**Белоголовых Людмила Александровна. Нитроксидергические механизмы адъювантного артрита : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.25 / Белоголовых Людмила Александровна; [Место защиты: ГОУВПО "Владивостокский государственный медицинский университет"].- Владивосток, 2006.- 128с.: ил.**

ГОУ ВПО ВЛАДИВОСТОКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ «ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ»

На правах рукописи

**04 2.00 7 G4433 -**

БЕЛОГОЛОВЫХ Людмила Александровна

**НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АДЪЮВАНТНОГО**

**АРТРИТА**

03 00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор ШУМАТОВА Татьяна Александровна Научный консультант доктор медицинских наук, профессор МОТАВ КИН Павел Александрович

Владивосток - 2006

[**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 4**](#bookmark1)

**ВВЕДЕНИЕ 5**

[**ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 11**](#bookmark3)

1. [**Современные аспекты патогенеза аутоиммунного синовита 11**](#bookmark4)
2. [**Роль N0 в развитии заболеваний опорно­двигательного аппарата 28**](#bookmark7)
3. [**Молекулярные свойства N0 28**](#bookmark9)
4. [**Топография NO-синтазы в хряще и синовиальной оболочке сустава 34**](#bookmark10)

**1.2.3.Значение N0 в развитии аутоиммунного синовита**

[**и дистрофии хряща 37**](#bookmark13)

[**ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 43**](#bookmark14)

* 1. [**Материал исследования 43**](#bookmark15)
  2. [**Методы исследования 48**](#bookmark16)

**2.2.1.Общеморфологический метод 48**

* + 1. [**Гистохимические исследования 49**](#bookmark20)
    2. **Иммуноцитохимические исследования 51**
    3. [**Метод электронной микроскопии 52**](#bookmark21)
    4. [**Статистическая обработка данных 53**](#bookmark22)

**ГЛАВА 3. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ NADPH-**

**ДИАФОРАЗЫ И NO-СИНТАЗ В СИНОВИАЛЬНОЙ**

**ОБОЛОЧКЕ И ХРЯЩЕ ТИБИОТАРЗАЛЬНОГО СУСТАВА У ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ 54**

1. [**Характеристика синовиальной оболочки 54**](#bookmark24)
2. [**Характеристика хряща 60**](#bookmark25)

**ГЛАВА 4. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ NADPH-**

**ДИАФОРАЗЫ И NO-СИНТАЗЫ В СИНОВИОЦИТАХ И ХОНДРОЦИТАХ ПРИ АДЪЮВАНТНОМ АРТРИТЕ ....64**

1. [**Характеристика синовиальной оболочки 64**](#bookmark27)
2. [**Характеристика хряща 78**](#bookmark34)

**ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ПРЕДНИЗОЛОНА И N-НИТРО-Ь-АРГИНИНА**

**НА НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ**

**СИНОВИОЦИТОВ 83**

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ 90**

[**ВЫВОДЫ 103**](#bookmark43)

[**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 105**](#bookmark44)

з

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

c-NOS - конститутивная форма нитрооксидсинтазы

DAS - индекс активности заболевания

e-NOS - эндотелиальная нитрооксидсинтаза

IFN-y - интерферон у

IL-1 - интерлейкин - 1

і-NOS - индуцибельная нитрооксидсинтаза

LPS - липополисахарид

NADPH-d - NADPH-диафораза

NFkB - ядерный фактор транскрипции

n-NOS - нейрональная нитрооксидсинтаза

N0 - оксид азота

NOS - нитрооксид синтазы

Th-І -Т-лимфоциты хелперы 1 типа

Th-2 - Т-лимфошпы хелперы 2 типа

TNF-a - фактор некроза опухоли

VGEF - фактор роста сосудистого эндотелия

АА - адъювантный *артрит*

ГМ-КСФ - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор КА - коллагеновый артрит ОА - остеоартроз

ПАФ - полный адъювант Фрейнда РА - ревматоидный артрит

**Актуальность проблемы** Проблема аутоиммунного воспаления в клинике внутренних болезней является чрезвычайно важной Аутоиммунные болезни поражают 5-7% населения земного шара, чаще развиваются у женщин, чем у мужчин, как правило, в молодом возрасте и рассматриваются как наиболее частая причина хронической патологии человека [1, 24, 28]

Наиболее яркими представителями системных аутоиммунных болезней являются ревматические заболевания: системная красная волчанка,

ревматоидный артрит, системная склеродермия, дерматополимиозит и *полимиозит, гранулематоз Вегенера* [49, 67] *Развитие аутоиммунных* ревматических заболеваний связывают с поликлональной В-клеточной активацией, Т-клеточной активацией антигеном, молекулярной мимикрией, дефектами генов, кодирующих структуру иммуноглобулинов, Т-клеточных рецепторов и синтез цитокинов, нарушением механизмов программированной гибели клеток (апоптоз) [48, 49] Многие современные тенденции в изучении иммунопатогенеза воспалительных ревматических заболеваний можно проследить на примере ревматоидного артрита [49, 63]. Это находит свое отражение в морфологии ревматоидного синовита, который представляет собой классический пример иммунного воспаления [27]

Ревматоидный артрит (РА)- одно из наиболее распространенных хронических аутоиммушшх заболеваний человека, частота которого в популяции достигает 1% [41, 46], а экономические потери от РА для общества сопоставимы с ишемической болезнью сердца К кардинальным признакам РА относится неуклонно прогрессирующее поражение суставов (хронические боли, деформация, нарушение функции), приводящее к инвалидности и снижению продолжительности жизни пациентов [47, 49] Увеличение смертности во многом обусловлено нарастанием частоты сопутствующих заболеваний (инфекции, поражение сердечно-сосудистой системы и почек, остеопоретические переломы и др.), развитие которых патогенетически связано

с плохо контролируемыми ревматоидным воспалением и дефектами иммунитета [48, 80].

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хронический прогрессирующий синовит, приводящий к постепенной деструкции суставов [20, 41]. Суть патологического процесса при РА составляет прогрессирующее неконтролируемое воспаление синовиальной оболочки суставов, обусловленное резидентными синовиальными клетками фибробластами, макрофагами, дендритными, тучными, эндотелиальными клетками, Т- и В- лимфоцитами [20, 45, 63] Основное значение в патогенезе РА придают двум тесно взаимосвязанным процессам антиген-специфической активации CD4 Т- лимфоцитов по Th-І типу, характеризующейся избыточным синтезом интерлейкина (IL-2), интерферона (IFN-y), IL-17, IL-18, и дисбалансом между продукцией провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли-а (TNF- а), IL-1, IL-6, IL-8 и противовоспалительных цитокинов (IL-10, растворимого антогониста IL-1, растворимых TNF-a рецепторов, IL-4) с преобладанием продукции первых над вторыми [48, 61]. Th-І клетки вовлечены в реакции клеточного иммунитета, а именно гиперчувствительность замедленного типа, воспаление, клегочную цитотоксичность [39, 26, 43]

Именно нарушение синтеза цитокинов лежит в основе патогенеза хронического воспаления при аутоиммунных заболеваниях. По современным представлениям ключевыми медиаторами иммуновоспалительного процесса при РА являются TNF-a и IL-1J} [45, 44, 48, 184] Эти последние регулируют выработку оксида азота (N0), что выдвигает его на передний план патогенетического процесса в синовиальной оболочке По данным экспериментальных исследований, подавление синтеза N0 ассоциируется с уменьшением признаков воспаления при различных формах экспериментальных артритов [179, 191, 198, 199, 191]. Экспрессия

индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и повышенный синтез N0 впервые показаны на моделях органоспецифических аутоиммунных заболеваний in vivo, таких как экспериментальный аллергический энцефаломиелит и иммунологически опосредованный диабет у мышей без признаков ожирения [88, 175] Подобный характер NO-синтазной функции выявлен на модели адъювантного и коллаген-индуцированного артрита у мышей линии MRL// [202] Дебют экспериментального артрита предотвращается введением монометиларгинина - специфического ингибитора iNOS [179, 202, 205] Однако, остается не выясненным, как интенсивность выработки N0 в структурах синовиальной оболочки контролирует напряженность и длительность воспалительного процесса

Анализ литературы показывает недостаточность сведений о нитроксидергической функции синовиальной оболочки в норме и при развитии ревматоидного воспаления Так, концентрация нитритов в синовиальной жидкости значительно превосходит концентрацию нитратов и нитритов в сыворотке крови у больных РА, что указывает на высокий локальный уровень синтеза N0 в суставах, пораженных РА [139, 183]. Известно, что источником N0 в синовиальной жидкости являются гранулоциты [138, 132]. Однако другие типы локальных NO-продуцирующих клеток синовии остаются неизвестны Вместе с тем, гребует уточнения динамика развития токсическою и цитопротективного эффектов N0, притом, что данные об экспрессии NOS в тканях сустава на разных стадиях РА чрезвычайно противоречивы Одни исследователи отводят N0 роль главного организатора хронического воспаления, другие, напротив, ее отвергают [141]. Не известны также топография и динамика активности NOS синовиоцитов на фоне действия основных фармакологических препаратов

Многообразие клинических, патологических и иммунологических проявлений РА делает этот процесс похожим на клинико-иммунологический синдром, чем на одну «гомогенную» болезнь [181] Не случайно РА приобрел статус модели, на которой активно изучаются новые аспекты патогенеза аутоиммунного воспаления и разрабатываются принципиально новые направления противовоспалительной терапии [174]. Выдающееся открытие полного адъюванта Фрейнда дало возможность дальнейшего изучения проявлений клеточного иммунитета при экспериментальном воспроизведении аутоиммунных заболеваний, а именно участия N0 в развитии синовита. Адъювантный артрит мышей напоминает по своему течению и морфологическому проявлению ревматоидный артрит человека [82, 83]. На модели АА планируется уточнить роль NO-синтазной компоненты на разных этапах развития синовиального воспаления.

**Цель** работы установить значение нитроксидергических механизмов в развитии адъювантного артрита.

В работе решались следующие **задачи:**

1. Определить локализацию и активность NADPH-диафоразы и N0- синтаз в клетках синовиальной оболочки и хряща тибиотарзального сустава у здоровых мышей линии С57В1аск6
2. Изучить локализацию и активность NADPH-диафоразы и NO-синтаз в синовиоцитах и хондроцитах тибиотарзального сустава на ранней и поздней стадии адъювантного артрига у мышей линии С57В1аск6
3. Исследовать уровень активности NADPH-диафоразы и NO-синтаз в синовиоцитах и хондроцитах тибиотарзального сустава у мышей линии С57В1аск6 с адъювантным артритом на фоне введения специфического ингибитора фермента N-Hmpo-L-аргинина.
4. Изучить влияние преднизолона на активность нитрооксидсинтазы в синовиоцитах и хондроцитах тибиотарзального сустава у мышей линии С57В1аск6 с адъювантным артритом

**Научпая новизна н теоретическое значение работы:** а) впервые проведен комплексный анализ участия NO-сингазной компоненты в инициации и развитии адъювантного артрита, б) впервые установлена динамика активности NADPH-диафоразы. индуцибельной и конститутивной NO-синтазы в синовиоцитах и хрящевой ткани мышей линии С57В1аск6, дана их детальная количественная характеристика в условиях экспериментального артрита, в) установлено значение блокаторов NO-синтазы и преднизолона на экспрессию нитроксидсинтаз в тканях тибиотарзального сустава у мышей на модели ревматоидного воспаления

Проведенные исследования позволили обосновать и сформулировать научные положения, способствующие пониманию NO-ергических механизмов, лежащих в основе становления и развития адъювантного воспаления Выявленные изменения состояния NADPH-диафоразы, индуцибельной и конститутивной NO-синтазы в синовиоцитах и хондробластах, а также фармакологическая коррекция активности ферментов достаточно объективно свидетельствуют о прямом и неоднозначном влиянии оксида азота на патогенез адъювантного воспаления Это может иметь важное теоретическое значение для разработки новых подходов в понимании патогенетических механизмов ревматоидного артрита у человека

**Практическая ценность работы** Полученные в работе данные по топографии и реактивности NO-синтезирующих синовиоцитов и хондроцитов в условиях экспериментального артрита могут быть использованы в области клинической и теоретической ревматологии, патофизиологии и патологической анатомии аутоиммунного поражения опорно-двигательного аппарата. Установленная динамика активности NO-синтазы и резистентность синовиоцитов при введении ингибитора энзима и преднизолона может представлять эффективную модель для разработки препаратов направленного действия и надежной фармакологической коррекции патологии суставов при ревматоидном артрите

**Положения, выносимые на защиту:**

1 Участие NO-содержащих клеточных структур синовиальной оболочки в развитии аутоиммунного артрита определяется их типологической и химической гетерогенностью

1. Динамика активности NOS в синовиоцитах зависит от стадии воспаления и определяет специфическое эффекторное действие N0 на клетки- мишени
2. Степень поражения хрящевой ткани суставов при адъювантном артрите коррелирует с NO-синтетической функцией хондробластов
3. Введение Ы-нитро-Ь-аргинина и преднизолона снижает активность фермента в клеточных элементах синовии

**Апробация работы** состоялась на кафедре гистологии, цитологии, клеточной биологии ГОУ ВПО «Владивостокский государственный медицинский университет М3 РФ» (Владивосток, 2005). Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на Конгрессе ревматологов России (Саратов, 2003, Москва 2004), на заседаниях Приморского краевого терапевтического общества (Владивосток, 2001-2003), Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 25.09. 2004), Конгрессе европейской противоревматической лиги (EULAR, Берлин. 2004), Конгрессе международной ассоциации по остеоартрозу (OAS1, Чикаго, 2004), в рамках научной сессии ДВО РАН и СО РАМП «Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний человека» (Владивосток, 2005), Тихоокеанской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Владивосток, 2005).

**выводы**

1. Умеренная активность NADPH-диафоразы установлена в синовиоцитах покровного и стромального слоях синовиальной оболочки у здоровых мышей линии C57BIack6 В субпокровном уровне синовии NADPH-d позитивные клетки отсутствуют Топография NADPH-d совпадает с локализацией конститутивной NOS (c-NOS).
2. Хондроциты и хондробласты тибиотарзального сустава здоровых мышей содержат NADPH-d Высокая активность фермента выявляется в цитоплазме пролиферирующих хондробластов, занимающих краевую зону хряща В средних и глубоких слоях хрящевой ткани интенсивность окрашивания хондроцитов снижается до умеренной и низкой
3. Ранняя фаза адъювантного воспаления характеризуется увеличением на 30,4% числа нитрооксидпозитивных клеток Активность NADPH-диафоразы в клетках синовиальной оболочки определяется на высоком уровне (75,2+3,8 ЕОП). На 30-день адъювантного артрита количество и активность нитрооксидпозитивных клеток снижается
4. В начальной фазе адъювантного артрита количество синовиоцитов, экспрессирующих iNOS постоянно увеличиваегся, достигая максимума на 7-14 день Большинство клеток экспрессирующих i-NOS локализуется в покровном и стромальном слоях синовиальной оболочки
5. Поздняя стадия адъювантного артрита характеризуется значительным уменьшением количества и интенсивности окрашивания i-NOS реактивных элементов, что сопровождается сохранением экспрессии конститутивного изофермента (n-NOS) в синовиоцитах покровного, субпокровного и глубокого стромального уровней синовиальной оболочки
6. В раннюю стадию адъювантного артрита преобладают хондробласты с высокой активностью NADPH-d В позднюю стадию активность фермента и количество нитрооксидпозитивных клеток снижается
7. N-mnpo-L-аргинин тотально блокирует активность NADPH-d, i-NOS и n-NOS в макрофагах и синовиоцитах покровного и субпокровного слоях синовиальной оболочки Активность NADPH-d в стромальном слое прогрессивно уменьшается до низкой
8. Преднизолон снижает активность NADPH-d, i-NOS и c-NOS в клетках глубокого стромального слоя синовиальной оболочки

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Актуальные проблемы патофизиологии (избранные лекции) / Под ред. Б Б Мороза - М.: Медицина, 2001 -424с.
2. Альфа2- макроглобулин в сыворотке и синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом и остеоартрозом / З.Коларов, Р Стоилов, М. Балева К Николов, И Шейтанов и др // Терапевт арх -2000 - Т 72, 35 -С. 17-19.
3. Анализ иммунных нарушений у больных ревматоидным артритом с поражением сердца / В Т.Тимофеев, Г В Порядин, М.В Головизнин, С И. Кондратчик // Патолог физиология и эксперимент терапия - 1998. - №3. -С. 10-12.
4. Арлеевская, М И Клинические и лабораторные признаки нарушенного функционирования иммунной системы у больных ревматоидным артритом и их кровных родственниц / МИ Арлеевская, Н.П. Шил кина, А П Цибулькин // Терапевт арх. - 2005. - № 5. - С.26-29.
5. Барановский, П.В Влияние салазосульфапиридина ( сульфасалазина) на состояние системы комплемента у крыс с адъювантным артритом / П.В Барановский, И.Ю. Высоцкий, М.З. Болюх // Фармакология и токсикология -1989 - Т 52, №1. - С. 65-67.
6. Брюне, Б Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути: обзор / Б Брюне, К. Сандау, А фон Кнетен // Биохимия - 1998. - Т.63, вып.7 - С 966-975.
7. Ванин, А Ф Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы- две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах: обзор / А.Ф Ванин // Биохимия -1998 - Т 63, вып 7. - С 924- 938
8. Ванин, А.Ф Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований / А Ф Ванин // Биохимия -1998.-Т.63, вып 7 - С. 867-869
9. Ванин, А Ф Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А Ф Ванин // Вестн. Рос АМН - 2000. -№ 4 - С.- 3-5.
10. Викторов, И В Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга /ИВ Викторов // Вестн. Рос АМН - 2000.-№4.-С.5-11.
11. Влияние а2Ь- интерферона in vivo и in vitro на функциональную активность Т- лимфоцитов больных ревматоидным артритом / А.А. Ярилина, М Ф Никонова, М М Литвина, Р.М Балабанова, А.А. Ярилин // Терапевт арх - 2000. - № 5. - С.9-17.
12. Влияние бета-каротина на развитие адьювантного артрита и продукцию интерлейкина-1 у крыс / А.А Потапова, О В Буюклинская, Т.Л. Корсова , Н А. Морозова, Л И. Кривое и др // Бюл. эксперимент биологии и медицины -1993 - Т. 116, № 12. -С. 611-613.