

Структура цитокинового профиля назального секрета при аллергическом рините у детей

Е.В. Просекова¹, С.Ю. Нетесова², Н.Р. Забелина¹, В.А. Сабыныч¹, С.А. Сотниченко³

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ² Краевая детская клиническая больница № 1 (690002, Владивосток, пр-т Острякова, 27), ³ Дальневосточный окружной медицинский центр Федерального медико-биологического агентства (690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 161)

Резюме. Результаты изучения профиля цитокинов в различных биологических субстратах при аллергических заболеваниях у детей, представленные в единичных публикациях, нередко разноречивы. Проведен мониторинг динамики цитокинового спектра назального секрета 120 детей с аллергическим ринитом (АР) в различные периоды болезни. Методом твердофазного имму-

ноферментного анализа определяли уровни интерлейкинов (ИЛ) 4, 8 и 13, фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) и гамма-интерферона (ИФН γ). В период обострения АР зафиксирована активация синтеза ИЛ-4, ИЛ-8 и ИЛ-13 при незначительном нарастании уровня ФНО α , низкое содержание ИФН γ , что иллюстрировалось дисбалансом и изменением цитокиновых индексов – ИФН γ /ИЛ-4 и ИФН γ /ИЛ-13 – и структуры цитокинового профиля. Определен следующий алгоритм нарушений цитокиновой локальной регуляции: ИЛ-13⁺, ИФН γ ²⁻, ИЛ-8⁺, ИЛ-4⁺, ФНО α ³⁺. Проведенное исследование выявило информативность мониторинга цитокинового спектра назального секрета при АР у детей для уточнения характера, направленности, активности и тяжести аллергического воспаления и оценки эффективности программ фармакотерапии.

Ключевые слова: аллергическое воспаление, интерлейкины, фактор некроза опухоли-альфа, гамма-интерферон.

УДК 616.718.5-001.5:612.128

НО-ИНДУЦИРОВАННАЯ РАННЯЯ ДИСМЕТАБОЛИЯ СУСТАВНОГО ХРЯЩА ПРИ ВНУТРИСУСТАВНЫХ ПЕРЕЛОМАХ

А.В. Череповский^{1,2}, И.В. Шулепин²

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

² Владивостокская клиническая больница № 2 (690105, г. Владивосток, ул. Русская, 57)

Ключевые слова: травма сустава, остеосинтез, нитроксидсинтаза, оксид азота.

NOX INDUCED EARLY DISMETABOLY OF THE ARTICULAR CARTILAGE CAUSED BY THE INTRA-ARTICULAR FRACTURES

A. V. Cherepovskiy¹, I. V. Shulepin²

¹ Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), ² Vladivostok clinical hospital No. 2 (57 Russkaya St. Vladivostok 690105 Russian Federation)

Background. Analysis of activity of the NO synthase (NOS) of the articular cartilage of the knee joint as a result of the intra-articular fractures of the lateral condyle of tibia.

Methods. The NADPH-diaphorase analysis of the hematoxylin and eosin and toluidine blue imbued tissue samples out of the core of lateral condyle of the tibia during operations for osteosynthesis on 15 intra-articular fractures patients.

Results. Elicited a statistically significant increment in activity of the NOS of the chondrocytes in the course of the rehabilitation along with a valid decrement in amount of glycosaminoglycans in cartilage matrix. The given changes available subject to the structural integrity of the cartilage or in the early period of presence of an isolated osteochondral fragment after impression fracture.

Conclusions. The intra-articular fractures cause an early defect of anabolism of the cartilage related with an increment in activity of the NOS. The optimal period of an operation for osteosynthesis may be within 7–10 days after an injure before degradation of the functional potency of a cartilage.

Keywords: artticular injury, osteosynthesis, NO synthase, nitric oxide.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 1, p. 42–44.

Общеизвестно, что внутрисуставные переломы, даже в случае своевременного и правильного оперативного лечения, в различные сроки после травмы приво-

дят к развитию остеоартроза. Вместе с тем остается неясным, какого рода изменения в хрящевой ткани предшествуют морфологически позитивным стадиям артроза и, что не менее важно, в какие сроки эти изменения развиваются. Главной причиной недостатка информации считается отсутствие биохимических маркеров, отражающих течение дегенеративно-дистрофического процесса в хрящевой ткани, которые можно было бы использовать для скрининга пациентов с высокой степенью риска развития данной патологии, мониторинга активности и определения прогноза заболевания [1, 12]. В этом аспекте весьма перспективным представляется исследование биологической роли одного из активных тканевых метаболитов – оксида азота – в развитии хрящевой дегенерации.

Оксид азота представляет собой продукт активности группы ферментов – синтаз оксида азота. Группа включает три типа или три изофермента, кодируемых разными генами [6, 14].

Ранее нами было показано значение индуцибельной изоформы нитроксидсинтазы (nitric oxide synthase – NOS) хондроцитов как специфического маркера ранней дистрофии хряща при посттравматической нестабильности коленного сустава [3]. Настоящее исследование посвящено изучению динамики активности нитроксидсинтазы в хряще коленного сустава у больных с переломами наружного мыщелка большеберцовой кости.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили биоптаты хряща центральной части латерального мыщелка большеберцовой кости, полученные во время операций остеосинтеза у 15 пациентов (10 мужчин и 5 женщин) 19–40 лет без клинических,

Череповский Антон Владиславович – д-р мед. наук, профессор кафедры травматологии и ортопедии с курсом ВМХ ТГМУ; врач травматолог-ортопед III травматологического отделения ВКБ №2; e-mail: cherepovsky_av@mail.ru

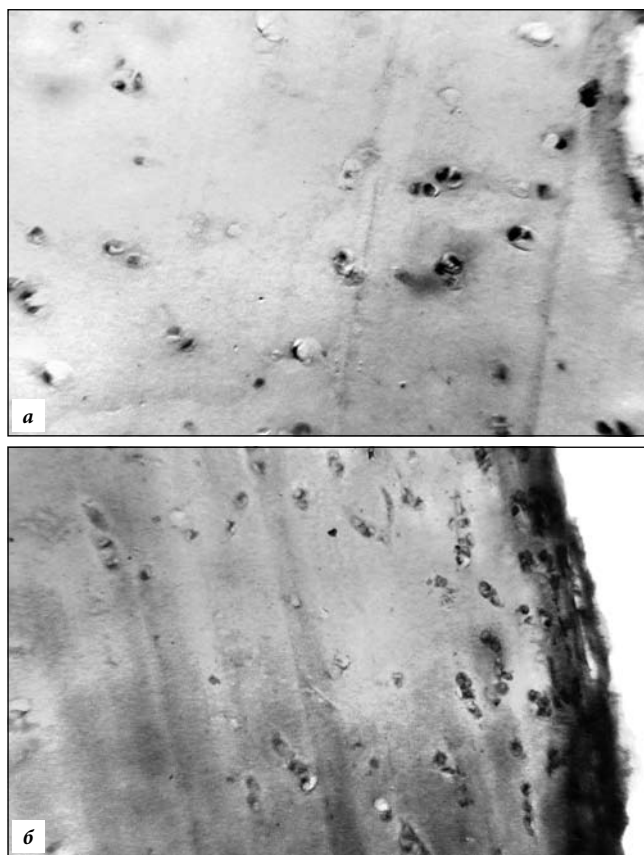


Рис. NADPH-диафараза в хондроцитах поверхностной и промежуточной зоны хряща коленного сустава. Иolated костно-хрящевой фрагмент на 7-е (а) и 20-е (б) сутки после травмы. Метод Норе и Vincent, $\times 200$.

рентгенологических, а также интраоперационных признаков хрящевой дегенерации (забор материала осуществлялся с информированного согласия). Сроки после травмы составляли от 7 до 21 суток. У 4 человек имелись переломы типа В₁ по классификации АО [2] (чистое раскалывание), у 4 больных выявлены переломы типа В₂ (чистое вдавление), и в 7 случаях обнаружены переломы типа В₃ (вдавление и раскалывание).

Гистохимическую локализацию нитроксидсинтазы выявляли, используя метод на NADPH-диафаразу (NADPH-d), предложенный Норе и Vincent [8]. Метод основан на образовании нерастворимого осадка диформаза в присутствии субстрата – нитросинего тетразолия и косубстрата – NADPH. Преимущество данной реакции заключается в том, что плотность образующегося осадка диформаза считается прямо пропорциональной молекулярному содержанию NOS, что дает возможность судить об активности энзима [8]. Общегистологические методы исследования включали окраску гематоксилином и эозином и 1% толуидиновым синим. Морфометрическая часть исследования выполнялась на световом микроскопе: определяли толщину зон хряща, проводили оценку хрящевой цитоархитектоники. Визуализацию изображения всех микропрепаратов на компьютере получали с помощью видеосистемы, смонтированной на микроденситометре Vickers M-85. Цифровую обработку изображения

Таблица

Гистохимические характеристики суставного хряща коленного сустава при внутрисуставных переломах В₂ и В₃

Реакция	Интенсивность реакции, ЕОП	
	на 7–10-е сутки	на 14–21-е сутки
На NADPH-d	24,8±2,8	39,6±3,8
Толуидиновый синий	46,3±2,4	12,6±0,8

Примечание. Разница между обоими показателями в различные сроки статистически значима.

делали с помощью программ Adobe Photoshop 6.0 и Microsoft Excel 97. Активность фермента (оптическую плотность гранул) и интенсивность окрашивания матрикса выражали в единицах оптической плотности (ЕОП). Обработку числовых данных проводили с использованием методов вариационной статистики.

Результаты исследования. Во всех препаратах выявлена сохранность зональной структуры хряща. Не обнаружено участков отсутствия либо повреждения бесклеточной пластинки. Зональная цитоархитектоника (расположение и форма лакун) в целом соответствовала норме.

В отличие от морфологических, гистохимические характеристики хряща имели ряд существенных особенностей. Во всех без исключения препаратах больных с переломами В₂ и В₃ в самом раннем периоде после травмы (7–10-е сутки) регистрировалась значительная активность NADPH-d (рис. а). Высокая активность энзима выявлена преимущественно в хондроцитах поверхностной зоны, однако в некоторых препаратах окрашиванию подверглись и клетки промежуточной зоны хряща. При этом окраска толуидиновым синим не выявила метахромазии матрикса. В то же время у больных с переломами типа В₁ в указанные сроки активности NADPH-d, равно как и метахромазии матрикса при окраске толуидиновым синим, обнаружено не было.

На 14–21-е сутки после травмы при переломах В₂ и В₃ отмечено статистически достоверное увеличение активности NADPH-d (рис. б) по сравнению с препаратами группы тех же переломов через 7–10 суток с момента травмы (табл.). При оценке суммарного содержания гликозаминогликанов во всех препаратах при переломах В₂ и В₃ на 14–21-е сутки обнаружено значительное снижение интенсивности окрашивания хрящевого матрикса толуидиновым синим. В поверхностной зоне оптическая плотность осадка была почти в 4 раза ниже, чем в препаратах группы переломов В₂ и В₃ через 7–10 суток после травмы (табл.), при этом интенсивность окрашивания была низкой как в экстраэриториальном, так и в эриториальном матриксе.

Обсуждение полученных данных. В доступной литературе отсутствуют сведения о динамике нитроксидергической активности суставного хряща при внутрисуставных переломах. На основании ранее полученных данных можно с уверенностью утверждать, что в нормальном человеческом хряще у лиц молодого возраста активность NOS не определяется [3, 4].

Повышение уровня продукции оксида азота в хондроцитах отмечено при избыточных либо aberrантных нагрузках, действующих на суставные поверхности коленного сустава [7, 10]. Подобное повышение выявлено также при остеоартрозе [5, 13]. Структурно дегенеративный эффект повышенной концентрации оксида азота реализуется в основном через угнетение синтеза протеогликанов хрящевого матрикса [9, 11].

При внутрисуставных переломах, сопровождающихся импрессией суставной поверхности, происходит травматическая изоляция костно-хрящевого фрагмента, включающего значительную часть суставного плато.

Достоверное увеличение активности нитроксидсинтазы в хондроцитах определяется в самые ранние (7–10-е сутки) сроки существования изолированного фрагмента. Активность фермента нарастает с течением времени, прошедшим с момента травмы, и достигает значительных величин в периоде, морфологически соответствующем окончанию фазы свежего перелома. При этом активность фермента в этом периоде статистически достоверно выше, чем в фазе свежего перелома (до 10 суток) и сопряжена с достоверно значимым снижением содержания гликозаминогликанов в матриксе. Учитывая, что одной из главных функций хондроцитов является синтез протеогликанов, резонно предположить, что именно повышение активности NOS в данных условиях способствует угнетению синтетической активности хондроцитов.

На основании приведенных данных можно отметить, что начало активной фазы репаративной регенерации (14–21-е сутки) совпадает по времени с высокой степенью активности «стрессовой» изоформы NOS в ультраструктуре хряща. Гистохимический стресс, скорее всего, является следствием нарушения диффузионного питания хряща вследствие изменения свойств синовиальной среды при гемартрозе. С другой стороны, триггером указанного стресса, вероятно, служит разрыв сигнальных путей, функционирующих в условиях интимной связи хряща и субхондральной кости. Соответственно, анатомическая дезорганизация субхондральной кости при импрессиях может служить одной из причин функциональной недостаточности хондроцитов, реализующейся при посредстве индукцибельной NOS. Важно отметить, что гистохимические изменения развиваются на фоне сохраненной структурной целостности хряща, что делает данный процесс морфологически негативным на протяжении достаточно длительного времени.

С практической точки зрения, оптимальным временем для операции остеосинтеза может являться период до 7–10 суток после травмы, когда функциональные потенции хряща еще не имеют дефекта. Однако следует констатировать, что полноценные прогностические критерии структурной реституции хряща с учетом выявленных гистохимических изменений пока неясны. Возможно здесь имеет значение как объем изолированного фрагмента, так и степень его смещения (импрессии).

References:

1. Kornilov N.N., Novoselov K.A., Kornilov N.V. Modern views on the etiopathogenesis, diagnostics principles and conservative therapy of degenerative-dystrophic diseases of the knee // *Traumatology and orthopedics of Russia*. 2002. No. 2. P. 47–59.
2. Guidance on internal osteosynthesis / Muller M.E., Allgover M., Villenegger H., Schneider R. / translation from German. M.: Ad Marginem, 1996. 750 p.
3. Cherepovskiy A.V., Dubikov A.I., Nikulin S.V. [et al.]. Activity of nitricoxidesynthase as a marker for the early stages of cartilage dismetabolism in the experiment // *Bul. exp. biol. med.* 2004. Vol.137, No. 5., P. 589–593.
4. Cherepovskiy A.V., Nikulin S.V., Dubikov A.V., Shumatov V.B. Posttraumatic anterior instability of the knee joint: activity of nitricoxidesynthase and early dismetabolism of articular cartilage // *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2004. No. 4. P. 51–54.
5. Amin A.R., Abramson S.B. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis // *Cur. Op. Rheum.* 1998. Vol. 10, No. 3. P. 263–268.
6. Bredt D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology // *Free Radic. Res.* 1999. Vol. 31, No. 6. P. 577–596.
7. Fink C., Fermor B., Weinberg J. [et al.]. The effects of dynamic mechanical compression on nitric oxide production in the meniscus // *Osteoarthritis Cartilage*. 2001. Vol. 9, No. 5. P. 481–487.
8. Hope V.T., Vincent S.R. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase // *Histochem. Cytochem.* 1989. Vol. 37. P. 653–661.
9. Jouzeau J.Y., Cipoletta C., Presle N. [et al.]. Modulation of IL-effects on cartilage by NO-synthase inhibitors: pharmacological studies in rats // *Osteoarthritis Cartilage*. 1999. Vol. 7, No. 4. P. 382–385.
10. Kobayashi K., Mishima H., Hashimoto S. [et al.]. Chondrocyte apoptosis and differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy // *J. Orthop. Res.* 2001. Vol. 19, No. 5. P. 802–808.
11. Van der Kraan P.M., Vitters E.L., van Beuningen H.M. [et al.]. Role of nitric oxide in the inhibition of BMP-2-mediated stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage // *Osteoarthritis Cartilage*. 2000. Vol. 8, No. 2. P. 82–86.
12. Lohmander L.S. Proteoglycans of joint cartilage // *Bailliere's Clin. Rheum.* 1988. Vol. 2, No. 1. P. 37–61.
13. Min B.H., Kim H.J., Lim H. [et al.]. Effects of ageing and arthritis disease on nitric oxide productions by human articular chondrocytes // *Exp. Mol. Med.* 2001. Vol. 33, No. 4. P. 299–302.
14. Nathan C., Xie Q.-W. Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls // *Cell*. 1994. Vol. 78. P. 915–918.

Received 2011.02.11.

NO-индуцированная ранняя дисметаболия суставного хряща при внутрисуставных переломах

А.В. Череповский^{1,2}, И.В. Шулепин²

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ²Владивостокская клиническая больница № 2 (690105, г. Владивосток, ул. Русская, 57)

Резюме. Исследована активность нитроксидсинтазы (NOS) в суставном хряще коленного сустава при внутрисуставных переломах латерального мыщелка большеберцовой кости. Выявлено статистически значимое увеличение активности NOS в хондроцитах с течением времени после травмы, сопряженное с достоверным уменьшением содержания гликозаминогликанов в хрящевом матриксе. Данные изменения обнаружены на фоне сохраненной структурной целостности хряща и в ранние сроки существования изолированного костно-хрящевого фрагмента при импрессионном переломе. Высказано мнение о раннем развитии дефекта хрящевого анаболизма, связанного с повышением активности NOS.

Ключевые слова: травма сустава, остеосинтез, нитроксидсинтаза, оксид азота.