

УДК 616.72-002.772-085.357-092.4

ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИТОНИНА НА СОСТОЯНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНЫХ СТРУКТУР КРОЛИКОВ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АРТРИТОМ

С.В. Белова

Саратовский НИИ травматологии и ортопедии (410002, Саратов, ул. Чернышевского, 148)

Ключевые слова: ревматоидный артрит, миокальцик, внутрисуставная терапия.

На экспериментальной модели ревматоидного артрита обоснована возможность внутрисуставной терапии кальцитонином (препарат «Миакальцик») и предложен новый способ, предупреждающий развитие воспалительной деструкции в соединительных структурах коленного сустава (патент РФ № 2269355).

Распространенность ревматоидного артрита (РА) в человеческой популяции доходит до 1%, при этом экономические потери, связанные с данным заболеванием, сопоставимы с потерями от ишемической болезни сердца и злокачественных новообразований [3, 4, 11].

Как известно, характерным проявлением ревматоидного процесса является локальный и системный остеопороз, характеризующийся снижением минеральной плотности кости, а также патологическим изменением качества костной ткани, причем особое значение приобретает состояние субхондральной кости, во многом обеспечивающей метаболические процессы в суставном хряще.

Рентгенологически остеопороз проявляется атрофией субхондральной пограничной пластинки и размытой структурой костной ткани эпифиза. Прогрессирование нарушений ремоделирования костной ткани приводит к тому, что эпифизы пораженного сустава выглядят при рентгенографии прозрачнее, чем в норме [5].

Существует представление, что структурно-метаболическое состояние костной ткани во многом сопряжено с особенностями кальция-фосфорного обмена. Многие авторы рассматривают нарушение ремоделирования костной ткани как показатель тяжести заболевания и активности воспалительного процесса. При РА прогрессирование воспалительно-деструктивных процессов в суставах и костная резорбция находятся в тесной патогенетической взаимосвязи [12, 14].

В настоящее время для лечения остеопороза различной этиологии достаточно широко используется кальцитонин лосося – препарат «Миакальцик», применяемый и в комплексной терапии РА в виде подкожных и внутримышечных инъекций, а также интраназально (спрей) [6, 7]. Учитывая, что ведущими патогенетическими механизмами РА являются воспалительно-деструктивные процессы, в том числе и в субхондральной кости, можно предположить, что при внутрисуставном введении миакальцика

непосредственное воздействие на суставные ткани повысит эффективность терапии.

Цель исследования – анализ эффективности внутрисуставного воздействия кальцитонина при экспериментальном РА.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 40 половозрелых кроликах породы шиншилла русская весом 3–3,7 кг в соответствии со стандартами этического комитета и Хельсинской декларации 1975 г. и ее пересмотра в 1983 г. 10 интактных животных составили контрольную группу. У 30 кроликов путем введения овалбумина в правый коленный сустав был сформирован экспериментальный артрит [13]. 10 из них после этого внутрь коленного сустава вводился 0,9%-ный физиологический раствор (группа сравнения), 20 – препарат Miacalcic (Novartis Pharma AG, Швейцария) в дозе 10 МЕ 1 раз в неделю, общим курсом 4 инъекции (опытная группа).

Оценка состояния лабораторных животных осуществлялась при помощи клинических (осмотр, взвешивание, оценка поведения и активности, пальпация и измерение окружности сустава) и лабораторных методов. В крови определялись СОЭ, содержание гемоглобина, лейкоцитов и эритроцитов. Цитологически исследовались уровень общего цитоза и клеточный состав синовиальной жидкости. С помощью биохимических методов вычислялась концентрация общего (Fluitest Ca-CPC, фирма Biocon, Германия) и ионизированного (анализатор Ciba-Corning M 634, Великобритания) кальция, неорганического фосфора (Phosphorus UV FS, DiaSys, Германия). Проводилась оценка метаболизма соединительной ткани по общему содержанию гликозаминогликанов в сыворотке крови и их фракционному составу в синовиальной жидкости. Гистоморфометрическое исследование тканей коленных суставов животных выполнялось после окончания эксперимента.

Клинико-лабораторные исследования проводились в динамике: до моделирования РА, перед началом и после завершения лечения. Выведение животных из эксперимента осуществлялось путем воздушной эмболии через краевую вену уха. Статистическая обработка полученных данных проводилась методом вариационных рядов с вычислением средней арифметической, среднеквадратического отклонения, средней ошибки средней арифметической, коэффициента Стьюдента и показателя вероятности разности.

Результаты исследования. У всех животных опытной группы зарегистрирован синовит правого коленного

сустава с отеком, ограничением движения и повышением местной температуры. Описанные явления были более выражены на 3–4-е сутки после введения разрешающей дозы антигена, при этом наблюдалось максимальное увеличение окружности сустава, в среднем на 10–12 мм. Было обнаружено нарушение метаболизма соединительной ткани, выразившееся в снижении общего содержания гликозаминогликанов с одновременным нарастанием количества их сульфатированных форм в суставном содержимом и нарастании уровня гликозаминогликанов в сыворотке крови: уровень уоновых кислот – $2,73 \pm 0,07 \text{ г} \times 10^{-2} / \text{л}$ (норма – $1,71 \pm 0,11 \text{ г} \times 10^{-2} / \text{л}$), гепксоз – $4,43 \pm 0,07 \text{ г} \times 10^{-2} / \text{л}$ (норма – $2,58 \pm 0,11 \text{ г} \times 10^{-2} / \text{л}$).

При исследовании содержимого полости коленного сустава зарегистрированы цитоз и изменение качественного состава клеточных элементов, при этом наблюдалось значительное повышение количества нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, а у некоторых животных определялись рагоцитоподобные клетки с типичными включениями в цитоплазме, которые свидетельствовали о местной активности воспалительного процесса [5] (табл. 1). Общая активность воспалительного процесса также была повышена (табл. 2). Параллельно с этим обнаруживались признаки нарушения кальций-фосфорного обмена: повышение уровня кальция на фоне снижения содержания неорганического фосфора в сыворотке крови животных с экспериментальным артритом (табл. 3).

Гистоморфометрически обнаружены воспалительно-деструктивные изменения в тканях пораженных суставов. Микроструктура суставного хряща была изменена, имелись небольшие участки с разрыхленным и частично утраченным поверхностным слоем. В этих же местах располагались дистрофически измененные хондроциты. Наиболее выраженным признаком поражения была потеря гликозаминогликанов поверхностной и частично основной зонами суставного хряща, говорившая о деградации его матрикса. Микроскопическое строение субхондральной кости в большинстве случаев нарушалось, выявлялась тенденция к истончению субхондральной костной пластинки и трабекул, свидетельствующая о потере костного вещества.

После внутрисуставного введения миакальцика на фоне улучшения клинической картины и уменьшения

Общий цитоз и клеточный состав синовиальной жидкости при экспериментальном РА

Показатель	Контроль	Кролики с артритом ²		
		до лечения	миакальцик	физ. р-р
Цитоз, $10^9 / \text{л}$	$0,15 \pm 0,01$	$2,18 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,05$	$3,20 \pm 0,09$
Нейтрофилы, % ¹	$9,51 \pm 0,11$	$57,02 \pm 0,65$	$18,34 \pm 0,46$	$54,01 \pm 0,35$
Лимфоциты, % ¹	$8,43 \pm 0,09$	$44,95 \pm 0,42$	$5,39 \pm 0,08$	$53,18 \pm 0,51$
Макрофаги, % ¹	0	$46,34 \pm 0,47$	$0,95 \pm 0,25$	$55,80 \pm 0,61$
Рагоциты, % ¹	0	$33,15 \pm 0,46$	$0,85 \pm 0,28$	$36,15 \pm 1,10$

¹ Частота встречаемости, на поле зрения.

² Здесь и в табл. 2: разница по всем показателям между контрольной группой и группой «до лечения», между группами «до лечения» и «миакальцик», а также между группами «миакальцик» и «физ. р-р» статистически значима.

Гематологические показатели экспериментальных животных

Показатель	Контроль	Кролики с артритом		
		до лечения	миакальцик	физ. р-р
Гемоглобин, г/л	$124,30 \pm 0,80$	$120,70 \pm 0,20$	$123,50 \pm 0,44$	$119,02 \pm 0,35$
Эритроциты, $10^{12} / \text{л}$	$4,04 \pm 0,10$	$3,18 \pm 0,04$	$3,95 \pm 0,16$	$3,27 \pm 0,09$
Лейкоциты, $10^9 / \text{л}$	$7,60 \pm 0,11$	$11,19 \pm 0,11$	$7,89 \pm 0,11$	$13,50 \pm 0,27$
П/я нейтрофилы, %	$3,96 \pm 0,18$	$6,31 \pm 0,49$	$4,52 \pm 0,08$	$7,38 \pm 0,16$
С/я нейтрофилы, %	$42,60 \pm 0,81$	$53,93 \pm 0,46$	$44,25 \pm 0,54$	$55,08 \pm 0,62$
Лимфоциты, %	$47,80 \pm 0,84$	$32,13 \pm 0,37$	$44,65 \pm 0,63$	$28,15 \pm 0,47$
Эозинофилы, %	$1,49 \pm 0,10$	$2,46 \pm 0,06$	$1,71 \pm 0,07$	$3,22 \pm 0,09$
Моноциты, %	$3,44 \pm 0,12$	$4,49 \pm 0,07$	$3,68 \pm 0,08$	$4,17 \pm 0,14$

Показатели кальций-фосфорного обмена у экспериментальных животных

Показатель	Контроль	Кролики с артритом ¹		
		до лечения	миакальцик	физ. р-р
Са общ., ммоль/л	$2,89 \pm 0,02$	$3,41 \pm 0,06$	$2,80 \pm 0,04$	$3,55 \pm 0,09$
Са иониз., ммоль/л	$1,47 \pm 0,01$	$2,44 \pm 0,03$	$1,67 \pm 0,01$	$2,87 \pm 0,01$
Р неорг., ммоль/л	$2,45 \pm 0,13$	$2,05 \pm 0,19$	$2,29 \pm 0,14$	$1,79 \pm 0,17$

¹ Разница по всем показателям для общего и ионизированного кальция между контрольной группой и группой «до лечения», между группами «до лечения» и «миакальцик», а также между группами «миакальцик» и «физ. р-р» статистически значима.

отека сустава отмечались положительные сдвиги в результатах лабораторных анализов. О позитивных сдвигах в метаболизме соединительной ткани свидетельствовала практическая нормализация общего содержания и фракционного состава гликозаминогликанов в содержимом суставной полости. В сыворотке крови также наблюдалось снижение содержания гликозаминогликанов: уоновые кислоты – до $1,93 \pm 0,06 \text{ г} \times 10^{-2} / \text{л}$, гепксозы – до $3,30 \pm 0,10 \text{ г} \times 10^{-2} / \text{л}$.

В синовиальной жидкости снижался общий цитоз, реже обнаруживались лимфоциты, эозинофилы и рагоцитоподобные клетки, у интактных животных встречались лишь единичные нейтрофилы и лимфоциты (табл. 1). У больных РА наличие и количество рагоцитов в синовиальной жидкости является одним из

важных диагностических и прогностических признаков местной воспалительной активности процесса [2, 5]. Общая активность воспалительного процесса также уменьшалась: снижалось СОЭ, в крови увеличивалось количество эритроцитов и содержание гемоглобина, за счет палочко- и сегментоядерных форм уменьшалось количество лейкоцитов (табл. 2). Также наблюдалось улучшение показателей кальций-фосфорного обмена: снижался уровень общего и ионизированного кальция и повышалось содержание неорганического фосфора в сыворотке крови (табл. 3).

Эффективность внутрисуставного применения миакальцика в условиях экспериментального ревматоидного воспаления подтвердил и анализ результатов гистоморфометрического исследования. У животных опытной группы после внутрисуставного введения препарата патологические изменения параартикулярных тканей в виде незначительного утолщения были зафиксированы только в одном случае, когда суставной хрящ имел небольшие шероховатые участки в краевых зонах мышечков. Патологические изменения костной ткани у этих животных отсутствовали.

У всех животных группы сравнения отмечены значительные патологические изменения: параартикулярные ткани были утолщены и разрыхлены. Суставной хрящ на значительном протяжении был тусклым, зафиксирована порозность суставных поверхностей. У некоторых кроликов по краям наружных мышечков большеберцовой кости имелись остеофиты, сохранялось истончение субхондральной костной пластинки и трабекул.

Обсуждение полученных данных. Околосуставной остеопороз при РА, проявляющийся атрофией субхондральной пограничной пластинки и размытой структурой костной ткани эпифиза, является ранним рентгенологическим признаком заболевания, выявляющимся уже в первые недели развития суставной патологии. Дальнейшее прогрессирование остеопоретических явлений приводит к тому, что эпифизы пораженного сустава при рентгенографии выглядят более прозрачными, чем в норме [5]. Схожая картина наблюдалась и у кроликов с экспериментальным артритом.

Для коррекции описанных явлений в клинической практике широко используются препараты, модифицирующие метаболизм костной ткани. Одним из таких препаратов является кальцитонин лосося – препарат «Миакальцик». Эффективность применения данного препарата демонстрировали и другие экспериментальные исследования: показано положительное воздействие миакальцика на образование костной мозоли в эксперименте после перелома большеберцовой кости [9], на регенерацию нижней челюсти и восстановление суставного хряща у крыс-самок после овариэктомии [8, 15].

Современные данные демонстрируют воздействие кальцитонина лосося как на остеокласты, так и на хондроциты, при этом сделано заключение о его позитивном действии на состояние костной ткани, а также представлено прямое анаболическое действие

на хондроциты, выражающееся в повышенном синтезе гликозаминогликанов, показано тормозящее влияние на деградацию хрящевой ткани [10].

Таким образом, данное исследование демонстрирует положительное влияние кальцитонина на состояние соединительнотканых структур коленных суставов кроликов и позволяет предложить новый способ внутрисуставной терапии экспериментального артрита [1].

Литература

1. Белова С.В., Карякина Е.В., Блинникова В.В. Способ лечения ревматоидного артрита. Патент РФ № 2269355, опубл. 19.05.2004.
2. Клиническая ревматология: руководство для практических врачей / под ред. В.И. Мазурова. СПб.: Фолиант, 2001. 416 с.
3. Насонов Е.Л., Каратеев Д.В., Балабанова Р.М. Ревматоидный артрит // Ревматология: национальное руководство / под ред. В.А. Насоновой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 290–331.
4. Насонов Е.Л. Перспективы лечения ревматических болезней в начале XXI века // Тер. архив. 2011. Т. 83, № 5. С. 5–9.
5. Ревматические болезни: руководство для врачей / под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. М.: Медицина, 1997. 520 с.
6. Рубин М.П., Чечурин Р.Е. Диагностика, профилактика и лечение остеопороза в поликлинических условиях // Тер. архив. 2011. № 1. С. 32–38.
7. Торопцова Н.В., Михайлов Е.Е., Беневоленская Л.И. Проблема остеопороза в современном мире // Рус. мед. журнал. 2005. Т. 13, № 24 (248). С. 1582–1585.
8. Arisawa E.A., Brandão A.A., Almeida J.D., da Rocha R.F. Calcitonin in bone-guided regeneration of mandibles in ovariectomized rats: densitometric, histologic and histomorphometric analysis // Int. J. Oral. Maxillofac. Surg. 2008. Vol. 37 (1). P. 47–53.
9. Bulbul M., Esenyel C.Z., Esenyel M. [et al.] Effects of calcitonin on the biomechanics, histopathology, and radiography of callus formation in rats // J. Orthop. Sci. 2008. Vol. 13 (2). P. 136–144.
10. Karsdal M.A., Sondergaard B.C., Arnold M., Christiansen C. Calcitonin affects both bone and cartilage: a dual action treatment for osteoarthritis? // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007. Vol. 1117. P. 181–195.
11. Klareskog L., Cartina A.I., Paget S. Rheumatoid arthritis // Lancet. 2009. № 374. P. 659–672.
12. Park M.K., Her Y.M., Cho M.L. [et al.] IL-15 promotes osteoclastogenesis via the PLD pathway in rheumatoid arthritis // Immunol. Lett. 2011. Vol. 30, № 1–2. P. 42–51.
13. Pettipher E.R., Henderson B., Moncada S., Higgs G.A. Leucocyte infiltration and cartilage proteoglycan loss in immune arthritis in the rabbit // Br. J. Pharmacol. 1988. Vol. 95. P. 169–176.
14. Shinzawa M., Akiyama T. Regulation of central tolerance by RANKL signaling // Clin. Calcium. 2011. Vol. 21, № 8. P. 1193–1199.
15. Sondergaard B.C., Oestergaard S., Christiansen C. [et al.] The effect of oral calcitonin on cartilage turnover and surface erosion in an ovariectomized rat model // Arthritis Rheum. 2007. Vol. 56 (8). P. 2674–2678.

Поступила в редакцию 03.05.2012.

EFFECT OF CALCITONIN ON CONNECTIVE TISSUE IN RABBITS WITH EXPERIMENTAL ARTHRITIS

S.V. Belova

Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopedics
(148 Chernyishevskogo St. Saratov 410002 Russian Federation)

Summary – The paper provides data for substantiating the possibility of intra-articular therapy with calcitonin (Miacalcic) on the basis of experimental simulation of rheumatoid arthritis. The author offers a new method of preventing inflammatory destruction in the knee joint connective tissues (Russian Federation patent No. 2269355).

Key words: rheumatoid arthritis, miacalcic, intra-articular therapy.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 3, p. 38–40.