

УДК 616.72-002.77-06:616.316-008.811.4

УЧАСТИЕ ЦИКЛА ОКСИДА АЗОТА В ФОРМИРОВАНИИ АУТОИММУННОЙ КОМПОНЕНТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СИНДРОМА ШЕГРЕНА

Д.О. Якименко, кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей стоматологии
Одесский национальный медицинский университет, Украина

Аннотация. Изучали гистологические изменения, активность ферментов цикла оксида азота у 68 крыс с экспериментальной моделью синдрома Шегрена, полученной путем введения в околушную слюнную железу крысы смеси вакцины БЦЖ и глицерина. Развитие модели сопровождается нарастанием количества антител к тканям слюнной железы и одновременно снижением количества ЦИК, что объясняет сочетание нарастающей дегенерации слюнной железы при минимальных проявлениях воспалительной реакции. Одновременно имеют место изменения в цикле оксида азота. Это проявляется снижением активности NO-синтазы в тканях слюнной железы при одновременном увеличении активности ее в макрофагах, расположенных в ее ткани, и снижением NO_x в сыворотке крови.

Ключевые слова: синдром Шегрена, экспериментальная модель, вакцина БЦЖ, цикл оксида азота, гранулы формазанов, гуморальный иммунитет.

Болезнь Шегрена (первичный синдром Шегрена) (БШ) – системное заболевание неизвестной этиологии, характерным компонентом которого является хронический аутоиммунный и лимфопролиферативный процессы. Синдром Шегрена (СШ) или вторичный синдром Шегрена – патология, встречающаяся у 5-25 % больных с системными заболеваниями соединительной ткани, чаще – ревматоидным артритом [1, 2, 5, 8]. Клиническими проявлениями обоих выступают паренхиматозный сиалоаденит и кератоконъюнктивит. Хотя прямых доказательств вирусной этиологии БШ и СШ не существует [7, 9], большинство исследователей полагают, что в основе патогенеза лежат иммунопатологические реакции на вирусные антигены. При этом указывают на присутствие детерминированных генетически и приобретенных дефектов иммунорегулирующих механизмов [6].

Неразрешенность вопроса патогенеза БШ и СШ, в частности, роль измененной сосудистой системы и механизмов регуляции ее тонуса, а также механизмов гуморальной регуляции интенсивности воспалительных процессов, создают серьезные трудности в разработке методических подходов к лечению данного страдания. Малая результативность применяемых методов лечения БШ и СШ делает актуальным исследование, направленные на решение вопросов патогенеза этого страдания, а также на вопросы разработки патогенетически обоснованных методов коррекции. Однако проведение подобных исследований на людях является некорректным с позиции этики, следовательно, на первый план выходят работы, осуществляемые на экспериментальных моделях. Работа с экспериментальными моделями требует доказательств адекватности изменений в организме подопытных животных тем, что наблюдаются при развертывании патологического процесса у людей.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы была оценка изменений иммунных и сосудодвигательных (цикл оксида азота) механизмов в организме белых крыс при моделировании СШ и их соответствия изменениям в организме больных с СШ.

Материалы и методы. Материалом настоящего исследования послужили результаты, полученные при исследовании 69 белых крыс-самцов линии Вистар аутобредного разведения, массой тела 180-200 г. Животные в соответствии с задачами работы были рандомизированы на 2 группы. I группа – 15 животных, содержавшихся в условиях вивария и не подвергавшихся никаким воздействиям, служили контролем. II группа – 54 животных, у которых моделировали СШ.

Моделирование СШ осуществлялось однократным введением 0,5 мл смеси из 20 доз вакцины БЦЖ+1,0 растворителя+1,0 мл глицерина в тело правой околушной железы. Работа с животными осуществлялась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1987) и Закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» 2006 г. с изменениями 15.12.2009 г.

Животных выводили из опыта на 14, 21, 28 сутки после введения смеси путем декапитации под легким эфирным наркозом. У животных забирали 5 мл крови, в сыворотке которой определяли содержание NO_x и основные показатели иммунного ответа: содержание антител к слюнной железе, содержание ЦИК и гетерогенных антител. Кроме того, у животных извлекали правую околушную слюнную железу, из которой после фиксации

в 4 % параформальдегиде извлекали кусочки. Затем кусочки замораживали сухой углекислотой, из полученных блоков изготавливали криостатные срезы, на которых по прописям Винсент и Кимуры [3] определяли активность NO-синтазы. Оценивали активность NO-синтазы полуколичественным методом с учетом количества, размеров, цветности и расположения гранул формазанов.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования содержания соединений, участвующих в деятельности цикла оксида азота, отражены в таблице 1. Согласно данным таблицы 1, содержание NO_x на начальных этапах развития патологического процесса остается на уровне контроля, а затем резко снижается. Одновременно отмечается изменение активности NO-синтазы в теле слюнных желез. При проведении гистохимического исследования активности NO-синтазы в ткани слюнных желез интактных крыс обнаружено следующее. Эритроциты в просвете сосудов серо-желтого цвета. Стенки сосудов контурируются небольшим количеством серо-коричневых и серо-черных гранул. Фоновая окраска бледно-серая или бледно-песочная прозрачная. В эпителиоцитах встречаются отдельные желто-песочного цвета некрупные гранулы. В целом можно говорить об умеренной активности NO-синтазы.

Таблица 1

**Динамика содержания NO_x и мочевой кислоты
в ткани слюнной железы крыс с моделью синдрома Шегрена**

| Группа/ показатель | контроль | СШ 14 суток | СШ 21 сутки | СШ 28 суток |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| Мочевая кислота | 274,40 ± 10,3 | 297,56 ± 20,1 | 277,55 ± 19,4 | 299,4 ± 21,7 |
| NO _x | 40,29 ± 2,3 | 40,22 ± 3,3 | 31,59 ± 2,4 | 32,2 ± 2,6 |

На 14 сутки опыта в сосудах эритроциты серо-желтые. По контуру сосуда единичные серо-черные мелкие гранулы. Фоновая окраска препарата прозрачная серо-фиолетовая. По препарату с разной плотностью распределены группы из 3-4 мелких черных гранул формазанов (очевидно, это нейтрофилы инфильтрата [4]). В целом можно говорить об умеренной активности NO-синтазы при ее достаточной активности в макрофагах.

Через 21 сутки от введения БЦЖ в сосудах слюнных желез эритроциты серо-желтого цвета, по внутреннему контуру сосудистой стенки единичные черные мелкие гранулы, фон препарата прозрачный серо-желтый. По препарату рассеяны довольно равномерно сгруппированные по 2-3-4 штуки средние гранулы черного цвета. Визуально их количество несколько больше, чем в предыдущем сроке наблюдений. В целом можно говорить об умеренной или выше умеренной активности макрофагальной NO-синтазы. Следует отметить, что одновременно отмечается снижение содержания NO_x, возможно, это связано с активацией образования нитрозаминов, которая является ответом на наличие ксенобиотиков (продукты распада клеток), а они могут выступать инициаторами развития аутоиммунных реакций.

К моменту окончания эксперимента картина гистоэнзиматологически определяемой активности NO-синтазы в ткани околушной железы в целом соответствует описанию 14 суток опыта. Поскольку при этом содержание NO_x в крови ниже нормы, можно полагать, что образование оксида азота происходит с акцентом на цитохромоксидазный путь и возможным сохранением высокой интенсивности нитрозаминообразования, т.е. сохраняется возможность поддержания аутоиммунных процессов.

Что касается содержания мочевой кислоты в ткани слюнной железы, то, как следует из данных таблицы 1, ее содержание колеблется в пределах физиологического коридора. Можно полагать, что развитие аутоиммунных процессов инициирует постепенное дистрофически-дегенеративное угасание эпителия желез, а не катастрофическое разрушение, которое могло бы инициировать резкий катаболизм азотистых соединений.

Следующим этапом работы была оценка изменений гуморальной компоненты иммунного ответа. Результаты исследований отражены в таблице 2.

Таблица 2

**Динамика показателей гуморальной компоненты
иммунного ответа в динамике моделирования синдрома Шегрена**

| Группа/ Показатель | контроль | СШ 14 суток | СШ 21 сутки | СШ 28 суток |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ГА | 6,0 ± 0,80 | 4,57 ± 0,95 | 5,0 ± 0,86 | 3,25 ± 0,37 |
| ЦИК, у.е. | 5,70 ± 0,20 | 5,81 ± 0,49 | 5,93 ± 0,24 | 5,17 ± 0,12 |
| Антитела к слюнной железе | 0 | 20,0 ± 5,7 | 32,5 ± 3,66 | 50,0 ± 9,26 |

Как видно из данных таблицы 2, для развития модели синдрома Шегрена характерно непрерывное и достаточно значительное увеличение содержания антител к ткани слюнной железы, т.е. имеет место формирование базы для длительного существования аутоиммунных процессов. Кроме того, имеет место сохранение на уровне близком к контролю количества циркулирующих иммунокомплексов, являющихся основным провоспалительным агентом в организме. Такие изменения объясняют, почему развитие модели синдрома Шегрена не сопровождается выраженной картиной воспаления в тканях слюнной железы.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что развитие модели синдрома

Шегрена у крыс сопровождается нарастанием количества антител к тканям слюнной железы и одновременно снижением количества ЦИК, что объясняет сочетание нарастающей дегенерации слюнной железы при минимальных проявлениях воспалительной реакции. Одновременно имеют место изменения в цикле оксида азота. Это проявляется снижением активности NO-синтазы в тканях слюнной железы при одновременном увеличении активности ее в макрофагах, расположенных в ее ткани и снижением NO_x в сыворотке крови. Такие изменения могут иметь место при активации образования нитрозаминов, которые, будучи весьма токсичными соединениями, обуславливают разрушение клеток слюнных желез и создают условия для активации аутоиммунных процессов. Очевидно, изменения в цикле оксида азота являются одним из механизмов реализации патогенеза синдрома Шегрена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев, В.И. Критерии диагноза болезни и синдрома Шегрена / В.И. Васильев, М.В. Симонова, Т.Н. Сафонова // В.кн. Избранные лекции по клинической ревматологии. Под ред. Насонова В.А., Бунчук Н.В. // М., Медгиз. 2001. – С. 112-132.
2. Васильев, В.И. Болезнь Шегрена: клиничко-лабораторные, иммуноморфологические проявления и прогноз. Дисс.д.мед.н / В.И. Васильев. – М., 2007. – С. 1-343.
3. Винсент, С.Р., Кимура Х. Гистохимическое картирование NO-синтазы в мозгу крыс / С.Р. Винсент, Х. Кимура. – Саенс, 1992, №2. – С. 567-575.
4. Реутов, В.П. Цикл оксида азота в организме млекопитающих и принцип цикличности / В.П. Реутов // Биохимия., Т.67, вып 3. – С. 353–376.
5. Blohk K., Buchanan W., Wolf M., Bunim J. Sjogren's syndrome: a clinical, pathological and serological study of sixty-two cases.- Medicum (Baltimore), 1965, 44; 187-231.
6. Eriksson P., Jonsson R. (eds).- State of the art lectures on Sjogren's syndrome.- Hygiea, 1999, 108, part 1.
7. Jonsson R., Haga H.-J. > Gordon T. Sjogren's syndrome. In arthritis and Allied conditions. A textbook of rheumatology. Koopman W.S., ed 14th, Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001; 1736-1759.
8. Nasonova V.A., Vasiliev V.I. Sjogren - syndrome und Sjogren-Krankheit in der Rheumatologie. Klini patologie. Experiment. 1981; 36,6. 199-203.
9. Talal N., Moutsopoulos H., Kassan S. (eds) Sjogren syndrome. Clinical and immunological aspects/ Berlin Springer-Verlag, 1987, 1-299.

Материал поступил в редакцию 02.07.18.

PARTICIPATION OF THE NITROGEN OXIDE CYCLE IN AUTOIMMUNE COMPONENT FORMATION IN EXPERIMENTAL MODEL OF THE SJÖGREN SYNDROME

D.O. Yakimenko, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the General Dentistry Department
Odessa National Medical University, Ukraine

Abstract. *In this paper we studied histological changes, ferment strength of nitrogen oxide cycle at 68 rats with the experimental model of the Sjögren syndrome obtained by introduction of mixture of BCG vaccine and glycerin into parotid gland of the rat. The model development is followed by increase of quantity of parotid gland tissues antibodies and at the same time by decrease in number of the CIC, that explains a combination of the increased degeneration of parotid gland at the minimum manifestations of inflammatory reaction. At the same time changes in the nitrogen oxide cycle take place. It is shown by decrease of the NO-synthase activity in parotid gland tissues at simultaneous increase in its activity in the macrophages, which are located in its tissue, and NO_x decrease in blood serum.*

Keywords: *Sjögren syndrome, experimental model, BCG vaccine, nitrogen oxide cycle, granule of formazan, antibody mediated immunity.*