

УДК 616.72-002.77-02:546.171.6]-092.9

Л.А. Белоголовых¹, А.И. Дубиков¹, Е.Э. Медведь¹, И.Э. Гришина¹, О.А. Любарская¹, Т.А. Кабанцева¹,
Е.А. Борисенко²

¹Городская клиническая больница № 2 (Владивосток), ²Владивостокский государственный медицинский университет

ЗНАЧЕНИЕ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ АДЬЮВАНТНОГО АРТРИТА

Ключевые слова: адьювантный артрит, нейрональная и индуцибельная синтаза оксида азота, NADPH-диафораза.

Иммуноцитохимическим методом исследовали локализацию и активность нитроксидсинтаз в клетках синовии на модели ревматоидного артрита у 30 экспериментальных животных на разных стадиях воспалительного процесса. Установлено прямое участие нитроксидергических механизмов в развитии адьювантного артрита. Указанные механизмы определяются функцией синовиоцитов, активность нитроксидсинтазы в которых оказалась неоднородной: преобладание индуцибельной формы в острой фазе на фоне перманентного синтеза нейрональной формы в острой и хронической фазах, что, вероятно, может играть роль в трансформации острого артрита в хронический.

Введение. По современным представлениям ключевыми медиаторами иммунновоспалительного процесса при ревматоидном артрите (РА) являются фактор некроза опухоли- α и интерлейкин- 1β , которые регулируют выработку оксида азота [1, 4, 5]. В последнее время исследователей привлекает участие этого соединения в патогенезе артрита [6, 8, 9, 12, 14, 15]. Обнаружено, что концентрация нитритов в сыворотке крови у больных РА выше, чем у больных остеоартрозом, что отражает патофизиологическую сущность ревматоидного воспаления. При РА содержание нитритов в синовиальной жидкости значительно выше их концентрации в сыворотке крови, что подтверждает высокий уровень локального синтеза оксида азота в пораженных суставах и говорит о роли этого соединения в патогенезе синовита [9, 11, 13]. По данным экспериментальных исследований, подавление синтеза оксида азота ассоциируется с уменьшением признаков воспаления при различных формах экспериментальных артритов [2, 6, 12]. Несмотря на имеющиеся сведения о нитроксидергической функции синовиальной оболочки, требует уточнения динамика экспрессии нитроксидсинтазы (NOS) в тканях сустава на разных стадиях РА.

Целью настоящей работы явилось уточнение роли нитроксидсинтазной компоненты на разных этапах развития синовиального воспаления аутоиммунного генеза.

Материал и методы. В качестве объекта исследований выбрана линия мышей C57Black6, для которой характерен иммунный ответ с активацией Т-хелперов 1-го типа и которая позволяет адекватно воспроизвести адьювантный артрит (АА) [3, 7]. АА вызывали введением в подушечку задней лапки животных 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда (DIFCO). Работа выполнена на 30 мышках (самцах). 15 животных выводили из эксперимента по пять особей на 7, 14 и 30-е

сутки после введения адьюванта. Контроль — 15 интактных мышей. Эвтаназию животных осуществляли путем декапитации под тиопенталовым наркозом. Все эксперименты выполнены в соответствии с правилами бережного обращения с лабораторными животными в соответствии с приложением 4 к приказу № 755 Министерства здравоохранения РФ (2005).

Забор материала производился спустя 10 мин после эвтаназии. Задние лапки мышей были ампутированы и фиксированы в 3% растворе параформальдегида, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,4) в течение часа, затем хранились при комнатной температуре в декальцинирующем растворе (5,5 г ЭДТА, 90 мл дистиллированной воды и 10 мл 10% формалина). Часть образцов промывали в забуференном 30% растворе сахарозы в течение 12–24 часов при 4°C. На криотоме готовили серийные срезы толщиной 50 мкм (для гистохимической реакции на NADPH-диафорузу) и 20 мкм (для иммуногистохимической реакции). Часть материала заливали в парафин и окрашивали гематоксилином и эозином для интерпретации морфологических изменений.

Для определения суммарной активности нитроксидсинтазы в клетках синовиальной оболочки использовался метод V.T. Норе, S.R. Vincent на NADPH-диафорузу, с учетом того, что этот фермент является специфическим топахимическим маркером нитроксидсинтазы [10]. Активность фермента определяли по плотности преципитата в цитоплазме синовиоцитов и выражали в единицах оптической плотности (ЕОП).

На образцах синовиальной оболочки тиббиотарзального сустава экспериментальных животных изучали локализацию нейрональной и индуцибельной нитроксидсинтазы (nNOS и iNOS). Иммуноцитохимическое окрашивание срезов включало несколько этапов: преинкубацию, обработку в растворе первичных антител, обработку вторичными антителами и постановку иммунопероксидазной реакции. Последующая обработка вторичными антителами и постановка иммунопероксидазной реакции осуществлялись в соответствии с требованиями, прилагаемыми к ImmunoCruz Staining Sistem (Santa Cruz). Данные количественного анализа обрабатывали статистически с определением t-критерия достоверности по Стьюденту.

Результаты и обсуждение. Минимальная эффективная доза полного адьюванта Фрейнда, введенная в тиббиотарзальный сустав, вызывает развернутую картину аутоиммунного воспаления, которая коррелирует

с морфологическими признаками РА у человека. Гистологическая картина АА разделяется на два этапа: ранний артрит (до 14 дней от начала введения адьюванта) и поздний, или хронический, артрит (30-й день воспаления).

Активность NADPH-диафоразы у здоровых мышей линии C57Black6 установлена в синовиоцитах покровного и стромального слоев синовиальной оболочки. В покровном слое NADPH-диафоразопозитивные синовиоциты выявлялись в виде пласта из тесно прилежащих друг к другу однотипных по структуре и форме элементов. Интенсивность окрашивания позволила выделить три группы клеток: с высокой, умеренной и низкой активностью фермента. В покровном слое преобладали синовиоциты с умеренной активностью фермента (42–60 ЕОП). В субпокровном уровне диафоразопозитивные клетки отсутствовали. Нитроксидсинтазная активность по нейрональной изоформе зарегистрирована в синовиоцитах покровного, субпокровного и стромального слоев синовиальной оболочки. Доля nNOS-позитивных синовиоцитов составила 51,2±1,1%. Экспрессии iNOS в клетках синовиоцитов у контрольных животных не выявлено. В синовиальной оболочке мышей с АА NADPH-диафоразопозитивные синовиоциты с высокой активностью фермента обнаружены на покровном, субпокровном и стромальном уровнях. На 7-й и 14-й день эксперимента количество маркированных клеток, преимущественно с высоким уровнем активности фермента, увеличивалось в среднем на 30,4%. Активность доходила до высокого уровня (69,2±1,3 ЕОП), и при этом клетки с умеренным и низким содержанием NADPH-диафоразы практически не выявлялись (табл. 1). На 30-й день эти показатели заметно снижались, приближаясь к контрольному уровню.

Иммуноцитохимическое исследование показало возрастание активности iNOS в синовиоцитах на ранней стадии артрита. Большинство клеток локализовалось в покровном и стромальном слоях. Хроническая фаза воспалительной реакции характеризовалась снижением iNOS-иммунореактивного окрашивания клеток и усилением окрашивания на nNOS. Сравнительный анализ показал, что относительное количество iNOS-позитивных синовиоцитов резко отличалось от численности клеток, содержащих nNOS (табл. 2). Динамика воспаления характеризовалась не только изменениями активности iNOS, но и типологического паттерна маркируемых клеток: в 1-ю неделю адьювантного воспаления выявлялись в основном плеоморфные синовиоциты покровного и субпокровного слоя, а на поздней стадии – клетки стромального слоя с преобладанием iNOS-иммунореактивных фибробластов и лимфоцитов. Гетерогенная локализация конститутивной и индуцибельной NOS указывает на неоднородное участие оксида азота в развитии АА.

Таблица 1
NADPH-диафораза в синовиоцитах сустава мышей при адьювантном артрите

Клетки	Активность фермента, ЕОП		
	контроль	14-й день	30-й день
Макрофаги	57,2±1,4	69,2±1,3 ¹	60,1±3,4 ^{1,2}
Фибробласты	51,1±2,1	66,1±1,4 ¹	59,4±3,2 ^{1,2}

¹ Статистическая значимость различий по сравнению с контролем.

² Статистическая значимость различий между 14-м и 30-м днями.

Таблица 2
iNOS и nNOS в структурах синовиоцитов тиббиотарзального сустава мышей при адьювантном артрите

Клетки	Контроль, nNOS/iNOS	Доля iNOS-позитивных клеток, %		Доля nNOS-позитивных клеток, %	
		14-й день	30-й день	14-й день	30-й день
Лимфоциты	0/0	93,2±1,2 ¹	36,3±3,2 ^{1,2}	97,2±2,2 ¹	52,4±3,1 ^{1,2}
Синовиоциты	51,3±1,1/0	74,4±2,1 ¹	23,2±1,1 ^{1,2}	68,3±3,1 ¹	56,2±2,2 ^{1,2}

¹ Статистическая значимость различий по сравнению с контролем.

² Статистическая значимость различий между 14-м и 30-м днями.

Таким образом, установлено прямое участие нитроксидергических механизмов в развитии АА. Эти механизмы определяются функцией синовиоцитов, активность NOS в которых оказалась неоднородной: превалирование активности iNOS в острой фазе на фоне перманентного синтеза nNOS в острой и хронической фазе артрита, что, вероятно, может играть роль в трансформации острой фазы артрита в хроническую.

Литература

1. Дубиков А.И. Ревматоидный артрит, апоптоз, оксид азота. Новые аспекты патогенеза. — Владивосток, 2004.
2. Копьева Т.Н., Веникова М.С. Клиническая морфология артритов при ревматических заболеваниях. — М.: РАМН, 1992.
3. Плесковская Г.Н. // Ревматология. — 1991. — № 4. — С. 38–44.
4. Покровский В.И., Виноградов Н.А. // Тер. архив. — 2005. — № 1. — С. 82–87.
5. Сосунов А.А. // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, № 12. — С. 27–34.
6. Cannon G.W., Oppenshaw S.J., Hibbs J.B. et al. // Arthritis Rheum. — 1996. — Vol. 39. — P. 1677–1684.
7. Chillingworth N.L., Donaldson L.F. // J. Neurosci. Methods. — 2003. — Vol. 128, No. 1–2. — P. 45–52.
8. Connor J.A., Manning P.T., Settle S.L. et al. // Eur. J. Pharmacol. — 1995. — Vol. 273. — P. 15–24.
9. Grabowski P.S., Macpherson H., Ralston S.H. // Br. J. Rheum. — 1996. — Vol. 35. — P. 207–212.
10. Hope B.T., Vincent S.R. // J. Histochem. Cytochem. — 1989. — Vol. 37, No. 5. — P. 653–661.
11. Ishiuchi N., Yoshino S., Yokoyama M. et al. // Ryumachi. — 1999. — Vol. 39, No. 5. — P. 749–756.
12. McCartney-Francis N.L., Song X., Mizel D.E. et al. // J. Immunol. — 2001. — Vol. 166, No. 4. — P. 2734–2740.
13. Onur O., Akinci A.S., Akbiyik F. et al. // Rheum. Int. —

2001. — Vol. 20, No. 4. — P. 154–158.
14. Rediske J., Koehne C., Zhang B. et al. // *Osteoarthritis Cart.* — 1994. — Vol. 2. — P. 199–206.
15. Robert Clancy M., Amin Ashok R., Steven Abramson B. // *Arthritis Rheum.* — 1998. — Vol. 41, No. 7. — P. 1141–1151.

Поступила в редакцию 10.07.2008.

THE ROLE OF THE NITROXIDERGIC MECHANISMS IN THE DEVELOPMENT OF THE ADJUVANT ARTHRITIS
L.A. Belogolvyh¹, A.I. Dubikov¹, E.E. Medved², I.E. Grishina¹,
O.A. Lyubarskaya¹, T.A. Kabantseva¹, E.A. Borisenko²

¹ City Hospital No. 2 (Vladivostok), ² Vladivostok State Medical University

Summary — Immune cytochemical method was used in investigation of localization and activity of the nitro-oxidosynthases in synovial cells on model of rheumatoid arthritis at 30 experimental animals at different stages of inflammatory process. Direct participation of the nitroxidergic mechanisms in the development of the adjuvant arthritis is found. The specified mechanisms are determined by synovial cells function, in which nitro-oxidosynthases activity was non-uniform: prevalence of the induced forms in acute phase on a background of permanent synthesis of the neuronal form in acute and chronic phases, that, probably, can play role in transformation of acute arthritis into chronic.

Key words: adjuvant arthritis, neuronal and induced syntase of the nitrogen oxide, NADPH-diaphorase.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 4, p. 39–41.

УДК 616.36-002-022-036.12-076

Е.А. Алейникова, Б.А. Сотниченко, О.Г. Полушин, Л.Ф. Скляр

Владивостокский государственный медицинский университет

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ХРОНИЧЕСКИХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ

Ключевые слова: вирусные гепатиты, биопсия печени.

Представлены результаты комплексного обследования 233 больных хроническими вирусными гепатитами. Тонкоигольная биопсия в 100% случаев позволила обнаружить признаки вирусного поражения печени. Среди клинико-лабораторных данных отмечена умеренная корреляция между протромбиновым временем и индексом фиброза печени.

Введение. Хронические вирусные гепатиты (ХВГ) являются одной из актуальных проблем современной медицины. Это определяется их широкой распространенностью, высокой патогенностью, прогрессивным течением и развитием тяжелых осложнений в виде цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [4, 8]. В большинстве случаев наблюдается бессимптомное течение заболевания. Нарушение функций печени и соответствующая клиническая манифестация возникают лишь при далеко зашедших морфологических изменениях органа, когда суммарный объем поврежденных клеток достигает определенного критического уровня и истощаются механизмы адаптации и компенсации. Это является одной из главных причин трудностей клинической диагностики болезней печени.

Функциональные тесты в большинстве своем свидетельствуют об изменении активности клеток, а не о специфическом нарушении какой-либо функции, кроме того, эти показатели могут изменяться и при повреждении других органов либо оставаться нормальными при наличии морфологических изменений в печени [5, 9]. Инструментальное обследование также не представляет полной информации о тяжести патологического процесса при хронических вирусных гепатитах, о чем свидетельствует отсутствие корреляции между данными ультразвукового исследования с доплерографией, компьютерной, рентгеновской и магнитно-резонансной томографии и истинной активностью процесса, определяемой гистологически [15]. Поэтому основным ориентиром

в диагностике патологических процессов в печени являются морфологические критерии [5, 10, 15].

Результаты гистологических исследований биоптатов позволяют судить о степени активности гепатита и стадии фиброза, эффективности противовирусной терапии, исключают альтернативные диагнозы или выявляют дополнительные патологические изменения [6, 11, 15]. Ценность метода ограничивается вариабельностью получаемого образца ткани, который составляет всего 0,003% объема печени. Информативным считается биоптат длиной не менее 1 см (лучше 3 см), содержащий не менее 3–4 (лучше 6) портальных трактов [2, 5]. При этом существуют проблемы противопоказаний для проведения биопсии печени и возможности ее осложнений. По данным различных исследований, летальность после подобных манипуляций колеблется от 0 до 0,3% [2, 12, 14]. Тем не менее не существует лабораторных тестов или неинвазивных методов, которые могли бы надежно оценить некротовоспалительную активность, степень фиброза и структурное ремоделирование ткани печени, а именно эти данные играют важную роль в прогнозировании течения гепатита, обратимости выявленных изменений и в конечном счете определяют лечебную тактику.

Целью настоящей работы явился анализ эффективности исследования материалов чрескожных пункционных биопсий печени в диагностике хронических вирусных гепатитов.

Материал и методы. С 2001 по 2006 г. выполнено 248 чрескожных пункционных биопсий печени методом Менгини 233 больным ХВГ в возрасте от 15 до 52 лет. Среди них было 154 женщины и 79 мужчин. В 15 случаях биопсия проводилась дважды с целью контроля за течением заболевания. При серологическом и вирусологическом обследовании у 141