

## РОЛЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕНЕЗА ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СУСТАВОВ

Внуков В.В.<sup>1</sup>, Кролевец И.В.<sup>2</sup>, Плотников А.А.<sup>1</sup>, Ананян А.А.<sup>1</sup>, Колесников М.А.<sup>3</sup>,  
Милютина Н.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского  
ул. Стачки 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: natmilut@rambler.ru

<sup>2</sup> Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ  
Нахичеванский пер., 29, г. Ростов-на-Дону, 344022, РФ

<sup>3</sup> Городская клиническая больница № 2  
ул. Балакирева, 5, г. Ставрополь, 355018, РФ

Поступила в редакцию: 25.07.20

**Аннотация.** В работе исследовали уровни оксида азота, провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF $\alpha$ ), лептина и мочевой кислоты в плазме крови и синовиальной жидкости (СЖ) как биомаркеров посттравматического гонартроза (ПТГА), а также их ассоциацию с рентгенологической стадией ПТГА. Установлено, что у пациентов с ранними и поздними стадиями посттравматического артроза коленного сустава повышен уровень циркулирующих провоспалительных медиаторов: нитритов/нитратов (NOx-), IL-6 и мочевой кислоты по сравнению со здоровыми лицами. Циркулирующие уровни NOx-, IL-1 $\beta$ , IL-6, мочевой кислоты, лептина и комбинации IL-6 и лептина могут быть потенциальными диагностическими тестами в соответствии с результатами ROC-анализа. Уровни NOx-, IL-6, IL-18 и лептина в плазме достоверно коррелировали с их содержанием в СЖ. Тяжесть ПТГА коррелировала с уровнем лептина в плазме и СЖ, а также с уровнем синовиального IL-18. Исследована ассоциация полиморфных вариантов генов *nNOS* и *eNOS* с риском развития посттравматического гонартроза (ПТГА) у жителей Ростовской области. Установлено, что аллель -84A полиморфного гена *nNOS* ассоциирован с риском развития ПТГА.

**Ключевые слова:** посттравматический гонартроз, плазма крови, синовиальная жидкость, оксид азота, провоспалительные цитокины, лептин, гены NO-синтаз

Остеоартроз (ОА) – гетерогенная группа заболеваний различной этиологии, имеющая сходные биологические, морфологические и клинические проявления и исход, в основе которых лежит поражение всех компонентов сустава, в первую очередь – хряща, а также субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы и периартикулярных мышц [1, 2]. Ключевые события, происходящие при развитии ОА, включают дисбаланс анаболического и катаболического сигналов, управляемых цитокиновыми каскадами, повышенная продукция медиаторов воспаления и окислительный стресс [3, 4]. Важная роль в патогенезе ПТГА принадлежит оксиду азота (NO $\bullet$ ), который способствует развитию нитрозильной составляющей окислительного стресса и воспаления при дегенеративных заболеваниях суставов [5]. Известно, что при ОА хондроциты наряду с провоспалительными медиаторами генерируют оксид азота (NO $\bullet$ ), сверхпродукция которого осуществляется, главным образом, индуцибельной NO-синтазой [6,7]. В итоге, развитие нитрозильного стресса при артрозе как в тканях сустава, так и в крови способствует интенсификации программируемой клеточной гибели хондроцитов хрящевой ткани сустава и лейкоцитов периферической крови [8].

Высоко значимым фактором риска развития артроза является травма, которая способна инициировать процесс воспаления в тканях сустава, приводить к прогрессирующей дегенерации хряща и развитию посттравматического артроза [9]. В исследованиях [10, 11] показана роль полиморфных маркеров различных генов в предрасположенности к артрозу, в том числе, к посттравматическому гонартрозу.

Цель работы – исследование роли оксида азота и провоспалительных цитокинов как потенциальных биомаркеров прогрессирования посттравматического гонартроза (ПТГА), а также оценка полиморфизма гена нейрональной NO-синтазы (*NOS1*) в качестве предиктора предрасположенности к развитию ПТГА.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 134 пациентов с диагнозом ПТГА и 37 здоровых лиц (контроль). Все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от стадии ПТГА по шкале Kellgren–Lawrence (K/L) – ранние стадии по K/L  $\leq 2$  (1 группа), поздние стадии по K/L  $\geq 3$  (2 группа). Характеристика пациентов с ПТГА и здоровых лиц представлена в таблице 1.

Кровь (10 мл) отбирали в утренние часы натощак из локтевой вены в стерильные пробирки с K<sub>2</sub>-ЭДТА в качестве антикоагулянта, получали плазму крови. Синовиальную жидкость (СЖ) отбирали в стерильные пробирки с гепарином путем артроцентеза коленного сустава, далее центрифугировали; супернатант использовали для биохимического анализа.

Таблица 1. Характеристика пациентов с ПТГА и здоровых лиц

Характеристика	Здоровые доноры (n=37)	ПТГА	<i>p</i> *	ПТГА, подгруппы	
		Общая группа (n=134)		К/Л 1–2 (n = 103)	К/Л 3–4 (n = 31)
Возраст (годы)	40,19±10,11	43,63 ± 15,14	0,26	40,88±14,92	52,77±12,15
Пол (м/ж)	15/22	60/74	0,65	50/53	10/21
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )	26,07 ± 2,63	28,15 ± 5,59	0,15	28,18 ± 6,0	28,05±4,16

Демографические данные представлены как  $M \pm SD$

\* значение *p* для сравнения здоровых лиц и пациентов с ПТГА

ИМТ - индекс массы тела

В качестве провоспалительных медиаторов в плазме крови и синовиальной жидкости (СЖ) определяли содержание оксида азота по уровню нитритов/нитратов (NOx), а также уровни лептина, IL-1β, IL-6, IL-18, TNFα, мочевой кислоты. Уровни цитокинов и лептина измеряли с использованием коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (ELISA) - для IL-1β, IL-6, IL-18, TNFα (Vector-Best, Россия), для лептина (Leptin-DRG, США) в соответствии с инструкциями производителей.

Определение общего содержания нитритов/нитратов (NOx-) в плазме и СЖ проводили колориметрическим методом, основанном на реакции Грисса [12], с использованием спектрофотометра Beckman Coulter DU 800 (USA). Концентрацию мочевой кислоты (МК) определяли колориметрическим методом («Витал», Россия).

В группу для генотипирования SNP-локусов были включены 184 пациента с ПТГА (возраст 44,7±1,1 лет; 84 мужчин/100 женщин; ИМТ 28,1±0,54 кг/м<sup>2</sup>). В контрольную группу для SNP-типирования было включено 113 человек (возраст 42,1±1,5 лет; 50 мужчин/63 женщины; ИМТ 25,5±0,58 кг/м<sup>2</sup>) без признаков ПТГА в анамнезе, что было подтверждено рентгенологическим методом. Все обследованные пациенты имели русскую национальность и проживали на территории Ростовской области.

Для идентификации полиморфных аллелей генов *nNOS* и *eNOS* использовали ПЦР с последующей электрофоретической детекцией в агарозном геле. В исследовании были использованы дианостикумы «SNP-экспресс» (Литех, Москва). Пробы с замороженными при -30°C форменными элементами крови использовали для выделения ДНК с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (Литех). Анализ электрофореграмм осуществляли под ультрафиолетом ( $\lambda = 310$  нм) на трансиллюминаторе BioRad (США).

Статистический анализ проводился в пакетах программ Statistica 6.1 и SPSS 23.0. Критерий Колмогорова-Смирнова показал, что распределение данных отличается от нормального, поэтому для сравнения уровней провоспалительных медиаторов использовали непараметрические критерии Краскела-Уоллеса и *U*-тест Манна-Уитни. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического рангового коэффициента корреляции Спирмена (*r*). Логистическая регрессия проводилась для анализа влияния полиморфных локусов генов *NO*-синтаз на предрасположенность к развитию ПТГА, с расчетом отношений шансов (OR) с 95% доверительным интервалом (CI). Оценку диагностической информативности лабораторных тестов проводили с помощью метода построения характеристических кривых (ROC-анализ) [13]. Данные представлены как медиана (25-75% квартили) или частоты генотипов (%). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования потенциальных биомаркеров для диагностики артроза все еще находятся на переднем крае исследований [6]. Однако биомаркеры прогрессии ПТГА изучены в значительно меньшей степени. Основные выводы данного исследования заключаются в том, что некоторые циркулирующие биомаркеры, а именно уровень нитритов/нитратов, комбинация IL-6 и лептина, а также IL-1β, могут использоваться для прогнозирования возникновения ПТГА (ранний ПТГА в случае IL-1β). Уровни лептина в плазме и СЖ и уровень IL-18 в СЖ связаны с прогрессированием ПТГА.

Проведенное исследование показывает, что при ПТГА в плазме крови и синовиальной жидкости резко возрастает содержание провоспалительных медиаторов с наибольшим отличием от контроля в СЖ. Причем, уровни нитритов/нитратов, IL-1β, IL-6, мочевой кислоты и лептина в плазме крови значительно различались у пациентов с ранней и поздней стадиями ПТГА относительно контрольной группы (табл. 2). В то же время уровни этих медиаторов в СЖ были высокими, начиная с ранней стадии ПТГА. Уровни NOx-, IL-6, IL-18 и лептина в плазме достоверно коррелировали с их содержанием в синовиальной жидкости:  $r = 0,585$ ,  $p < 0,00001$ ;  $r = 0,457$ ,  $p = 0,0015$ ;  $r = 0,299$ ,  $p = 0,044$ ;  $r = 0,864$ ,  $p < 0,00001$ , соответственно. Как и ожидалось, было установлено, что ИМТ пациентов с ПТГА тесно коррелирует с уровнями лептина в плазме ( $r = 0,723$ ,  $p < 0,000001$ ) и СЖ ( $r = 0,604$ ,  $p = 0,0003$ ).

В ряде исследований предполагается, что для предотвращения развития ПТГА в поврежденных коленных суставах необходимо нейтрализовать провоспалительные цитокины, такие как IL-6, IL-8 и IL-1β [7, 14]. Повышенные уровни IL-6 и IL-8 наблюдались после повреждения передней крестообразной связки [15]. Полученные результаты показывают, что уровень IL-6 в плазме и СЖ был значительно выше у пациентов с ранней и поздней стадиями ПТГА, чем у здоровых лиц.

**Таблица 2.** Содержание провоспалительных медиаторов в плазме крови пациентов с ПТГА и здоровых лиц

Показатель	Контроль	ПТГА			<i>p</i>
		Общая группа	K/L 1-2	K/L 3-4	
NO <sub>x</sub> (μM/л)	15,81 (15,47-17,11)	23,88 (22,17 - 29,63)	23,88 (22,35 - 29,58)	24,26 (15,33 - 30,1)	<b>&lt;0,0001</b>
IL-1β (пг/мл)	0,85 (0,5-1,4)	1,25 (1,0 - 1,7)	1,4 (1,1 - 1,7)	1,2 (1,0 - 1,3)	<b>&lt;0,0185</b>
IL-6 (пг/мл)	1,29 (0,89-1,78)	2,75 (1,22 - 6,0)	3,13 (1,44 - 6,42)	2,22 (1,22 - 4,67)	<b>&lt;0,0001</b>
IL-18 (пг/мл)	147,0 (113,0-209,0)	138,17 (88,0 - 186,0)	147,17 (88,0 -196,0)	113,63 (83,5 -140,17)	<0,50
TNFα (пг/мл)	2,29 (1,0-3,43)	0,71 (0 -2,43)	0,43 (0 -1,43)	2,21 (0,36 -5,93)	<0.111
МК (μM/л)	218,51 (196,5-280,03)	344,99 (265,93 - 428,47)	355,18 (252,6 - 439,39)	329,69 (280,87 - 362,35)	<b>&lt;0,0017</b>
Лептин (нг/мл)	1,85 (1,26-8,50)	5,81 (1,76 -19,19)	4,32 (1,71 - 13,13)	12,94 (4,36 - 23,0)	<b>&lt;0.0346</b>

Данные представлены в виде медианы (25%; 75% квантили). Значения *p*, выделенные жирным шрифтом, являются статистически значимыми (*p* < 0,05).

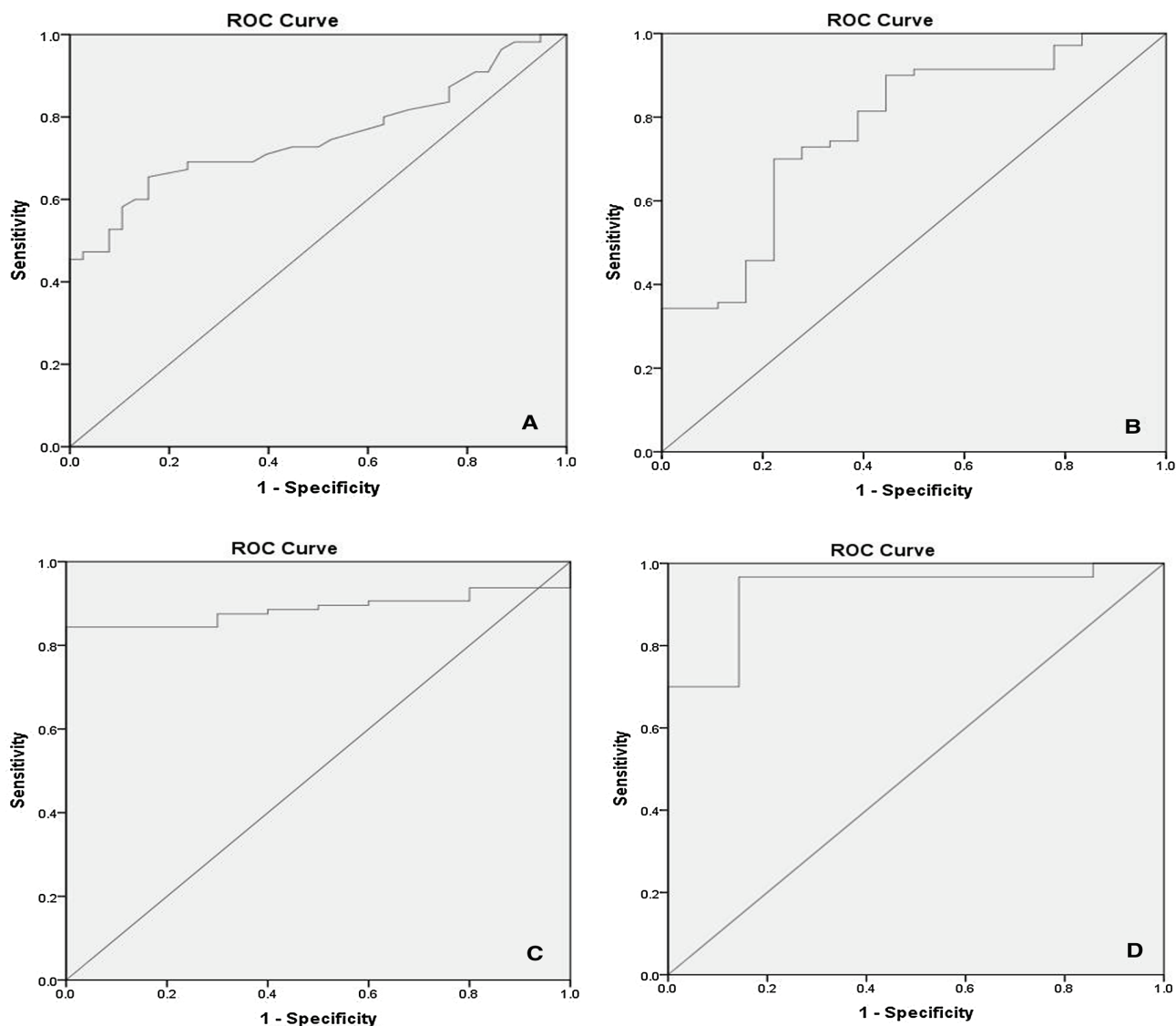
Было обнаружено, что циркулирующий IL-1β ассоциируется с ранней стадией ПТГА даже после корректировки по возрасту, полу и ИМТ (табл. 2). Это согласуется с результатами исследования [16], в котором IL-1β, по-видимому, не играл заметной роли в конечной стадии ОА, и исследованием [17], в котором более высокая синовиальная экспрессия IL-1β наблюдалась у пациентов с менее тяжелым ОА (оценка по K/L 2-3 против K/L 4). Концентрации IL-1β и IL-6 в СЖ были выше у пациентов с острым повреждением коленного сустава, чем базальные уровни данных цитокинов [15].

В процессе исследования не было обнаружено существенной разницы в уровне TNFα между пациентами с ПТГА и контрольной группой или между пациентами с ранней и поздней стадиями заболевания. Согласно данным литературы, TNFα не определялся или обнаруживался на низких уровнях в синовиальной жидкости у пациентов с посттравматическим ОА запястья, а также с первичным остеоартрозом коленного сустава [16]. Было показано, что синовиальная среда при повреждении передней крестообразной связки является в основном анаболической и воспалительной, с повышенными уровнями IL-1β и IL-6 и значительно сниженными уровнями TNFα [18].

Анализ ROC-кривых показал, что комбинация IL-6 и лептина в плазме дает лучшие параметры AUC (Area Under Curve, площадь под ROC-кривой), отличающие группу ПТГА от контроля (рис. 1). Обнаружена положительная корреляция между уровнями лептина в СЖ и плазме, а также корреляция между этими параметрами и тяжестью ПТГА согласно рентгенологическому методу, что согласуется с исследованием [19]. Кроме того, лептин можно считать маркером поздней стадии заболевания (табл. 2). Интересно, что, подобно IL-6, лептин, высвобождаемый жировой тканью, стимулирует проницаемость сосудов и стимулирует ангиогенез через факторы роста FGF-2 и VEGF [20]. Известно, что ангиогенез и воспаление являются взаимосвязанными процессами при ОА, которые могут влиять на прогрессирование заболевания и болевой синдром [19].

Синовиальный уровень ИЛ-18 достоверно коррелировал с тяжестью ПТГА, а концентрация мочевой кислоты в плазме была повышена у пациентов с ПТГА. В исследовании [21] продемонстрировано, что концентрация мочевой кислоты в СЖ коррелировала с синовиальными уровнями цитокинов IL-1β и IL-18, которые, как известно, продуцируются инфламмосомами, активированными мочевой кислотой. Фактически была показана связь синовиального IL-18 с прогрессированием ОА, что согласуется с нашими результатами. Интересно, что лептин усиливает секрецию IL-18 человеческими моноцитами путем модуляции функции инфламмосомы и активации каспазы-1 [22]. Однако в данном исследовании не наблюдалось корреляции IL-18 с уровнями лептина в плазме или СЖ (*p* > 0,05).

Ранее было показано, что лептин индуцирует выработку NO• посредством активации фосфорилирования eNOS [23] и усиления индуцирующего действия IL-1β на iNOS [24]. Наши результаты продемонстрировали повышение уровня NO<sub>x</sub>- в плазме крови и СЖ при ПТГА, особенно у пациентов с ранней стадией заболевания (табл. 2). Известно, что при ОА хондроциты наряду с провоспалительными медиаторами генерируют оксид азота (NO•), сверхпродукция которого осуществляется, главным образом, индуцибельной NO-синтазой. В результате ROC-анализа была показана прогностическая ценность определения уровня NO<sub>x</sub>- в плазме крови как предиктора ранней стадии ПТГА. Чувствительность теста равна 84,4%, специфичность - 100%, значения площади под ROC-кривой (area under curve, AUC) – 0,888 (0,826–0,949) при *p* < 0,00001. Следовательно, концентрацию NO<sub>x</sub>- можно считать маркером ранней стадии ПТГА.



**Рисунок 1.** ROC-кривые биомаркеров ПТГА в плазме крови. А – уровень IL-6; В - уровень мочевой кислоты; С – уровень NOx-; D – уровни IL-6 и лептина

Высокие локальные концентрации NO• негативно влияют на функции хондроцитов, ингибируя синтез компонентов матрикса – коллагена и протеогликанов, активируя металлопротеиназы, уменьшая экспрессию антагониста рецептора IL-1 $\beta$ , ингибируя пролиферацию хондроцитов [5].

Провоспалительные цитокины играют важную роль в образовании активных форм кислорода и азота (АФКА), которые вносят существенный вклад в прогрессирование артроза [25, 26]. Нитрозильный стресс, развивающийся в плазме крови и синовиальной жидкости пациентов с ПТГА, может быть обусловлен активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая экспрессируется в хрящевой ткани и продуцирует большие количества NO• под действием провоспалительных цитокинов [27]. Следует отметить, что iNOS, преимущественно, регулируется на уровне транскрипции, при этом промотор гена iNOS содержит сайты связывания многих транскрипционных факторов: AP-1, CREB, HIF, NF-kB и др., в том числе, индуцируемых IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  [28].

Таким образом, у пациентов с ранними и поздними стадиями посттравматического артроза коленного сустава повышен уровень циркулирующих провоспалительных медиаторов: нитритов/нитратов (NOx-), IL-6 и мочевой кислоты по сравнению со здоровыми лицами. Циркулирующие уровни NOx-, IL-1 $\beta$ , IL-6, мочевой кислоты, лептина и комбинации IL-6 и лептина могут быть потенциальными диагностическими тестами в соответствии с результатами ROC-анализа. Уровни NOx-, IL-6, IL-18 и лептина в плазме достоверно коррелировали с их содержанием в СЖ. Тяжесть ПТГА коррелировала с уровнем лептина в плазме и СЖ, а также с уровнем синовиального IL-18. Мультиномиальная логистическая регрессия показала, что более высокий уровень IL-1 $\beta$  в плазме был связан с ранней стадией ПТГА после поправки на возраст, пол и ИМТ.

Известно, что в хондроцитах человека под действием изоферментов синтазы оксида азота (NOS) синтезируется NO•, сверхпродукция которого показана при гонартрозе, что подтверждено использованием антител к нитротирозину [29]. NO• является ключевым индуктором апоптоза хондроцитов, приводящего к

дегенеративным изменениям тканей сустава. Содержание 3-нитротирозина, маркера нитрозильного стресса, коррелирует с уровнем апоптоза хондроцитов и степенью истощения протеогликанов при индуцированном артрозе. NO• при взаимодействии с супероксидом образует пероксинитрит и гидроксильные радикалы, повреждающие ткани и запускающие процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) [26]. Апоптоз хондроцитов и продукция NO• отмечаются на самых ранних стадиях артроза. NO• синтезируется с участием трех изоформ NO-синтаз: нейрональной nNOS (NOS1), индуцибельной iNOS (NOS2) и эндотелиальной eNOS (NOS3), при этом доказано, что все три изоформы NOS экспрессируются и активируются в хондроцитах ростовой пластинки [5]. Известно, что нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы играют важную роль в пролиферации, созревании и апоптозе хондроцитов. У nNOS- и eNOS-нокаутных мышей наблюдались нарушения данных процессов и сниженное количество пролиферирующих хондроцитов [30, 31]. Анализ литературы показывает, что ассоциация полиморфных маркеров генов NO-синтаз с развитием артроза слабо изучена.

Исследование роли полиморфного локуса -84G>A гена NOS1 показало, что аллель -84A ассоциирован с ПТГА, поскольку его наличие увеличивает в 2,02 раза риск развития патологии. Точечная замена в позиции -84G>A экзона 1с промотора гена nNOS, вероятно, вносит вклад в уменьшение экспрессии гена nNOS: генотип -84AA и аллель -84 A связаны со сниженной на 30 % экспрессией nNOS, что может снижать эффективность важнейшего сигнального пути NO/cGMP/cGMP-зависимые киназы [32]. Известно, что этот путь ингибирует активность каспаз, в том числе, благодаря регуляции генов семейства Bcl-2 [33]. По-видимому, репрессия данного пути может привести к активации каспазного каскада и индукции апоптоза.

Для определения связи между уровнем нитрозильного стресса, связанного с избыточной продукцией активных форм азота (АФА), и генотипом пациентов с ПТГА использовался множественный регрессионный анализ. В качестве зависимой переменной было принято содержание нитритов/нитратов (NOx-) в плазме или СЖ, в качестве независимых переменных – пол, возраст, индекс массы тела, рентгенологическая стадия заболевания и генотип локусов -786T > C eNOS и -84G > A nNOS. В результате для зависимой переменной – NOx- в плазме крови — в уравнение регрессии (коэффициент множественной корреляции R = 0,556; p = 0,029) были включены два предиктора:  $y = 3,7 - 0,026x_1 + 0,189x_2$ , где  $x_1$  — индекс массы тела пациента (p = 0,069), а  $x_2$  – пол пациента (p = 0,18): женский пол – 0, мужской – 1. Из всех переменных в уравнение регрессии (R = 0,567; p = 0,014) для содержания NOx- в синовиальной жидкости были также включены два предиктора:  $y = 2,5 - 0,199x_1 + 0,023x_2$ , где  $x_1$  – генотип локуса -786T > C eNOS (p = 0,049): TT — 0, TC — 1, CC — 2;  $x_2$  — ИМТ (p = 0,08). Результаты данного математического моделирования свидетельствуют о том, что варианты -786T>C гена eNOS статистически достоверно связаны с концентрацией нитритов/нитратов в СЖ при посттравматическом гонартрозе.

Сравнив уровни NOx- в СЖ трех групп пациентов, имеющих различные генотипы (-786 TT, TC, CC), обнаружена тенденция к различию этих трех групп (H = 5,9, p = 0,0523): при генотипе TT содержание NOx- составило 23,13 (21,78–26,64) мМ/л, при генотипе TC — 22,38 (13,82–23,68) мМ/л, при генотипе CC — 11,22 (11,09–16,70) мМ/л. Эти результаты согласуются с данными литературы о снижении активности промотора гена у здоровых лиц-носителей мутантного аллеля C [34]. Протеомный и экспрессионный анализ культуры эндотелиальных клеток человека с генотипом двух видов — TT и CC — показывает, что клетки с генотипом CC обладают сниженной экспрессией eNOS и сниженной способностью к синтезу NO•, по сравнению с клетками, имеющими генотип TT [35].

В настоящей работе нами не было выявлено ассоциации полиморфизма T-786C eNOS с риском развития ПТГА, однако в сочетании с генотипом локуса G-84A nNOS он может участвовать в определении степени риска развития данной патологии.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о развитии нитрозильного стресса в плазме крови и синовиальной жидкости при посттравматическом гонартрозе, при этом содержание нитритов/нитратов в СЖ было связано с генотипом локуса -786T>C гена eNOS: носительство мутантного аллеля -786 C приводит к снижению содержания NOx-. Аллель -84A гена nNOS ассоциирован с риском развития посттравматического ГА и повышением интенсивности апоптоза хондроцитов. Это подтверждается проведенным ранее электронно-микроскопическим исследованием хрящевой ткани пациентов с ПТГА, содержащей хондроциты, находящиеся на ранних и поздних стадиях программируемой клеточной гибели [8].

Таким образом, установлено, что циркулирующие уровни NOx-, лептина, IL-6, мочевой кислоты, и комбинации IL-6 и лептина могут быть информативными диагностическими биомаркерами развития ПТГА в соответствии с результатами ROC-анализа, а определение полиморфного маркера гена NOS1 (аллель -84A) ассоциированного с развитием ПТГА, повысит точность и информативность диагностики генетической предрасположенности к развитию посттравматического гонартроза.

#### Список литературы / References:

1. Loeser R.F., Steven R.G., Carla R.S., Goldring M.B. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.*, 2012, vol. 64, no. 6. DOI: 10.1002/art.34453.
2. Saito T., Tanaka S. Molecular mechanisms underlying osteoarthritis development: Notch and NF-κB. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, vol. 19, no. 94. DOI: 10.1186/s13075-017-1296-y.
3. Каратеев А.Е., Лиля А.М. Остеоартрит: современная клиническая концепция и некоторые перспективные терапевтические подходы. *Научно-практич. ревматол.*, 2018, т. 56, № 1. DOI: org/10.14412/1995-4484-2018-70-

81. [Karateev A.E., Lila A.M. Osteoarthritis: sovremennaya klinicheskaya koncepciya i nekotorye perspektivnye terapevicheskie podhody. *Nauchno-praktich. revmatol.*, 2018, vol. 56, no. 1. DOI: org/10.14412/1995-4484-2018-70-81. (In Russ.)]
4. Vnukov V.V., Panina S.B., Krolevets I.V., Milutina N.P., Ananyan A.A., Zabrodin M.A., Plotnikov A.A. Specificities of Oxidative Stress in the Blood and Synovial Fluid in Knee Osteoarthritis. *Advances in Gerontology*, 2015, vol. 5, no. 4. DOI: 10.1134/S2079057015040220.
5. Abramson S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, vol. 10, no. S2. DOI: 10.1186/ar2463.
6. Mabey T., Honsawek S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2015, vol. 6, no. 1. DOI: 10.5312/wjo.v6.i1.95.
7. Olson S.A., Horne P., Furman B., Huebner J., Al-Rashid M., Kraus V.B., Guilak F. The role of cytokines in posttraumatic arthritis. *Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2014, vol. 22, no. 1. DOI: 10.5435/JAAOS-22-01-29.
8. Vnukov V.V., Krolevets I.V., Panina S.B., Milyutina N.P., Ananyan A.A., Plotnikov A.A., Zabrodin M.A. The Association Between NO-Synthase Gene Polymorphisms and the Development of Post-Traumatic Knee Osteoarthritis Among Residents of Rostov Region. *Russian J. Genetics: Applied Research*, 2017, vol. 7, no. 2. DOI: 10.1134/S2079059717020150.
9. Anderson D.D., Chubinskaya S., Guilak F., Martin J.A., Oegema T.R., Olson S.A., Buckwalter J.A. Post-Traumatic Osteoarthritis: Improved Understanding and Opportunities for Early Intervention. *J. Orthop. Res.*, 2011, vol. 29, no 6. DOI: 10.1002/jor.21359.
10. Valdes A.M., Spector T.D. The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, 2008, vol. 34, no. 3, doi.org/10.1016/j.rdc.2008.04.008.
11. Valdes A.M., Doherty S.A., Muir K.R., Wheeler M., Maciewicz R.A., Zhang W., Doherty M. The genetic contribution to severe post-traumatic osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, vol. 72, no. 10. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202562.
12. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NOx-) в сыворотке крови. *Биомед. химия*, 2004, т. 50, № 1. [Golikov P.P., Nikolaeva N.Yu. Metod opredeleniya nitrita/nitrata (NOx-) v syvorotke krovi. *Biomed. himiya*, 2004, vol. 50, no. 1. (In Russ.)]
13. Simundic A.-M. Diagnostic Accuracy. Part 1: Basic Concepts: Sensitivity and Specificity, ROC Analysis, STARD Statement. *Point of Care*, 2012, vol. 11, no 1.
14. Furman B.D., Mangiapani D.S., Zeitler E., Bailey K.N., Horne P.H., Huebner J.L., Kraus V.B., Guilak F., Olson S.A. Targeting pro-inflammatory cytokines following joint injury: acute intra-articular inhibition of interleukin-1 following knee injury prevents post-traumatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2014, vol. 16, no. 3. DOI: 10.1186/ar4591.
15. Bigoni M., Sacerdote P., Turati M., Franchi S., Gandolla M., Gaddi D., Moretti S., Munegato D., Augusti C.A., Bresciani E., Omeljaniuk R.J., Locatelli V., Torsello A. Acute and late changes in intraarticular cytokine levels following anterior cruciate ligament injury. *J. Orthop. Res.*, 2013, vol. 31, no. 2. DOI: 10.1002/jor.22208.
16. Teunis T., Beekhuizen M., van Osch G.V.M., Schuurman A.H., Creemers L.B., van Minnen L.P. Soluble mediators in posttraumatic wrist and primary knee osteoarthritis. *Arch. Bone. Jt. Surg.*, 2014, vol. 2, no. 3. DOI: abjs.mums.ac.ir.
17. Ning L., Ishijima M., Kaneko H., Kurihara H., Arikawa-Hirasawa E., Kubota M., Liu L., Xu Z., Futami I., Yusup A., Miyahara K., Xu S., Kaneko K., Kurosawa H. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int. Orthop.*, 2011, vol. 35, no. 6. DOI: 10.1007/s00264-010-1045-1.
18. de Albornoz P.M., Forriol F. Changes in synovial fluid in different knee-joint diseases. *Rev. Esp. Cir. Ortop. Traumatol.*, 2012, vol. 56, no. 2. DOI: 10.1016/j.recote.2012.03.003.
19. Ku J.H., Lee C.K., Joo B.S., An B.M., Choi S.H., Wang T.H., Cho H.L. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin. Rheumatol.*, 2009, vol. 28, no. 8. DOI: org/10.1007/s10067-009-1242-8.
20. Cao R., Brakenhielm E., Wahlestedt C., Thyberg J., Cao Y. (2001) Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, no. 11. DOI: 10.1073/pnas.101564798.
21. Denoble A.E., Huffman K.M., Stabler T.V., Kelly S.J., Hershfield M.S., McDaniel G.E., Coleman R.E., Kraus V.B. Uric acid is a danger signal of increasing risk for osteoarthritis through inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 5. DOI: 10.1073/pnas.1012743108.
22. Jitprasertwong P., Jaedicke K.M., Nile C.J., Preshaw P.M., Taylor J.J. Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1 $\beta$ , from human monocytes via activation of caspase-1. *Cytokine*, 2014, vol. 65, no. 2. DOI: 10.1016/j.cyto.2013.10.008.
23. Vecchione C., Maffei A., Colella S., Aretini A., Poulet R., Frati G., Gentile M.T., Fratta L., Trimarco V., Trimarco B., Lembo G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*, 2002, vol. 51, no. 1. DOI: 10.2337/diabetes.51.1.168.
24. Joffin N., Niang F., Forest C., Jaubert A.-M. Is there NO help for leptin? *Biochimie*, 2012, vol. 94, no. 10. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.06.017.

25. Abramson S.B. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, vol. 16, no. S2. DOI: 10.1016/S1063-4584(08)60008-4.
26. Feelisch M. The chemical biology of nitric oxide — an outsider's reflections about its role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, vol. 16, no. 2. DOI: 10.1016/S1063-4584(08)60007-2.
27. Castro R.R., Cunha F.Q., Silva F.S.Jr., Rocha F.A. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis-evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, vol. 14, no. 8. DOI: 10.1016/j.joca.2006.01.013.
28. Pautz A., Art J., Hahn S., Nowag S., Voss C., Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 2010, vol. 23, no. 2. DOI: 10.1016/j.niox.2010.04.007.
29. Loeser R.F., Carlson C.S., Del Carlo M., Cole A. Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1 $\beta$  and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum.*, 2002, vol. 46, no. 9. DOI: 10.1002/art.10496.
30. Yan Q., Feng Q., Beier F. Endothelial nitric oxide synthase deficiency in mice results in reduced chondrocyte proliferation and endochondral bone growth. *Arthritis Rheum.*, 2010, vol. 62, no. 7. DOI: 10.1002/art.27486.
31. Yan Q., Feng Q., Beier F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, vol. 20, no. 2. DOI: 10.1016/j.joca.2011.11.014.
32. Miao X., Garcia-Barcelo M.M., So M., Tang W., Dong X., Wang B., Mao J., Ngan E.S., Chen Y., Lui V.C., Wong K.K., Liu L., Tam P.K. Lack of association between nNOS -84G > A polymorphism and risk of infantile hypertrophic pyloric stenosis in a Chinese population. *J. Pediatr. Surg.*, 2010, vol. 45, no. 4. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2009.07.067.
33. Olson S.Y., Garban H.J. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide*, 2008, vol. 19, no. 2. DOI: 10.1016/j.niox.2008.04.005.
34. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M., Shimasaki Y., Kugiyama K., Ogawa H., Motoyama T., Saito Y., Ogawa Y., Miyamoto Y., Nakao K. T-786 C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*, 1999, vol. 99, no. 22. DOI: 10.1161/01.cir.99.22.2864.
35. Asif A.R., Oellerich M., Armstrong V.W., Hecker M., Cattaruzza M. T-786C polymorphism of the nos-3 gene and the endothelial cell response to fluid shear stress – a proteome analyses. *J. Proteome. Res.*, 2009, vol. 8, no. 6. DOI: 10.1021/pr800998k.

#### ROLE OF THE NITROGEN OXIDE SYSTEM AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE PATHOGENETIC MECHANISMS OF DEGENERATIVE JOINT DISEASES

Vnukov V.V.<sup>1</sup>, Krolevets I.V.<sup>2</sup>, Plotnikov A.A.<sup>1</sup>, Ananyan A.A.<sup>1</sup>, Kolesnikov M.A.<sup>3</sup>, Milyutina N.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology,  
Stachky av., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: natmilut@rambler.ru

<sup>2</sup>Rostov State Medical University  
Nahichevansky lane, 29, Rostov-on-Don, 344022, Russia

<sup>3</sup>City Clinical Hospital No.2  
st. Balakireva, 5, Stavropol, 355018, Russia

**Abstract.** It was investigated the levels of nitric oxide, pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF $\alpha$ ), leptin and uric acid in blood plasma and synovial fluid (SF) as biomarkers of post-traumatic gonarthrosis (PTGA), as well as their association with radiological stage of PTGA. It was found that in patients with early and late stages of post-traumatic arthrosis of the knee joint, the level of circulating pro-inflammatory mediators: nitrites / nitrates (NO $x$ ), IL-6, and uric acid was increased compared with healthy individuals. Circulating levels of NO $x$ , IL-1, IL-6, uric acid, leptin, and a combination of IL-6 and leptin can be potential diagnostic tests according to the ROC curve analysis. Plasma levels of NO $x$ , IL-6, IL-18, and leptin significantly correlated with their levels in the SF. The severity of PTGA correlated with the level of leptin in plasma and SF, as well as with the level of synovial IL-18. The association of polymorphic variants of the nNOS and eNOS genes with the risk of developing post-traumatic gonarthrosis (PTGA) in residents of the Rostov region was studied. It has been established that the -84A allele of the nNOS polymorphic gene is associated with the risk of developing PTGA.

**Key words:** post-traumatic gonarthrosis, blood plasma, synovial fluid, nitric oxide, pro-inflammatory cytokines, leptin, NO synthase genes.