, которые методом простой рандомизации были распределены в одну из пяти групп. Первым четырем группам в течение 28 дней после моделирования патологии на участок воспаления ежедневно наносили по 0,1 мл определенной МЛФ (гель 0,5 %, гель 1 %, Амелотекс® гель 1 %, гелевая основа), дозирование осуществляли с помощью шприца. Пятая группа была интактной. Протокол исследования RATS-OA-01-2022 от 07.02.2022 соответствовал этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований.



Рисунок 2. Доклиническое моделирование остеоартрита:

1 – внутрисуставное введение суспензии талька и адъюванта Фрейнда; 2 – внешний вид сустава через 24 часа после моделирования патологии; 3 – измерение размера поврежденного сустава с использованием штангенциркуля

Figure 2. Preclinical modeling of osteoarthritis:

1 – intra-articular introduction of a suspension of talc and Freud's adjuvant; 2 – appearance of the joint 24 hours after modeling the pathology; 3 – measurement of the size of the damaged joint using a caliper.

Для оценки адекватности модели были использованы следующие методы:

1. Еженедельное измерение размера сустава с помощью цифрового штангенциркуля.
2. Двигательная активность животных с использование беговой дорожки Treadmill (Германия).
3. Гистологическая оценка состояния суставов в конце эксперимента после эвтаназии животных в CO₂-боксе (BIOSCAPE (EHRET), Германия).

Иммуноферментный анализ

Критерием сравнительной эффективности испытуемых средств был выбран уровень провоспалительных цитокинов, а именно ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α . На 28 день исследования у экспериментальных крыс брали кровь и получали путем центрифугирования в режиме – 1000 об/мин 20 минут.

Для иммуноферментного анализа использовали стандартные планшетные наборы ELISA, каталожные номера: SEA071Ra, SEA563Ra, SEA079Ra, SEA133Ra, производитель Cloud-Clone Corp. (США). Результаты считывали с помощью фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечение SkanIt™ Software (Thermo Fisher Scientific, США) на базе НОЦ МКТ СПХФУ.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ результатов был осуществлен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения показателей была проверена посредством теста Шапиро – Уилка, в дальнейшем использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты приведены в формате среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение среднего (SD). Множественные сравнения были проведены с учетом поправки (тест Тьюки).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

С патогенетической точки зрения остеоартрит является многофакторным заболеванием. Исследования последних лет говорят о значимом вкладе в формирование клинической картины ОА как дегенеративных, так и воспалительных изменений [9]. Если первые мы можем оценить посредством гистологии, снятия рентгеновских снимков, то для изучения вторых актуально обратиться к цитокинам – маркерам степени выраженности воспалительного процесса.

Различают противовоспалительные и провоспалительные цитокины, в представляемой работе основное внимание было уделено последним, а именно ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α .

Из данных литературы есть сведения о том, что ИЛ-1 α способствуют развитию остеолитического процесса, повышает резорбцию кости и хряща, а также

усиливает процесс образования супероксид-радикалов, оксида азота (II), простагландинов E₂ [6]. В связи с чем, уменьшение концентрации ИЛ-1 α имеет значение для замедления патологического процесса на уровне метаболизма хондроцитов и оказания хондропозитивного эффекта. Подобную картину мы наблюдаем в случае 28-дневного нанесения геля 0,5 %, геля 1 %, а также референтного препарата Амелотекс® гель 1 %. В этих группах уровень ИЛ-1 α был в диапазоне от $58,09 \pm 18,70$ до $233,5$ пг/мл. У животных, получавших гелевую основу (контроль), концентрация ИЛ-1 α составила около $369,48 \pm 36,52$ пг/мл.

ИЛ-1 β индуцирует воспалительные реакции и является одним из важнейших цитокинов в патогенезе остеоартрита. Было показано, что ИЛ-1 β ингибирует продукцию компонентов внеклеточного матрикса хряща (коллаген и агрекан), активирует металлопротеиназы, разлагающие матрикс, индуцирует свою собственную экспрессию, а также производство других провоспалительных медиаторов, таких как ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-8 [9,10]. Основываясь на этом, некоторые исследователи изучают уровень ИЛ-1 β в качестве маркера выраженности воспаления, а также рассматривают его с точки зрения оценки противовоспалительной активности испытуемых средств. В исследовании, проведенном нами, у животных, которым наносили гелевую основу после моделирования патологии средний уровень ИЛ-1 β $31,47 \pm 0,66$ пг/мл, в то время как у интактных он был около $12,69 \pm 0,72$ пг/мл, что свидетельствуют о сохранении воспаления на 28 день эксперимента. Статистически значимых различий между уровнями ИЛ-1 β в группах, получающих терапию разными МЛФ, не выявлено. Такие результаты можно предположительно связать тем, что воспалительный процесс при ОА начинается с гиперпродукции ИЛ-1 β , после чего запускается синтез других медиаторов воспаления и, в течение времени, концентрация ИЛ-1 β снижается. Однако для подтверждения этой гипотезы необходимо провести исследование в динамике, включив несколько временных точек взятия крови и проведения ИФА.

ФНО- α – цитокин, значение которого в патогенезе остеоартрита привлекает многих авторов [11,12]. При патологии повышенные уровни ФНО- α присутствуют в синовиальной ткани и жидкости, а также в хрящах. Механизмы, посредством которых ФНО- α имитирует прогрессирование ОА, и сигнальные пути, на которые он влияет, остаются предметом исследований [12]. Было установлено, что ФНО- α способствует высвобождению матриксных металлопротеиназ из синовиальных фибробластов, что приводит к разрушению хряща, и ингибирует хондрогенез, подавляя выработку фактора транскрипции (SOX9) [10]. Обзор исследований *in vitro* показывает, что ингибирование ФНО- α в доклинических моделях способствовало восстановлению хряща и, в целом, улучшало жизнеспособность костно-хрящевой ткани, наблюдалась хондропротекция [5].

ИЛ-6 является важным медиатором воспаления, который участвует в процессах пролиферации, дифференцировки и апоптоза клеток. В тканях пораженного сустава выработка ИЛ-6 запускается в ответ на повышенные концентрации ИЛ-1 β и ФНО- α [10]. При ОА уровень ИЛ-6 возрастает в синовиальной жидкости и сыворотке крови, что коррелирует с рядом функциональных показателей тяжести ОА. Подобно ИЛ-1 и ФНО- α , ИЛ-6 снижает выработку компонентов хрящевого матрикса и приводит к увеличению продукции матриксных металлопротеиназ [9].

С использованием ИФА нам удалось измерить концентрации провоспалительных цитокинов и установить, что применение лекарственных препаратов: геля 0,5 %, геля 1 % и геля Амелотекс® 1 % способствовало снижению концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α в отличие от контрольной группы, которой после моделирования патологии наносили гелевую основу (рисунок 3). Наблюдаемые результаты могут быть обусловлены наличием в опытных составах нестероидного противовоспалительного средства (НПВС) – мелоксикама, который помимо ингибирования ЦОГ-2, обладая анаболическим действием, активно вмешивается в развитие патологического процесса при остеоартрите [13].

Выявленные отличия между испытуемыми средствами (гелем 0,5 %, гелем 1 %) и референтным препаратом по влиянию на уровень ИЛ-1 α и ФНО- α свидетельствуют о большей эффективности подобранной комбинации действующих веществ, ведь, в отличие от однокомпонентного геля Амелотекс®, разработанные составы дополнительно включали производное пурина и иммуномодулятор М. На рисунке 3 представлены результаты иммуноферментного анализа, отражающие концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α в крови крыс на 28 день эксперимента в испытуемых, контрольной и интактной группах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели адъювант-индуцированного остеоартрита проведена сравнительная оценка влияния нескольких мягких лекарственных форм на уровень провоспалительных цитокинов. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности испытуемых 0,5 % и 1 % гелей снижать уровень таких медиаторов воспаления, как ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α . При этом уменьшение концентрации ИЛ-6 сопоставимо с эффектом, оказываемым референтным препаратом – гелем Амелотекс® 1 %, а в случае с ИЛ-1 α и ФНО- α разработанные МЛФ показали лучшую динамику, что может быть связано с их более комплексным действием за счет введения в состав производного пурина и иммуномодулятора М.

Конечно, данные, полученные на доклинической модели, нельзя полностью экстраполировать на человека. Однако по результатам предыдущих и насто-

ящих исследований предполагается, что наибольший интерес для клинической практики представляет комбинированный состав МЛФ с половинной (0,5 %) концентрацией мелоксикама, поскольку его применение при высоком уровне эффективности дополнительно позволяет снизить вероятность возникновения нежелательных реакций со стороны НПВС, что важно в случае длительной терапии остеоартрита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang H., Cai D., Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):555–561. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.007.
2. Zhang P., Li K., Kamali A., Ziadlou R., Ahmad P., Wang X., Richards R. G., Alini M., Basoli V., Li Z., Grad S. Small molecules of herbal origin for osteoarthritis treatment: in vitro and in vivo evidence. *Arthritis Res Ther*. 2022;24(105). DOI: 10.1186/s13075-022-02785-y.
3. Ширинский В. С., Казыгашева Е. В., Ширинский И. В. Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе остеоартрита. *Медицинская иммунология*. 2019;21(1):39–48. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48.
4. Aspden R. M. Subchondral bone – a welcome distraction in OA treatment. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022;30(7):911–912. DOI: 10.1016/j.joca.2022.02.617.
5. Chisari E., Yaghmour K. M., Khan W. S. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):708–718. DOI: 10.1016/j.joca.2019.09.008.
6. Khella C. M., Horvath J. M., Asgarian R., Rolauffs B., Hart M. L. Anti-Inflammatory therapeutic approaches to prevent or delay post-traumatic osteoarthritis (PTOA) of the knee joint with a focus on sustained delivery approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(15):8005. DOI: 10.3390/ijms22158005.
7. Нораева У. В., Коцур Ю. М., Флисюк Е. В., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Титович И. А., Наркевич И. А., Антонов В. Г. Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):69–78. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78.
8. Нораева У. В., Наумова А. А., Новиньков А. Г., Флисюк Е. В., Буракова М. А., Шиков А. Н., Абросимова О. Н. Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):121–129. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129.
9. Van den Bosch M. H. J., van Lent P. L. E. M., van der Kraan P. M. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):532–543. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.016.
10. Раймуев К. В., Ищенко А. М., Малышев М. Е. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины в патогенезе остеоартрита. *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова*. 2018;10(3):19–27. DOI: 10.17816/mechnikov201810319-27.
11. Li H., Xie S., Qi Yu., Li H., Zhang R., Lian Y. TNF α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16:4737–4744. DOI: 10.3892/etm.2018.6770.
12. Yu F.-Y., Xie C.-Q., Jiang C.-L., Sun J.-T., Huang X.-Wu. TNF α increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the tolllike receptor3mediated ERK/AKT signaling pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine reports*. 2018;17(6):8475–8483. DOI: 10.3892/mmr.2018.8897.
13. Бадюкин В. В. Сложности выбор оптимального нестероидного противовоспалительного препарата: в фокусе мелоксикам. *Русский медицинский журнал*. 2016;26:1772–1776.

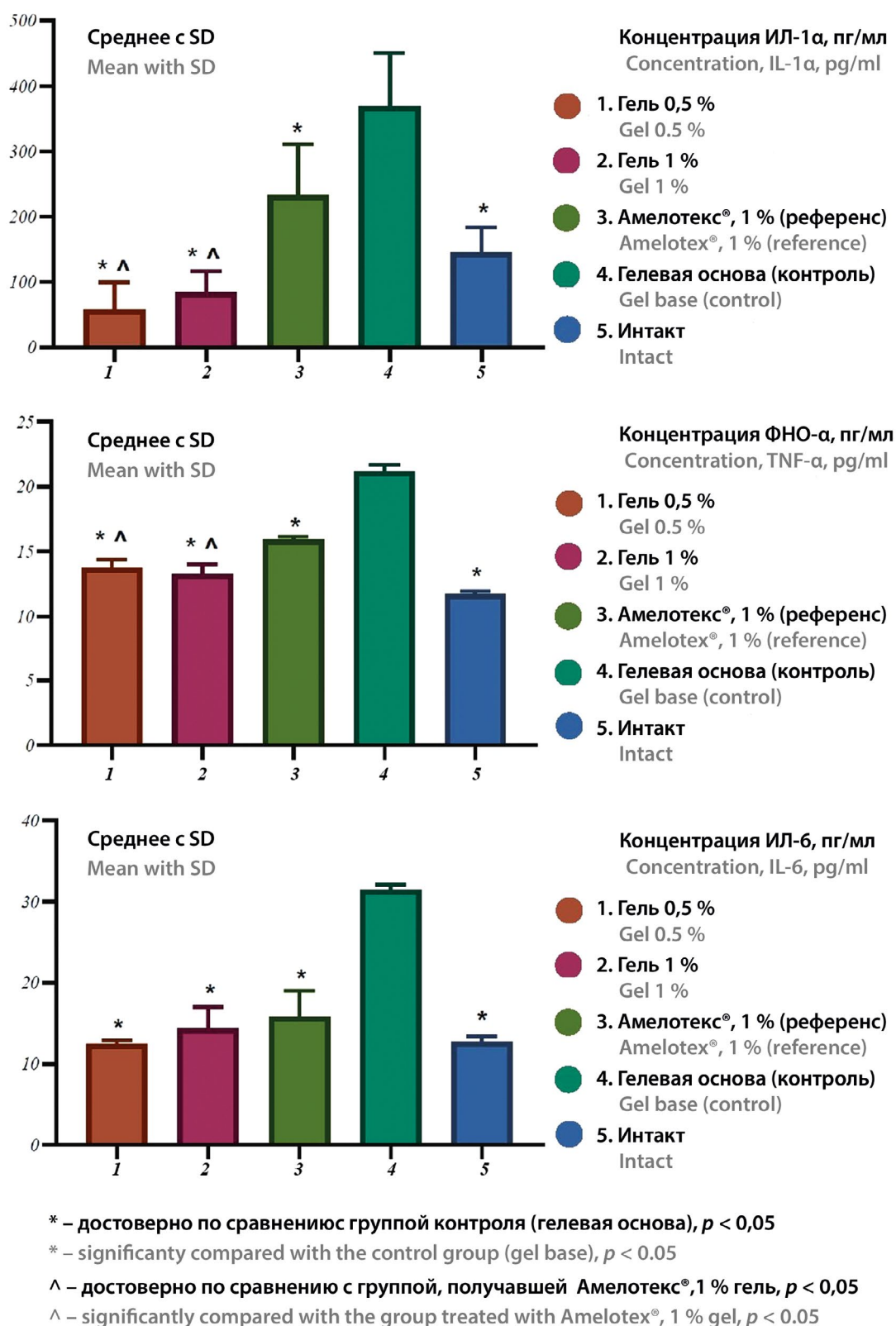


Рисунок 3. Результаты иммуноферментного анализа концентрации ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α в крови крыс на 28 день эксперимента

Figure 3. The results of enzyme immunoassay of the concentration of IL-1 α, IL-6 and TNF in the blood of rats on the 28th day of the experiment

REFERENCES

1. Zhang H., Cai D., Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):555–561. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.007.
2. Zhang P., Li K., Kamali A., Ziadlou R., Ahmad P., Wang X., Richards R. G., Alini M., Basoli V., Li Z., Grad S. Small molecules of herbal origin for osteoarthritis treatment: in vitro and in vivo evidence. *Arthritis Res Ther*. 2022;24(105). DOI: 10.1186/s13075-022-02785-y.
3. Shirinsky V. S., Kazygasheva E. V., Shirinsky I. V. Inflammation and immunity: a role of pathogenesis of osteoarthritis. *Medical Immunology*. 2019;21(1):39–48. (In Russ.) DOI: 10.15789/1563-0625-2019-1-39-48.
4. Aspden R. M. Subchondral bone – a welcome distraction in OA treatment. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022;30(7):911–912. DOI: 10.1016/j.joca.2022.02.617.
5. Chisari E., Yaghmour K. M., Khan W. S. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):708–718. DOI: 10.1016/j.joca.2019.09.008.
6. Khella C. M., Horvath J. M., Asgarian R., Rolaufts B., Hart M. L. Anti-Inflammatory therapeutic approaches to prevent or delay post-traumatic osteoarthritis (PTOA) of the knee joint with a focus on sustained delivery approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(15):8005. DOI: 10.3390/ijms22158005.
7. Nogaeva U. V., Kotsur Ju. M., Flisyuk E. V., Ivkin D. Yu., Semivelichenko E. D., Titivich I. A., Narkevich I. A., Antonov V. G. Development of the composition and technology of a combined gel for the treatment of osteoarthritis with a pharmacological rationale for the content of components. *Drug development & registration*. 2021; 10(4–1):69–78. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-69-78.
8. Nogaeva U. V., Naumova A. A., Novinkov A. G., Flisyuk E. V., Burakova M. A., Shikov A. N., Abrosimova O. N. Comparative study of rheological properties of gels and creams on different carrier bases. *Drug development & registration*. 2022;11(3):121–129. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-121-129.
9. Van den Bosch M. H. J., van Lent P. L. E. M., van der Kraan P. M. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):532–543. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.016.
10. Raymuev K. V., Ishenko A. M., Malyshev M. E. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Herald of North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov*. 2018;10(3):19–27. (In Russ.) DOI: 10.17816/mechnikov201810319-27.
11. Li H., Xie S., Qi Yu., Li H., Zhang R., Lian Y. TNF α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine*. 2018;16:4737–4744. DOI: 10.3892/etm.2018.6770.
12. Yu F.-Y., Xie C.-Q., Jiang C.-L., Sun J.-T., Huang X.-Wu. TNF α increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the tolllike receptor3-mediated ERK/AKT signaling pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine reports*. 2018;17(6):8475–8483. DOI: 10.3892/mmr.2018.8897.
13. Badokin V. V. Difficulties in choosing the optimal non-steroidal anti-inflammatory drug: focus on meloxicam. *Russian Medical Journal*. 2016;26:1772–1776. (In Russ.)