

УДК 616.833.154-001:612.013.2

НИТРОКСИДСИНТАЗА ТУЧНЫХ КЛЕТОК СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ МАКСИЛЛЯРНОЙ ПАЗУХИ КРЫС ПРИ ТРАВМЕ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО НЕРВА

С.С. Едранов

Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2)

Ключевые слова: оксид азота, слизистая оболочка, деафферентация.

Представлены результаты изучения локализации нитроксидсинтазы в тучных клетках слизистой оболочки максиллярной пазухи 15 половозрелых крыс в условиях экспериментальной травмы верхнечелюстного нерва. Показано, что формирование очагов повреждения в слизистой оболочке в результате деафферентации возникало в ближайший период после травмы. Тучные клетки экспрессировали индуцибельную нитроксидсинтазу и претерпевали дегрануляцию на стороне повреждения. Делается заключение, что нитроксидсинтезирующие тучные клетки опосредуют трофические (протективные) и/или токсические эффекты оксида азота в период восстановления после экспериментальной травмы верхнечелюстного нерва.

Тучные клетки (ТК) модулируют морфофункциональное состояние микроциркуляторного русла, оптимизируют локальный кровоток в условиях гипоксии, окислительного стресса и воспаления, определяют динамику восстановительных процессов и регенерацию ткани после повреждения [1, 5]. Предполагается, что влияние ТК на ближайшее микроокружение опосредует оксид азота (NO) [5, 6]. Индукция нитроксидсинтазы (NOS) в цитоплазме ТК описана в плевре и слизистой оболочке кишечника при различных типах иммунного воспаления [5, 6]. Установлено, что ТК активно дегранулируют в ответ на стрессовые и нейрогенные воздействия на ткань, однако состояние NOS в этих условиях остается не выясненной [1, 4].

В настоящей работе представлены результаты изучения локализации NOS в ТК слизистой оболочки максиллярной пазухи крыс в условиях экспериментальной травмы верхнечелюстного нерва.

Материал и методы. Использован материал 15 половозрелых крыс, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животных анестезировали с помощью внутривенного введения пентобарбитала натрия (30 мг/кг). Деафферентацию воспроизводили односторонним иссечением верхнечелюстного нерва на уровне его выхода из полости черепа в крыловидно-небную ямку. Локализацию активности NADPH-диафоразы (NADPH-d) и индуцибельной NOS (iNOS) изучали на срезах слизистой оболочки верхнечелюстного синуса на 1, 3, 7, 14 и 21-е сутки после перерезки нерва. Контролем служили интактные крысы. Все исследования выполнены согласно правилам бережного обращения с лабораторными животными этического комитета Владивостокского государственного медицинского университета.

Животных декапитировали, извлекали слизистую оболочку и фиксировали 4 часа в 4% забуференном

растворе параформальдегида (рН 7,2) при 4 °С. Затем в течение суток образцы ткани промывали в 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2) и 30 % растворе сахарозы. Криостатные срезы толщиной 20 мкм инкубировали в среде следующего состава: 0,1 мг/мл NADPH, 0,1 мг/мл нитросинего тетразолия, 0,3 % тритон X-100 на 50 мМ Трис-HCl-буфера (рН 8,0).

Для идентификации iNOS использовали поликлональные кроличьи антитела к iNOS (Cayman, 1:100). Срезы предварительно обрабатывали 1 % раствором перекиси водорода для ингибирования эндогенной пероксидазы (5 мин), 3 раза по 5 мин промывали в буфере и для блокирования мест неспецифического связывания антител в течение 1 часа выдерживали в 1 % растворе нормальной козьей сыворотки, приготовленном на 0,1М фосфатном буфере (рН 7,2) с добавлением 0,3 % тритона X-100. Срезы инкубировали в растворе первичных антител в течение суток при 4 °С, затем обрабатывали с авидин-биотин-пероксидазным комплексом с использованием готового набора реактивов Vectastain Elite Kit (Vector Laboratories). Отмытые в фосфатном буфере срезы помещали в проявочный раствор хромогена Vector NovaRed substrate (Vector Laboratories), степень окрашивания контролировали визуально. Часть срезов докрашивали 1 % раствором толуидинового синего. Срезы обезжировали и заключали в балзам по обычным правилам.

Для количественной оценки результатов исследования в каждом препарате выбирали срез стандартной толщины. Препараты изучали с помощью светового микроскопа, в окуляр которого была вставлена координатная сетка, позволявшая подсчитать все ТК слизистой оболочки, прореагировавшие с субстратами инкубационной среды в данном срезе. Содержание позитивно окрашенных ТК определяли как разность между суммой клеток, окрашенных толуидиновым синим, и суммой клеток, выявляемых при окрашивании срезов на NADPH-d и реакции на iNOS. Данные количественного анализа обрабатывали методами вариационной статистики.

Результаты исследования. В слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи крыс NADPH-d имела неоднородное распределение. У животных контрольной группы наибольшая активность фермента наблюдалась в бокаловидных клетках, призматическом эпителии и фибробластах. В слизистой оболочке этих крыс iNOS выявлялась в наиболее поверхностных участках некоторых эпителиальных клеток и в цитоплазме

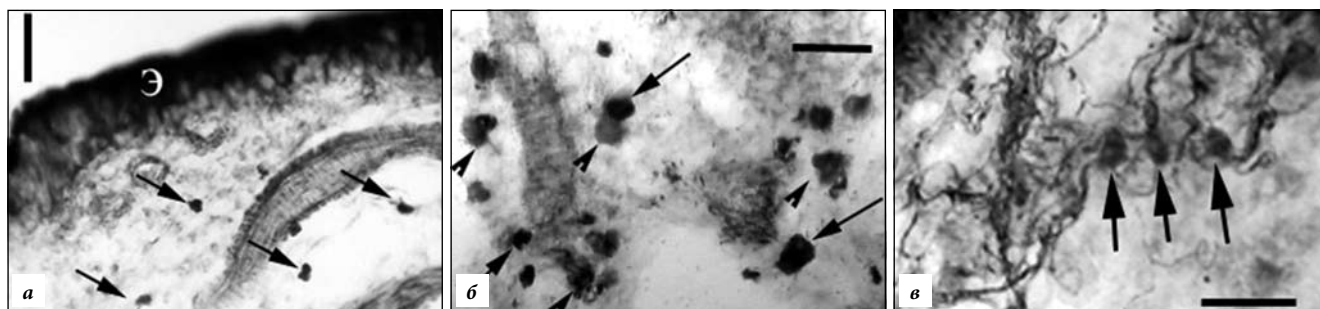


Рис. Локализация iNOS- и NADPH-d-позитивных ТК в слизистой оболочке верхнечелюстного синуса крысы после перерезки верхнечелюстного нерва:

а – ТК в собственной пластинке слизистой оболочки с индуцибельной формой NADPH-d (стрелки), 1-е сутки эксперимента (Э – NADPH-d-позитивные эпителиоциты); б – популяция NADPH-d-реактивных тучных клеток (стрелки) в подслизистой основе на 1-е сутки эксперимента (часть клеток в состоянии дегрануляции – треугольные стрелки); в – тесные ассоциации NADPH-d-реактивных нервных волокон с телами ТК (стрелки), 14-е сутки эксперимента; $\times 640$ (масштаб – 30 мкм).

единичных ТК, расположенных в собственной пластинке слизистой оболочки. Остальные тканевые элементы с антителами к iNOS не реагировали.

ТК начинают активно экспрессировать NADPH-d уже в 1-е сутки после деафферентации (рис., а). Они формировали две хорошо различимые популяции. В собственной пластинке слизистой оболочки обнаружена многочисленная популяция мастоцитов, при этом большинство из них ($61,7 \pm 7,3\%$) были диафоразопозитивными и некоторые имели признаки частичной или полной дегрануляции. В последнем случае можно было наблюдать характерные скопления NADPH-d-позитивных гранул диформаза, свободно распределенных в ткани (рис., б). При неполной дегрануляции ТК приобретали неровные, фестончатые очертания и были окружены единичными гистохимически активными гранулярными структурами. В ряде случаев можно наблюдать тесное пространственное прилегание NADPH-d-позитивных нервных волокон к телам позитивно и негативно окрашенных ТК. В этом случае нервное волокно проходило вдоль поверхности ТК и формировало по ходу несколько варикозных утолщений (рис., в).

Динамика активности NADPH-d и iNOS в популяции ТК менялась в зависимости от срока травмы. На стороне повреждения в собственной пластинке регистрировались два всплеска активности этих элементов – на 3-и и 21-е сутки эксперимента (табл.). В этом временном диапазоне число ТК превышало контрольные цифры в 3–4 раза, при этом количество NADPH-d-позитивных элементов снижалось от 61 % на 3-и сутки до 6,2 % к 21-му дню эксперимента. В подслизистой основе максимальная концентрация ТК наблюдалась к 7-му дню эксперимента, при этом почти половина их экспрессировала NADPH-d и большая часть находилась в состоянии дегрануляции.

Популяция ТК противоположной пазухи не оставалась безучастной к деафферентации. В подслизистой основе отмечалось постепенное нарастание числа мастоцитов, которое превышало контрольные цифры в 2,5–3 раза, оставаясь на таком уровне вплоть

до конца эксперимента. В разные периоды патологического процесса на долю диафоразопозитивных элементов приходилось от 36 до 66 % ТК, большинство из которых находились в состоянии дегрануляции. Наблюдаемое в дальнейшем постепенное уменьшение числа ТК не сопровождалось достижением контрольных цифр.

Популяция iNOS-экспрессирующих ТК собственной пластинки и подслизистой основы имела специфическую динамику продукции фермента. В собственной пластинке наблюдается отчетливая двухфазная динамика с максимумом на 3–7-е и 21-е сутки эксперимента, а в тканях подслизистой единичный всплеск активности приходился на 3–7-е сутки (табл.). При этом реактивность мастоцитов собственной пластинки отмечалась уже на самых ранних этапах – начиная с 1-х суток здесь встречались единичные или сгруппированные по 2–3 интенсивно окрашенные клетки, локализовавшиеся вокруг кровеносных сосудов или непосредственно под базальным слоем эпителия.

Обсуждение полученных данных. Таким образом, установлена топография NADPH-d и индукция NOS/NADPH-d в ТК слизистой оболочки максиллярной пазухи крыс в результате экспериментальной деафферентации верхнечелюстного нерва. Модуляторные влияния оксида азота устраняют общую дезинтеграцию межклеточных взаимодействий и молекулярно-биохимических механизмов, возникающих при деафферентации, восстанавливая их нормальный баланс [2, 9]. В ТК при деафферентации наблюдается стойкое увеличение экспрессии NADPH-d, которое соотносится с активностью фермента в других клетках и нервных волокнах слизистой оболочки. В целом можно выделить два типичных механизма, морфологические проявления которых встречаются на протяжении всего исследуемого периода после перерезки максиллярного нерва. В тех участках слизистой оболочки, где активность фермента в эпителии минимальна, значительная популяция ТК становится NADPH-d-позитивной, а сами клетки находятся

Таблица

Активность NADPH-d и iNOS в ТК слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи крысы при односторонней деафферентации

Структура	Контроль	1-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
NADPH-d						
ТК собственной пластинки, %	0,0	61,42±7,30	20,00±8,50	36,45±7,70	0,0	6,20±1,59
ТК подслизистой основы, %	0,0	47,64±6,60	36,10±4,50	46,86±2,10	0,0	39,33±16,10
iNOS						
ТК собственной пластинки, %	3,1±1,4	12,78±3,29	19,53±2,99	18,40±6,10	9,26±3,50	41,5±4,88
ТК подслизистой основы, %	6,2±2,2	4,20±0,90	22,46±11,59	22,87±8,38	16,46±2,67	10,80±3,90

в состоянии дегрануляции. Однако при повышении активности фермента в эпителиальной ткани в цитоплазме ТК активность NADPH-d, напротив, снижается. Последние в этом случае не дегранулируют. Изменения в активности iNOS хотя и не столь явно выраженные, но заметные, происходят и на стороне, противоположной повреждению, и носят, вероятно, компенсаторный характер.

Причины индукции фермента в ТК могут быть инициированы дегенеративными, метаболическими и ишемическими изменениями, которые неизбежно возникают вследствие деафферентации. Как известно, индукция NOS обратима и носит адаптивный характер [7]. С момента индукции и до начала наработки оксида азота проходит не менее суток, и именно в течение этого периода происходит транскрипция и экспрессия белковых субъединиц фермента [7]. В свою очередь последствия индукции фермента связаны с деструктивными и/или протективными влияниями оксида азота на ближайшее микроокружение [10].

Хотя молекулы оксида азота в свободном состоянии существуют всего несколько секунд, длительность их действия может измеряться часами [8]. Эндогенное образование этого соединения в ответ на какое-либо изменение внутренней среды приводит к высвобождению ряда других регуляторов, в том числе модуляторных пептидов, для которых нитроксидзависимый сигнал является индуктором. Эффекторная последовательность этих факторов образует так называемый «регуляторный континуум», где их совместное действие однонаправленно, а конечный эффект будет суммированным и продолжительным [12]. Так, оксид азота регулирует активность рецепторов про- и противовоспалительных цитокинов на мембране ТК [11, 13]. Как правило, подобные «цитокиновые» эффекты сопровождаются их влиянием на образование оксида азота и способность тучных клеток к дегрануляции [4].

Включение оксида азота в структуру посттравматических реакций дополняется его иммуномодулирующим действием. Эта активность опосредована экспрессией iNOS в цитоплазме тучных клеток при участии гистамина и ряда цитокинов, таких как γ -интерферон, фактор некроза опухоли- α , интерлейкины 1, 4 и 1 β [14]. Значительная продукция оксида

азота противостоит вазоконстрикторному действию этих молекул, затормаживает дальнейшее выделение гистамина из тучных клеток и может препятствовать развитию метаболической компенсации повреждения. Для синтеза оксида азота в цитозоле тучных клеток требуется NADPH. Этот же кофермент необходим для возникновения радикалов кислорода с образованием супероксид-цитотоксической макрофагальной системы. Таким образом, в результате экспрессии iNOS уровень наработки оксида азота в тучных клетках резко повышается, достигая критических параметров, при которых его деструктивные эффекты становятся преобладающими. Они реализуются посредством вторичного образования токсических анион-радикалов и пероксинитритов [3].

Полученные данные позволяют заключить, что:

- 1) формирование очагов повреждения в слизистой оболочке крыс в результате деафферентации верхнечелюстного нерва возникает уже в ближайший период после травмы;
- 2) тучные клетки экспрессируют iNOS и дегранулируют на стороне повреждения;
- 3) нитроксидсинтезирующие тучные клетки опосредуют трофические (протективные) и/или токсические эффекты оксида азота в период восстановления после экспериментальной травмы верхнечелюстного нерва.

Литература

1. Зуга М.В., Мотавкин П.А. Морфологические основы холинореактивности тучных клеток органов дыхания // *Морфология*. 1998. Т. 114, № 4. С. 72–77.
2. Choi B.M., Pae H.O., Jang S.I. et al. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2002. Vol. 35, No. 1. P. 116–126.
3. Crosswhite P., Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension // *J. Hypertens.* 2010. Vol. 28, No. 2. P. 201–212.
4. Estévez A.G., Jordán J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail // *Ann. NY Acad. Sci.* 2002. Vol. 962, No. 3. P. 207–211.
5. Galli S.J., Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity // *Eur. J. Immunol.* 2010. Vol. 40, No. 7. P. 1843–1851.
6. Horny H.P., Sotlar K., Valent P. Differential diagnoses of systemic mastocytosis in routinely processed bone marrow biopsy specimens: a review // *Pathobiology*. 2010. Vol. 77, No. 4. P. 169–180.
7. Lundberg J.O. Nitric oxide and the paranasal sinuses // *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2008. Vol. 291, No. 11. P. 1479–1484.
8. Malinski T., Taha Z., Grunfeld S. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microensors // *Bio-*

- chem. Biophys. Res. Comm. 1993. Vol. 193, No. 7. P. 1076–1082.
9. Niidome T., Morimoto N., Iijima S. et al. Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation // *Eur. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 548, No. 1–3. P. 1–8.
 10. Sánchez C.A., Hallberg J., Lundberg J.O. et al. Nasal nitric oxide and regulation of human pulmonary blood flow in the upright position // *J. Appl. Physiol.* 2010. Vol. 108, No. 1. P. 181–188.
 11. Tham C.L., Liew C.Y., Lam K.W. et al. A synthetic curcuminoid derivative inhibits nitric oxide and proinflammatory cytokine synthesis // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. Vol. 628, No. 1–3. P. 247–254.
 12. Thermos K. Novel signals mediating the functions of somatostatin: the emerging role of NO/cGMP // *Mol. Cell Endocrinol.* 2008. Vol. 286, No. 1–2. P. 49–57.
 13. Tzeng S.F., Huang H.Y. Downregulation of inducible nitric oxide synthetase by neurotrophin-3 in microglia // *J. Cell. Biochem.* 2003. Vol. 90, No. 2. P. 227–233.
 14. Weinberger B., Fakhrzadeh L., Heck D.E. et al. Inhaled nitric oxide primes lung macrophages to produce reactive oxygen and nitrogen intermediates // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998. Vol. 158, No. 3. P. 931–938.

Поступила в редакцию 12.03.2011.

NITRIC OXIDE SYNTHASES OF MAST CELLS OF MUCOUS COAT OF RAT'S MAXILLARY SINUS IN CASE OF MAXILLARY NERVE INJURY

S.S. Edranov

Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The paper provides results of research into localisation of nitric oxide synthase in mast cells of mucous coat of 15 sexually mature rats under the conditions of experimental injury of maxillary nerve, and indicates that the lesions in the mucous coat have resulted from deafferentation occurred right after the injury. The mast cells produced nitric oxide synthase and degranulated in the area of the injury. The authors consider that the nitric oxide synthase-inducing mast cells mediate the trophic (protective) and/or toxic effects from the nitric oxide during reconvalescence period after the experimental injury of the maxillary nerve.

Key words: nitric oxide, mucous membrane, deafferentation.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 4, p. 53–56.

УДК 616.71-007.235:616.12-008.331-07

ХОЛЕСТЕРИНОВЫЙ ОБМЕН В ПЛАЦЕНТЕ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

М.Т. Луценко, И.В. Довжикова

Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания СО РАМН (675000 г. Благовещенск, ул. Горького, 95а)

Ключевые слова: плацента, холестерин, гормоны, герпесвирусная инфекция.

Во время беременности вырабатывается целый ряд стероидных гормонов, крайне необходимых для развития плода и родовой деятельности. Формирование этих гормонов происходит за счет холестерина плаценты. Вирусные повреждения организма матери во время гестации угнетают процесс образования не только стероидных гормонов, но и содержание источника их образования – холестерина. В работе изложен материал, отражающий изменение содержания холестерина в плаценте и уровней гормонов в плаценте и периферической крови 30 беременных, перенесших во время гестации обострение герпесвирусной инфекции.

Холестерин – стероид, который играет в организме незаменимую роль, принимая участие в построении клеточных мембран, формировании желчных кислот и стероидных гормонов [4–6, 8]. Биосинтез холестерина происходит и в плаценте, которая во время беременности становится источником стероидных гормонов [3, 7–9]. При обострении герпесвирусной инфекции у беременных отмечается снижение содержания плацентарных гормонов как в периферической крови, так и в самой плаценте [1, 2]. Это снижение, по-видимому, связано с недостаточным содержанием холестерина как источника образования гормонов.

Целью настоящего исследования является попытка показать, что уровень содержания холестерина в

плаценте беременных зависит от степени агрессивности герпесвирусной инфекции, которую беременная перенесла в третьем триместре.

Материал и методы. У 30 беременных с обострением герпесвирусной инфекции в третьем триместре определяли содержание холестерина и плацентарных гормонов в гомогенате плаценты. Контролем послужили 20 плацент от женщин, не болевших на протяжении всего периода гестации.

Титр антител в крови к вирусу герпеса I типа по динамике антител иммуноглобулина G и содержание холестерина в гомогенате плаценты определяли спектрофотометрическим методом с использованием стандартных наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) на приборе Stat Fax 2100 Plus (USA). Уровень эстрадиола, эстриола и прогестерона определяли иммуноферментным методом с помощью реагентов ЗАО НВО «Иммунотех» (Москва), дегидроэпиандростеидиола сульфата (ДЭАС) – с помощью реагентов ЗАО «Алкор Био» (Санкт-Петербург). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием t-критерия Стьюдента.

Работа выполнена на базе стационара акушерского отделения клиники Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН. Все исследования проведены с учетом требований Хельсинской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских

Луценко Михаил Тимофеевич – д-р мед. наук, профессор, действительный член АМН РФ, заведующий лабораторией ДНЦ физиологии и патологии дыхания СО РАМН; e-mail: lutcenkomt@mail.ru