

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОСТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБМЕН ВЕЩЕСТВ
ПРИ АДАПТАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИИ
(ДНИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЫ НА ДОНУ)**

**МАТЕРИАЛЫ XIII РОССИЙСКОЙ НАУЧНО-
ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
16–17 МАЯ 2014 г.**



**Ростов-на-Дону
2014**

8. Williams C.Y., Kamin H. Microsomal triphosphopyridine nucleotide – cetochrome c-reductases of liver// J.Biol.Chem.-1961.-Vol.237, N2.-P.587-595.
9. Lowry O.N., Resebrough W.S., Farr L. Protein measurement with dolin reagent // J.Biol.Chem.-1951.-V 193, N4.-P.265-275.
10. Чиркин А.А. Молекулярные повреждения печени. Иммунология. Аллергология. Инфектология. 2001.
11. Немцов С.В., Ильина А.В., Албулов А.И. и др. Медицинское применение хитина и хитозана //Материалы научной конференции «Фитотерапия, лазеротерапия, биологически активные вещества естественного происхождения в XXI веке».-Черноголовка, 17-19 октября 2000.-С.90-94.
12. Погожева А.В., Байгарин Е.К и др. //Вопр.питания.-2005.-Т.74, №4.-С.27-30;
13. Терещенко В.Г. Применение фитохитоза в кардиологическо реанимации //Материалы научной конференции «Фитотерапия и лазеротерапия в XXI веке».-Черноголовка, 9-10 апр.1999.-С.86-88.

Окислительно-нитрозильный стресс, полиморфизм гена нейрональной NO-синтазы, апоптоз хондроцитов и лимфоцитов в развитии гонартроза

*Кролевец И.В., Панина С.Б., Милюткина Н.П., Забродин М.А., Плотников А.А.,
Шевякова Е.А., Лактионова А.Ю. ¹ФГАОУ ВПО Южный федеральный университет; ²ГБОУ ВПО РосГМУ Минздрава России.*

Гонартроз (ГА), или остеоартроз (ОА) коленного сустава – хроническое дегенеративное заболевание, которое вызывает прогрессирующую потерю функций сустава, ос аётся ведущей причиной нетрудоспособности людей среднего и пожилого возраста развитых стран [1]. Остеоартроз – мультифакториальное заболевание, характеризующееся деградацией суставного хряща, изменениями субхондральной кости, синовитом и ноцицептивной сенситизацией. Среди причин ОА можно перечислить такие факторы риска, как травмы сустава, возрастные изменения, ожирение, перегрузки, генетическую предрасположенность [2,3].

Образование активированных кислородных метаболитов (АКМ) и окислительная модификация биомолекул увеличиваются при действии различных патогенетических факторов и наблюдаются при воспалении и ишемии, которые характерны для ОА. Показано, что окислительные повреждения – один из патологических механизмов развития ОА [4]. Апоптоз хондроцитов и продукция оксида азота (NO) при участии трёх изоформ NO-синтаз – нейрональной nNOS, индуцибельной iNOS, эндотелиальной eNOS, вероятно, происходят уже в начале прогрессирования заболевания и коррелируют с его тяжестью [5]. Апоптоз хондроцитов ассоциирован с деградацией и кальцификацией матрикса, являясь одновременно и причиной, и следствием ОА [6]. Последние исследования уделяют большое внимание факторам генетической предрасположенности и роли кандидатных генов в развитии ОА. В исследвании [7] показано участие нейрональной NO-синтазы в пролиферации, апоптозе и созревании хондроцитов.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании роли окислительно-нитрозильного стресса в крови и синовиальной жидкости в развитии апоптоза хондроцитов суставного хряща и лимфоцитов периферической крови пациентов с гонартрозом. Кроме того, проведено исследование ассоциации точечного нуклеотидного полиморфизма (SNP) гена nNOS с частотой развития посттравматического ГА у жителей популяции г. Ростова-на-Дону. Биологический материал был получен от 116 пациентов с диагнозом ГА (K/L стадия I-IV), разделённых на две группы. По отношению к пациентам первой группы

(1, $n=49$, средний возраст 58,8 лет) применялась консервативная терапия ГА (НПВП, физиотерапия, массаж). Вторая группа (2, $n=67$, средний возраст – 46 лет) включала пациентов после хирургического лечения ГА (артроскопия). Контрольная группа состояла из 25 здоровых людей, без признаков ограниченных движений в суставе и болей. Генотипирование SNP гена nNOS проводилось среди 77 пациентов (с посттравматическим ГА, не состоящих в родстве, средний возраст 46,7 лет) и 71 человека контрольной группы соответствующего возраста и пола, проживающих в Ростовском регионе.

Материалом для анализа являлись плазма, мононуклеарная фракция крови (лимфоциты, моноциты), синовиальная жидкость (СЖ), биоптаты хрящевой ткани. Интенсивность окислительного стресса определяли по параметрам люминол- H_2O_2 -индуцированной хемиллюминесценции (ЛХЛ) и накоплению ТБК-положительных продуктов в пересчёте на малоновый диальдегид (МДА), интенсивность нитрозильного стресса – по уровню содержания нитритов/нитратов (NO_x). Состояние ферментативных антиоксидантных систем в мононуклеарах периферической крови оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатион-S-трансферазы (GST); в СЖ также определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH). В мононуклеарной фракции крови определяли активности миелопероксидазы (МПО), NADPH-оксидазы, ксантиноксидоредуктазы (КОР). Апоптоз лимфоцитов крови оценивали методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием набора «Annexin V-FITC apoptosis detection kit 1», BD Pharmingen (США). Апоптоз хондроцитов изучали путём электронно-микроскопических исследований биоптатов хряща коленного сустава больных гонартрозом, взятых при эндоскопии. Генотипирование пациентов с ГА по nNOS-84 (G>A) определяли с использованием реагентов «SNP-экспресс» фирмы «Литех» (Россия) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе Corbat Research (Australia), детекцию продуктов амплификации проводили в агарозном геле методом горизонтального электрофореза, анализ электрофореграмм – на трансиллюминаторе GelDoc «Biorad» (USA).

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.1. Для сравнения показателей групп использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни, для сравнения частот аллелей – χ^2 -тест, для корреляционного анализа – коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Полученные результаты свидетельствуют, что в СЖ и плазме крови пациентов после хирургического вмешательства (группа 2) развивается окислительно-нитрозильный стресс. Это подтверждается повышением на 30-54% параметров ЛХЛ и на 18% концентрации NO_x в СЖ относительно пациентов 1-й группы, на 28% концентрации NO_x в плазме относительно контроля. Это говорит о повышенной продукции активных форм кислорода и галогенов, являющихся индукторами ПОЛ, и активных форм азота, которые среди прочих функций способны интенсифицировать апоптоз клеток. В синовиальной жидкости больных 2 группы содержание МДА как вторичного продукта и маркера ПОЛ повышено на 101% относительно 1 группы, а в плазме – на 32% относительно контроля. Аддукты МДА вносят вклад в дегенерацию суставного хряща при ОА [8].

Активности антиоксидантных ферментов в мононуклеарах пациентов обеих групп носят однонаправленный характер: наблюдается повышение активности СОД на 42-75% относительно контроля, активности других антиоксидантных ферментов (каталазы, ГПО, GST) оставались в пределах нормы. В СЖ больных ГА дисфункция была более глубокой, обнаружены нарушение баланса и разнонаправленные изменения антиоксидантной активности: супероксид-устраняющая активность в группе 2 была ниже на 30%, а скорость утилизации H_2O_2 была выше на 74% по

сравнению с группой 1. При этом установлено, что содержание GSH в СЖ на 40% ниже в группе 2 относительно группы 1. Этот результат может быть связан с повышенной продукцией АКМ и активацией ПОЛ во 2-ой группе пациентов, что приводит к сдвигу редокс-баланса $GSH \leftrightarrow GSSG$ в сторону окисленного глутатиона и повышению прооксидантного потенциала СЖ. Кроме того, активность фермента ксантинооксидазы в мононуклеарной фракции крови пациентов с ГА тесно коррелировала с активностями ферментов NADPH-оксидазы ($r=0.4$), МПО ($r=0.722$) и СОД ($r=0.921$). С одной стороны, работа КОР продуцирует важнейший антиоксидант мочевую кислоту, но с другой стороны, её конверсия в оксидантную форму в условиях окислительного стресса способствует генерации супероксидных анион-радикалов (также генерируются NADPH-оксидазой) и H_2O_2 (является субстратом МПО). Активация МПО приводит к развитию галогенирующего стресса в мононуклеарах крови, а активация СОД может играть роль компенсаторного защитного механизма. Обнаруженный дисбаланс функционирования антиоксидантных ферментов одновременно с активацией продукции АКМ в мононуклеарах при ГА может способствовать интенсификации апоптоза – генетически программируемой клеточной гибели. Цитофлуориметрическая оценка уровня апоптоза по экспрессии фосфатидилсерина во внешнем монослое мембраны лимфоцитов с помощью FITC-меченого аннексина V показала, что в обеих группах больных ГА наблюдается повышение на 54-60% уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови. Процесс апоптоза разных стадий оказался характерен и для клеток хрящевой ткани – хондроцитов, что соответствует последним данным, согласно которым выживание хондроцитов крайне важно для поддержания целостности хрящевого матрикса, а гибель хондроцитов путём апоптоза/некроза повышается при ОА [9]. С помощью электронно-микроскопических исследований на ранних стадиях апоптоза были выявлены хондроциты сохранный структуры, имеющие целостную клеточную и ядерную оболочки, структурированную цитоплазму и хроматин в ядре. На поздних стадиях апоптоза была выявлена резкая конденсация хроматина, отек перинуклеарного пространства, фрагментация ядра на более мелкие частицы. В дальнейшем наблюдалась фрагментация не только ядра, но и цитоплазмы с образованием типичных апоптотических телец. Причем, показано, что деструктивно-дистрофические изменения хряща при ГА обусловлены микроциркуляторными нарушениями в синовиальной оболочке и синовитом, который носит очаговый характер. Нейрональная NO-синтаза (*nNOS*), как показано, экспрессируется не только в нейронах, но и в других тканях. Установлено, что *nNOS* необходима для нормального гомеостаза в костной ткани и поддержания её массы [10]. Хондроциты *nNOS*-нокаутных мышей характеризовались меньшим числом, ранним завершением клеточного цикла и усиленным апоптозом [11]. SNP-84 (G>A, rs41279104) в гене *nNOS* способствует снижению экспрессии – в гомозиготном состоянии –84AA экспрессия была снижена на 30% [12]. В нашем исследовании обнаружены значимые различия ($P=0.02$) в частоте генотипов и аллелей SNP *nNOS* G-84A между двумя группами – пациентами с ГА и контролем. Таким образом, поскольку критерием включения в группу для генотипирования был травматический этиологический фактор, вследствие которого развился ГА, можно заключить, что аллель A SNP *nNOS* G-84A является фактором риска посттравматического ГА. Важно, что снижение экспрессии *nNOS* приводит к ослаблению сигнального пути NO/cGMP/киназы, который через регуляцию Bcl-2 связанных генов осуществляет супрессию каспазной активности [13], а также участвует в антиапоптотических путях. Полученные данные свидетельствуют о нарушении редокс-гомеостаза в мононуклеарах крови и синовиальной жидкости пациентов с диагнозом гонартроз, которое было более глубоким и значимым у пациентов по мере прогрессии. Это сопровождается гиперпродукцией АКМ, накоплением продуктов липо пероксидации, измене-

ниями активности ферментных систем генерации и обезвреживания АКМ, что в мононуклеарах периферической крови и хондроцитах суставного хряща способствовало повышению интенсивности гибели клеток путём апоптоза.

Литература.

1. Krasnokutsky S., Attur M., Palmer G. et al. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis // *Osteoarthr. Cartil.* 2008. - Vol. 16. - S1-S3.
2. Lotz M., Loeser R.F. Effects of aging on articular cartilage homeostasis // *Bone*. 2012. - Vol. 51. - P. 241-48.
3. Prieto-Montana J.R., Riancho J.A. Osteoarthritis as a genetic condition // *Rev. esp. cir. ortop. Traumatol.* 2009. - Vol. 53, No.4. - P. 271-7.
4. Mathy-Hartert M., Hogge L., Sanchez C. et al. Interleukin-1b and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation // *Osteoarthr. Cartil.* 2008. - Vol. 16. - P. 756-63.
5. Hashimoto S., Takashi K., Amiel D. et al. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis // *Arthr. Rheum.*, 1998. - Vol. 41. - P. S41.
6. Zamli Z. and Sharif M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? // *Int. J. Rheum. Dis.* 2011. - Vol. 14. - P. 159-66.
7. Yan Q., Feng Q., Beier F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice // *Osteoarthr. Cartil.* 2012. - Vol. 20. - P. 144-51.
8. Shah R., Raska JrK., Tiku M.L. The presence of molecular markers of *in vivo* lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* 2005 - Vol. 52. - P. 2799-807.
9. Kuhn K., D'Lima D.D., Hashimoto S., Lotz M. Cell death in cartilage // *Osteoarthr. Cartil.* 2004. - Vol. 12. - P. 1-16.
10. Van't Hof R.J., Macphee J., Libouban H., Helfrich M.H., Ralston S.H. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase // *Endocrinol.* 2004. - Vol. 145, No. 11. - P. 5068-74.
11. Amin A.R., Cesare P.E., Vvas P., Attur M., Tzeng E., Billiar T.R. et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase // *J. Exp. Med.* 1995. - Vol. 182. - P. 2097-102.
12. Miao X., Garcia-Barcelo M.M., So M., Tang W., Dong X., Wang B. et al. 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. - P. 709-13.
13. Clson S.Y., Garban H.J. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer // *Nitric Oxide.* 2008. - Vol. 19. - P. 170-6.

Изменение структуры слизистой желудка и кишечника при сальмонеллёзной инфекции на фоне хронического гепатита

Кульманова М.У., Сайорова Р.А., Календарев А.Э
Ташкентская медицинская академия, кафедра биоорганической и биологической химии. Ташкент, Республика Узбекистан.

Нормальная жизнедеятельность человеческого организма предполагает поддержание условий внутренней среды, которые в значительной степени отличаются от условий среды внешней. Область контакта этих двух сред имеет важнейшее зна-