

Содержание конечного продукта оксида азота в хряще и сыворотке крови крыс при низкотемпературном моделировании деструктивно-дистрофического процесса в коленном суставе

UDC 615.832.9:616.728.3:612.014.463

B.P. VVEDENSKY, L.N. TYNYNYKA, G.A. KOVALEV, B.P. SANDOMIRSKY*

Content of Nitric Oxide Final Product in Cartilage and Blood Serum of Rats at Low Temperature Modeling of Destructive and Dystrophic Process in Knee Joint

Установлено, что в механизме деградации хрящевой ткани важную роль играет оксид азота. Исследовано содержание конечного продукта обмена NO (нитрита) в хрящевой ткани коленного сустава и сыворотке крови крыс при низкотемпературном моделировании деструктивно-дистрофического процесса (ДДП) коленного сустава, вызванного его криповреждением. Показано, что его содержание увеличивается у старых животных, что может свидетельствовать о накоплении гликозилированных продуктов коллагена, угнетении посредством NO протеогликанов матрикса, приводящих к нарушению механических свойств хрящевой ткани. При низкотемпературном моделировании ДДП содержание конечного продукта NO в хрящевой ткани и сыворотке крови у экспериментальных животных было увеличено в 4 раза по сравнению с интактными. Исследуемый показатель практически не изменялся в течение 7 суток в хрящевой ткани крыс, тогда как в аналогичных условиях возрастал в сыворотке крови, что свидетельствует о развитии ДДП в хрящевой ткани коленного сустава животных.

Ключевые слова: оксид азота, хладагент, криповреждение коленного сустава, деструктивно-дистрофический процесс, хрящевая ткань.

Встановлено, що в механізмі деградації хрящової тканини важливу роль відіграє оксид азоту. Досліджено вміст кінцевого продукту обміну NO (нітриту) в хрящовій тканині колінного суглоба і сироватці крові щурів при низькотемпературному моделюванні деструктивно-дистрофічного процесу (ДДП) колінного суглоба, викликаного його крипошкодженням. Показано, що його вміст збільшується у старих тварин, що може свідчити про накопичення гліколізованих продуктів колагену, пригнічення за допомогою NO протеогліканів матриксу, що призводять до порушення механічних властивостей хрящової тканини. При низькотемпературному моделюванні ДДП вміст кінцевого продукту NO в хрящовій тканині і сироватці крові у експериментальних тварин було збільшено в 4 рази в порівнянні з інтактними. Досліджуваний показник практично не змінювався протягом 7 діб в хрящовій тканині щурів, тоді як в аналогічних умовах зростає у сироватці крові, що свідчить про розвиток ДДП у хрящовій тканині колінного суглоба тварин.

Ключові слова: оксид азоту, хладагент, крипошкодження колінного суглоба, деструктивно-дистрофічний процес, хрящова тканина.

In the mechanism of cartilage tissue degradation the nitric oxide has been found to play an important role. There has been examined the content of NO (nitrite) final metabolic product in cartilage tissue of knee joint and blood serum of rats during low temperature modeling of destructive-dystrophic process (DDP) of knee joint, caused by cryoinjury. It has been shown that its content increases in aged animals, likely testifying to an accumulation of collagen glycolysated products, suppression by NO of matrix polyglycans, leading to impaired mechanical properties of cartilage tissue. At low temperature modeling of DDP the content of NO final product in cartilage tissue and blood serum in experimental animals was 4 times increased if compared with intact ones. The examined index did not virtually change for 7 days in cartilage tissue of rats, meanwhile under the analogous conditions it increased in blood serum, testifying to the development of DDP in cartilage tissue of animal knee joint.

Key words: nitric oxide, cooling agent, cryoinjury of knee joint, destructive-dystrophic process, cartilage tissue.

Наиболее распространенными патологиями опорно-двигательного аппарата являются дегенеративные заболевания суставов, чаще всего характеризующиеся скрытым прогрессирующим разрушением суставного хряща и сопутствующими изменениями других суставных структур. При этом нарушаются синхронные процессы биодegradации

The most widespread pathologies of locomotor apparatus are degenerative diseases of joints, often featured with latent progressing destruction of cartilage joint and accompanying changes in other structures. Herewith the synchronous processes of biodegradation and formation of cartilage joint cells as well as that of subchondrial bones are impaired. Pathogenesis of

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: bsan38@yahoo.com

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: bsan38@yahoo.com

и образования клеток суставного хряща, а также субхондральной кости. Патогенез заболеваний опорно-двигательного аппарата обусловлен преобладанием катаболических процессов над анаболическими, что приводит к потере биологических свойств хряща [2, 7, 9]. Известно, что на механизм деградации хрящевой ткани влияет оксид азота (NO), который является уникальным медиатором межклеточных взаимодействий и участвует в поддержании гомеостатических параметров организма, регуляции большинства функций (экспрессия генов, контроль высвобождения нейромедиаторов, реализация иммунного ответа организма), а также в развитии ряда патологических состояний, в том числе остеоартроза, артрита [2, 3, 7, 9]. Оксид азота – универсальный регулятор клеточного и тканевого метаболизма может быть использован в качестве маркера ранних, доклинических изменений гиалинового хряща – инициального субстрата остеоартроза [12]. Можно полагать, что стандартизация метода разрушения хрящевой ткани позволит получить более полную информацию о местных и общих патофизиологических изменениях при артрозо-артритах.

Моделирование патологического процесса хрящевой ткани коленного сустава с помощью криодеструкции отражено недостаточно в литературе. Существующие экспериментальные модели остеоартроза и методы их оценки не являются универсальными и отражают, как правило, одно из звеньев этиопатогенеза патологического процесса [1, 6]. В настоящее время отсутствует единое мнение относительно участия NO в развитии хрящевой деградации ткани. Однако результаты исследований, выполненных на различных моделях остеоартроза у животных, свидетельствуют о его влиянии на развитие деструктивно-дистрофического процесса (ДДП) в хрящевой ткани [8–11].

Цель работы – изучение содержания конечного продукта обмена NO в хрящевой ткани коленного сустава и сыворотке крови крыс при низкотемпературном моделировании ДДП в коленном суставе.

Материалы и методы

Для достоверного и точного определения содержания NO используют прямой метод измерения концентрации свободного NO с помощью NO-селективных электродов. Поскольку NO является газом с достаточно коротким временем жизни и высокой реакционной способностью, мы использовали вариант измерения его стабильного метаболита – нитрита. Определяемый уровень нитрита зависит как от активности специфических синтаз, так и от скорости его выведения почками. При этом оценка концентрации конечных продуктов обмена NO наиболее приемлема для мониторинга общего уровня продукции NO [2].

locomotor apparatus diseases is stipulated with prevailing of catabolic processes over anabolic ones, leading to the loss of biological properties of cartilage [2, 7, 9]. It is known that the mechanism of cartilage tissue degradation is affected by nitric oxide (NO) being a unique mediator of cell-cell interactions and participating in maintaining the homeostatic parameters of an organism, regulation of major functions (gene expression, control of neuromediator release, implementation of immune response of an organism), as well as in the development of some pathological states, including osteoporosis and arthritis [2, 3, 7, 9]. Nitric oxide being an universal regulating agent of cell and tissue metabolism can be used as the marker of early, pre-clinical changes of hyaline cartilage, initial substrate of osteoporosis [12]. One may believe that the standardizing of the method for cartilage tissue destruction enables the obtaining of a complete information and general pathophysiological changes in arthroses and arthrites.

Modeling of pathological process of knee joint cartilage tissue using cryodestruction has been reported insufficiently. The existing experimental models of osteoarthrosis and the methods of their assessment are not universal and reflect as a rule one of the links of etiopathogenesis of pathological process [1, 6]. Nowadays there is a common notion about NO involvement in the development of cartilage tissue degradation. However, the research results presented in different osteoarthrosis models in animals testify to its effect on the development of destructive-dystrophic process (DDP) in cartilage tissue [8–11].

The research aim was to study the content of final product of NO metabolism in knee joint cartilage tissue and blood serum of rats in low temperature modeling of DPP in knee joint.

Materials and methods

For statistically significant and accurate examination of NO content the direct method of measuring the concentration of free NO using NO-selective electrodes is used. Since NO is the gas with quite short life span and high reactive ability we have used the variant of measuring its stable metabolite, nitrite. The examined level of nitrite depends both on activity of specific synthases and on the rate of its excretion by kidneys. Herewith the assessment of concentration of NO metabolism final products is the most acceptable for monitoring of total level of NO production [2].

The research was performed in white breedless rats in accordance with General Ethical Principles of the Experiments in Animals, approved by the 3rd National Congress in Bioethics and coordinated with the statements of European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Destructive

Работу выполняли на белых беспородных крысах в соответствии с “Общими этическими принципами экспериментов на животных”, одобренными III Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2007) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1986). Деструктивно-дистрофический процесс в хрящевой ткани моделировали путем криповреждения коленного сустава, используя модификацию способа, описанного ранее [4]. С этой целью однократно выполняли внутрисуставную инъекцию хладагента, в качестве которого применяли раствор этанола, охлажденный до температуры жидкого азота и оттаявший до появления жидкой фазы [4]. Этот способ низкотемпературного моделирования ДДП в хрящевой ткани животных не требует хирургического вмешательства, снижает риск возникновения осложнений и исключает возможность криповреждения параартикулярных тканей. Кроме того, данная модель позволяет максимально стандартизировать патологический процесс, что обеспечивает высокую повторяемость результатов местных и общих изменений в организме в ответ на заболевание.

Животные разного возраста были разделены на 4 группы по 10 в каждой: 1 – 1–2-недельные (молодые); 2 – 6–7-месячные (взрослые), 3 – 18-месячные (старые), 4 – животные с экспериментальной моделью ДДП в коленном суставе, у которых оценивали на 1-, 3- и 7-е сутки содержание конечного продукта обмена NO в сыворотке крови и гомогенате хрящевой ткани коленного сустава фотометрическим методом по реакции Грисса [5].

Статистический анализ данных проводили непараметрическим методом с использованием компьютерных программ Excel и “Statistica 17.0” и U-критерия Манна-Уитни ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Среди многочисленных моделей остеоартроза существует стандартный способ моделирования ДДП коленных суставов: 1–2 раза в две недели на протяжении месяца в коленный сустав собак вводят преднизолон в дозе 15–25 мл [1]. Недостатками способа являются не только локальное, но и системное влияние препарата на организм подопытных животных, в результате которого могут возникнуть осложнения, в частности со стороны эндокринной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, костно-мышечной систем. Кроме того, развитие дерматологических и аллергических реакций связано с иммунодепрессивным действием преднизолона.

Низкотемпературное моделирование ДДП в суставе заключается в прямом воздействии на

and dystrophic process in cartilage tissue was simulated by cryodamage of knee joint with modifying the method [4]. With this aim there was done a single injection of ethanol solution (as a cooling agent) cooled down to the temperature of liquid nitrogen and thawed up to the appearance of liquid phase [4]. This method of low temperature DDP modeling in cartilage tissue of animals does not require any surgery, reduces the risk of appearance of complications and excludes the possible cryodamage of para-articular tissues. In addition, this model allows the maximum standardizing of pathological process providing a high repeatability of the results of local and general changes in an organism in response to a disease.

The animals of different age were divided into 4 groups by 10 in each: 1 – 1–2 week-old ones (young); 2 – 6–7 month-old ones (adult); 3 – 18 month-old ones (aged); 4 – the animals with experimental model of DDP in knee joint, in which there was estimated by 1st, 3rd and 7th day the content of NO metabolism final product in blood serum and homogenate of cartilage tissue of knee joint with photometric method according to the Griess reaction [5].

The data were statistically analyzed by non-parametric method using Excel and Statistica 17.0 software, as well as Mann-Whitney U-test ($p < 0.05$).

Results and discussion

Among multiple models of osteoarthritis there is a standard method of modeling DDP of knee joints: 1–2 times in two weeks during a month into a knee joint of dogs prednisolone was administrated in a dose of 15–25 ml [1]. The short-coming of the method is not only local but also systemic effect of preparation on organism of experimental animals, resulting in possible complications in particular of endocrine, cardiovascular, digestive, musculo-skeletal systems. In addition the development of dermatological and allergic reactions is related to immune depressive effect of prednisolone.

Low temperature modeling of DDP in a joint consists in a direct effect on joint cartilage by the vapor jet of liquid nitrogen at the pressure of 0.2–0.6 atm during 6–88 seconds [6]. The short-comings of this method are its complicity, traumaticity and significant risk of the surgery-related complications. During surgical approach the joint elements are strongly subjected to trauma, in surgery of ligaments an instability in a joint appears, and the rests of sutures may contribute to the appearance of post-operative complications. In addition, during cryoeffect of liquid nitrogen vapor jet on joint cartilage there is a possibility of cryodamage of para-articular tissues.

In our research during cryoeffect on knee joint cartilage tissue of liquid fraction of ethanol cooled in liquid nitrogen vapors the probability of complications and cryodamage of para-articular tissues are minimal,

суставной хрящ струей пара жидкого азота под давлением 0,2–0,6 атм в течение 4–8 с [6]. Недостатками данного способа являются его сложность, травматичность и значительный риск возникновения осложнений, которые связаны с хирургическим вмешательством. В ходе оперативного доступа значительно травмируются элементы сустава, при пересечении связок возникает нестабильность в суставе, а остатки шовного материала могут способствовать возникновению послеоперационных осложнений. Кроме того, во время криовоздействия струи пара жидкого азота на суставной хрящ возможно криповреждение параартикулярных тканей.

В нашей работе при криовоздействии на хрящевую ткань коленного сустава жидкой фракции этанола, охлажденного в парах жидкого азота, вероятность возникновения осложнений и криповреждения параартикулярных тканей минимальны, что позволяет адекватно оценить модель ДДП с помощью экспресс-мониторинга уровня NO в хрящевой ткани и сыворотке крови.

Оксид азота образуется в результате активности семейства изоферментов синтазы NO (NOS), способных образовывать NO из L-аргинина. Выделяют три изофермента NOS, кодируемых разными генами [2]. NOS I типа присутствует в нейронах мозга. Предполагают, что этот фермент может генерировать NO в ответ на рецепторную стимуляцию или действие агентов, повышающих уровень внутриклеточного кальция [12]. NOS II типа находится преимущественно в растворимой форме и относится к индуцибельной изоформе NOS, которая менее зависима от ионов кальция и кальмодулина. NOS III типа характерен для эндотелиальных клеток и может быть как в растворимой, так и мембранно-связанной форме [12]. Не существует единого мнения относительно присутствия NO в нормально функционирующем хряще [12, 13]. У некоторых авторов NO ассоциируется только с развитием ДДП [11–13]. В наших исследованиях было показано, что содержание конечного продукта NO в хрящевой ткани коленного сустава и сыворотке крови в норме зависит от возраста животных. Так, содержание нитрита в хрящевой ткани и сыворотке крови взрослых и молодых крыс достоверно не отличается (рис. 1), тогда как у взрослых животных оно в 2 раза меньше по сравнению со старыми, а в сыворотке крови – в 1,5 раза.

Установлено, что содержание конечного продукта NO в хрящевой ткани коленного сустава и сыворотке крови крыс при низкотемпературном моделировании ДДП на 1-е сутки после введения хладагента повышалось в 3 раза по сравнению с нормой (рис. 2) и не изменялось в течение 1-, 3- и

allowing to adequately assess the DDP model by means of express monitoring of NO level in cartilage tissue and blood serum.

Nitric oxide is resulted from the activity of isoenzyme family of NO synthase (NOS) capable to form NO from L-arginine. There are defined three NOS isoenzymes coded with different genes [2]. NOS-I type is present in brain neurons. It is supposed that this enzyme may generate NO in response to receptor stimulation or the effect of agents increasing the level of intracellular calcium [12]. NOS-II type is predominantly in a soluble form and referred to the inducible isoform of NOS, which is less dependent on calcium and calmodulin ions. NOS-III type is characteristic for endothelial cells and may be both in soluble and membrane-bound forms [12]. There is no unified opinion as for the presence of NO in normally functioning cartilage [12, 13]. Some authors associate NO only with the development of DDP [11–13]. In our studies it has been shown that the content of NO final product in cartilage tissue of knee joint and blood serum in the norm depends on animal's age. So, the content of nitrite in cartilage tissue and blood serum of adult and young rats does not statistically differ (Fig. 1) meanwhile in adult animals it twice lower if compared with aged ones and blood serum in 1.5 times.

It has been established that the content of NO final product in cartilage tissue of knee joint and rat blood serum during low temperature simulation of DDP to

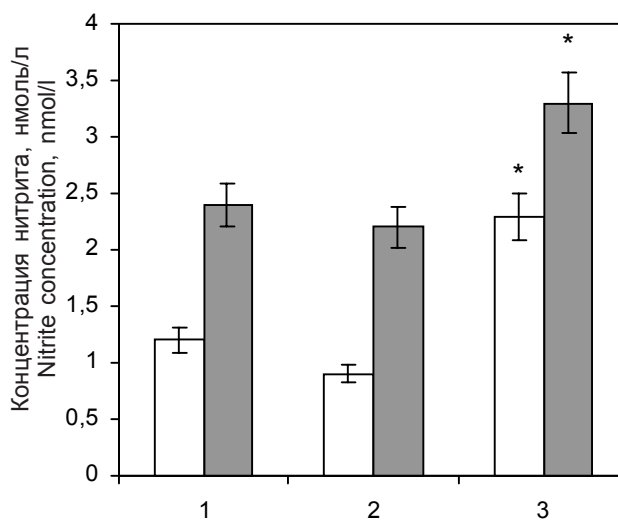


Рис. 1. Уровень конечного продукта NO (нитрита) в гомогенате хрящевой ткани (□) и сыворотке крови (■) у крыс разных возрастов: 1 – 1–2-недельные (молодые); 2 – взрослые; 3 – старые; * – различия статистически достоверны по сравнению с группами 1 и 2 ($p < 0,05$).

Fig. 1. Level of NO final product (nitrite) in homogenate of cartilage tissue (□) and blood serum (■) in rats of different age: 1 – one-two week-old animals (young); 2 – adult rats; 3 – aged rats; * – differences are statistically significant if compared with data of the groups 1 and 2 ($p < 0.05$).

7-х суток после эксперимента. Однако наблюдалась тенденция к его понижению на 7-е сутки. При аналогичных условиях в сыворотке крови экспериментальных животных на 1-е сутки после введения хладагента содержание NO в 3 раза превышало норму, на 7-е сутки увеличивалось в 4 раза по сравнению с нормой и достоверно отличалось на 1-е сутки после введения хладагента. Полученные результаты свидетельствуют о деградации хрящевой ткани коленного сустава крыс, вызванной криповреждением. Основываясь только на анализе изменений концентрации конечных продуктов обмена NO без использования специфических блокаторов различных форм NO-синтаз (NOS) и определения уровня их синтеза, невозможно описать точные механизмы регулирования обмена NO и участия NOS в реализации ответа организма на ДДП в коленном суставе после введения хладагента. Однако можно предположить, что в этом процессе участвуют все звенья регулирования обмена NO, который, как известно, может играть роль основного цитотоксического и цитостатического эффектора системы клеточного иммунитета, оказывая при этом как аутокринное, так и паракринное действие. Провоспалительные цитокины, например интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β), фактор некроза опухоли α (TNF α), а также цитокины, модулирующие воспалительные реакции, вызванные криповреждением хрящевой ткани, стимулируют синтез индуцибельной NO-синтазы (iNOS), что приводит к генерации большого количества NO [12, 13], об этом свидетельствует повышение уровня конечного продукта NO в сыворотке крови экспериментальных животных.

Литературные данные подтверждают наличие базового уровня продукции NO в хрящевой ткани взрослого организма [2, 7, 9, 13]. Известно, что с возрастом содержание NO увеличивается: в зрелом возрасте оно может быть в 7 раз выше, чем в молодом [2, 13]. Так, при старении накапливаются гликозилированные продукты коллагена и образуются перекрестные связи, которые нарушают механические свойства хряща [10, 11]. Более того, гликозилированные продукты могут активировать хондроциты, стимулируя образование противовоспалительных цитокинов инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), трансформирующего фактора роста β_1 (TGF- β_1) и активных форм кислорода, которые при участии NO угнетают синтез протеогликанов [7, 9]. В результате происходят срыв репаративных реакций, десинхронизация анаболических и катаболических процессов, поэтому изменяется аминокислотный состав синтезируемых стержневых и связующих белков протеогликанов, нарушается структура гликозаминогликанов [13]. Кроме того, провоспалительные цитокины, например

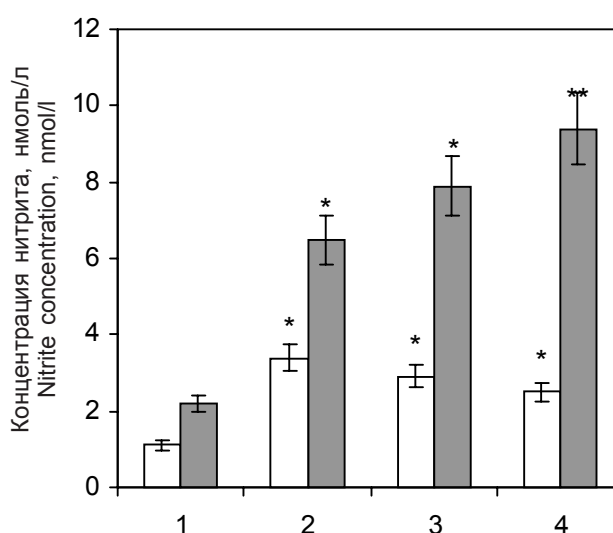


Рис. 2. Уровень конечного продукта NO (нитрита) в гомогенате хрящевой ткани (□) и сыворотке крови (■) при низкотемпературном моделировании ДДП в коленном суставе: 1 – интактные животные; 2, 3, 4 – на 1-, 3-, 7-е сутки после криповреждения соответственно; *, # – различия статистически достоверны по сравнению с группами 1 и 2 соответственно ($p < 0,05$).

Fig. 2. Level of NO final product (nitrite) in homogenate of cartilage tissue (□) and blood serum (■) in rats at low temperature modeling of DPPP in knee joint: 1 – intact animals; 2, 3, 4 – to the 1st, 3rd, 7th days after cryoinjury, correspondingly; *, # – differences are statistically significant versus the groups 1 and 2, correspondingly ($p < 0.05$).

the 1st day after introduction of cooling agent increased 3 times if compared with the norm (Fig. 2) and did not change during 1, 3 and 7 days after the experiment. However, there was observed the tendency to its reduction to the 7th day. Under the same conditions in blood serum of experimental animals to the 1st day after coolant administration the content of NO 3 times exceeded the norm, to the 7th day it enhanced 4 times if compared with the norm and differed statistically and significantly to the 1st day after coolant administration. The findings testify to a cryodamage-caused degradation of cartilage tissue of rat knee joint. Analyzing only the changes in concentration of final products of NO metabolism with no use of specific blocking agents of different forms of NO-synthases (NOS) and examining their synthesis rate it is impossible to describe distinct mechanisms of NO metabolism regulation and participation of NOS in implementation of an organism response to DDP in knee joint after coolant administration. However, one can suppose that in this process all links of regulation of NO metabolism are involved, which is known to play a role of main cytotoxic and cytostatic effector of the system of cell immunity, rendering herewith both autocrine and paracrine effects. Pro-inflammatory cytokines, e. g. interleukin-1 β (IL- β), tumor necrosis factor α (TNF- α) as

интерлейкин-1 (ИЛ-1), участвуют в метаболизме хрящевого матрикса, не оказывая токсического действия на хондроциты. Этот процесс, вероятно, регулируется антагонистами рецепторов ИЛ-1 [9]. Активно противодействуют катаболическому эффекту ИЛ-1, TGF- β_1 , обладающие самостоятельным анаболическим действием на метаболизм хрящевого матрикса. С возрастными изменениями хрящевой ткани эффект нейтрализации исчезает, что может способствовать развитию ДДП.

Эндогенный NO снижает активность синтеза коллагена [2]. При этом возможна реализация супрессорного эффекта NO на синтез коллагена на трансляционном и посттрансляционном уровнях. При низкотемпературном моделировании ДДП в хрящевой ткани NO, вероятно, ингибирует гидроксилазу – ключевой фермент посттрансляционного этапа синтеза коллагеновых волокон [13]. Оксид азота тормозит миграцию хондроцитов и снижает их способность к адгезии с фибронектином. При оценке энергетического метаболизма хондроцитов установлено, что NO способствует выработке большого количества лактата и снижает синтез АТФ, который является составной частью факторов, угнетающих синтез хрящевого матрикса, чувствительного к энергетическому дефициту [8]. Данное обстоятельство может быть причиной возникновения возрастных изменений в хрящевой ткани и повышения уровня продукции NO, о чем свидетельствуют выявленные нами различия уровня конечного продукта NO как в гомогенате хрящевой ткани, так и в сыворотке крови крыс. Большинство повреждающих факторов, связанных с повышением концентрации NO, обусловлено его взаимодействием с супероксид-анионом, приводящим к образованию пероксинитрита, который участвует в инактивации аконитаз, ингибировании клеточного дыхания, инициации перекисного окисления липидов, угнетении митохондриальных функций. Химические реакции с участием пероксинитрита могут вызывать мутацию клеток и апоптоз [11].

Роль NO в деградации хрящевой ткани до конца не изучена. Однако все типы хрящевой ткани после стимуляции провоспалительными агентами синтезируют повышенное количество NO, что в свою очередь создает условия для образования токсических продуктов его метаболизма. Хондроциты, как активированные цитокины, продуцируют едва ли не самое большое количество NO по сравнению с другими типами клеток [12]. Поэтому определение конечного продукта NO может быть одним из дополнительных критериев оценки развития ДДП в хрящевой ткани на ранних этапах. Кроме того, существующие экспериментальные модели ДДП и критерии их оценки трудоемки и не

well as the cytokines modulating inflammatory reactions, caused by cryodamage of cartilage tissue, stimulate the synthesis of inducible NO-synthase (iNOS), leading to generation of a big amount of NO [12, 13], this is confirmed with the rise in the level of NO final product in blood serum of experimental animals.

Literature data confirm the presence of basic level of NO production in cartilage tissue of an adult organism [2, 7, 9, 13]. It is known that ageing is accompanied with the NO content increase: in mature age it can be 7 times higher than in young one [2, 13]. So, during aging there are accumulated glycosylated products of collagen and there are formed the cross-linkings impairing the mechanical properties of cartilage [10, 11]. Moreover, glycosylated products may activate chondrocytes and stimulate the formation of anti-inflammatory cytokines of insulin-like growth factor (IGF-1), transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and active species of oxygen, which together with NO suppress the synthesis of proteoglycans [7, 9]. As a result there is a failure of reparative reactions, desynchronization of anabolic and catabolic processes, that results in changed amino acid composition of the synthesized key proteins and binding proteins of proteoglycans, as well as in damage of the structure of glycosoamines [13]. In addition, pro-inflammatory cytokines, *e. g.* interleukin-1 (IL-1) participate in a cartilage matrix metabolism without toxic effect on chondrocytes. This process is likely regulated by IL-1 receptor antagonists [9]. IL-1, TGF- β_1 have an anabolic effect on cartilage matrix metabolism and actively prevent a catabolic effect. Age-related changes of cartilage tissue are accompanied with disappearance of neutralization effect that likely contribute to DDP development.

Endogenous NO reduces the activity of collagen synthesis [2]. Herewith the implementation of suppressor effect of NO on collagen synthesis at translational and post-translational levels is possible. At low temperature modeling of DPP in cartilage tissue NO apparently inhibits hydroxylase, the key enzyme of post-translation stage of the syntheses of collagen fibers [13]. Nitric oxide inhibits the migration of chondrocytes and decreases their ability to adhesion with fibronectin. When estimating the energetic metabolism of chondrocytes it has been established that NO contributes to production of a big number of lactate and reduces the synthesis of ATP which can be a component of the factors suppressing the synthesis of sensitive to energetic deficit cartilage matrix [8]. This fact may be the cause of appearing age-related alterations in cartilage tissue and rise in NO production level, which is confirmed by the revealed by us differences in the level of NO final product both in homogenate of cartilage tissue and blood serum of rats. The majority of damaging factors related to an increased concentration of NO, stipulated by its interaction with super-

отражают в полной мере протекание патологического процесса в хрящевой ткани. Низкотемпературный способ моделирования ДДП в коленном суставе не требует традиционного хирургического вмешательства, является менее травматичным, что позволяет снизить риск возникновения осложнений по сравнению с известными способами. Кроме того, он исключает возможность криповреждения параартикулярных тканей. Однако динамика изменения уровня оксида азота в хрящевой ткани как при различных моделях ДДП, в том числе и низкотемпературных, так и в нашем способе одинакова [7, 13].

Выводы

Содержание конечного продукта NO в хрящевой ткани коленного сустава и сыворотке крови интактных животных зависит от их возраста: увеличивается у старых животных, что свидетельствует о накоплении гликозилированных продуктов коллагена, угнетении посредством NO протеогликанов матрикса, приводящих к нарушению механических свойств хрящевой ткани.

При низкотемпературном моделировании деструктивно-дистрофического процесса хрящевой ткани коленного сустава у опытных животных содержание конечного продукта NO в хрящевой ткани и сыворотке крови увеличивалось в 4 раза по сравнению с таковым у интактных. В хрящевой ткани экспериментальных животных исследуемый показатель практически не изменялся в течение 7 суток, тогда как в сыворотке крови он увеличивался, что свидетельствует о развитии деструктивно-дистрофического процесса в хрящевой ткани. Этот процесс, вызванный криповреждением хрящевой ткани, очевидно, индуцирован действием ряда провоспалительных агентов, модулирующих воспалительные реакции стимуляцией синтеза индуцибельной NO-синтазы, что приводит к генерации большого количества NO.

Авторы выражают благодарность за помощь при выполнении методической части работы канд. биол. наук Карпенко Н.А. и аспиранту Величко Н.Ф. (Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины).

Литература

1. Тарасенко В.И. Криовоздействие при артропластике тазобедренного сустава: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1989.— 18 с.
2. Череповский А.В., Никулин С.В., Дубиков А.И. и др. Роль оксида азота в патогенезе остеоартроза: современные представления // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.— 2005.— №1.— С. 3–7.

oxide anion, leading to the formation of peroxynitrite, participating in inactivation of aconitases, inhibition of cell respiration, initiation of lipid peroxidation, suppression of mitochondrial functions [11]. Chemical reactions involving peroxynitrite may cause cell mutation and apoptosis [11].

The role of NO in degradation of cartilage tissue has not been completely studied yet. However, all the types of cartilage tissue after stimulation with pro-inflammatory agents synthesize an increased amount of NO, that in its turn create the conditions for the formation of its metabolism toxic products. Chondrocytes as activated cytokines produce nearly the very big amount of NO if compared with other cell types [12]. Therefore the examining of NO final product can be one of additional criteria to estimate DDP in cartilage tissue at early stages. In addition, existing experimental models of DDP and criteria of their assessment are labor-intensive and do not reflect completely the course of pathological process in cartilage tissue. Low temperature method of modeling DDP in knee joint does not require traditional surgery, is less traumatic, allowing to reduce the risk of complications if compared with the known ways. In addition it excludes possible cryodamage of para-articular tissues. However, the dynamics of changes in the level of nitric oxide in cartilage tissue both in different models of DDP, including low temperature ones, and in our modification is similar one [7, 13].

Conclusions

Content of NO final product in cartilage tissue of knee joint and blood serum of intact animals is age-dependent: it rises in aged animals, that testifies to an accumulation of glycosylated collagen products, suppression of matrix proteoglycans by NO, leading to the impairment of mechanical properties of a tissue.

At low temperature simulation of DDP of knee joint cartilage tissue in experimental animals the content of NO final product in cartilage tissue and blood serum increased 4 times if compared with that in intact ones. In cartilage tissue of experimental animals the studied index was not practically changed for 7 days, whilst in blood serum it increased, testifying to the development of DDP in cartilage tissue. This process caused by a damage of cartilage tissue was likely induced by the effect of some pro-inflammatory agents, modulating inflammatory responses by stimulation of the synthesis of inducible NO-synthase, which leads to generation of a big amount of NO.

The authors acknowledge Dr. N.A. Karpenko and PhD student N.F. Velichko (V.Ya. Danilevsky Institute for Problems of Endocrine Pathology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine) for their help in performing the methodical part of the research.

3. Шило А.В., Ломако В.В., Бондарь Т.Н., Бабийчук Г.А. Конечные продукты метаболизма оксида азота при искусственном гипометаболизме у крыс и хомяков // Проблемы криобиологии.– 2005.– №1.– С. 3–11.
4. Пат. 56629 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання деструктивно-дистрофічного процесу в колінному суглобі / Б.П. Введенський, С.Є. Гальченко, Г.О. Ковальов та ін.– Заявлено 07.06.2010, опубл. 25.01.2011.– Бюл. №2.
5. Пат. 31600 Україна, МПК G01N 33/52. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині / А.В. Куцюруба, Т.В. Симикопна, О.П. Вікторов та ін.– Заявлено 30.09.98, опубл. 15.12.2000.– Бюл. №7.
6. Пат. 42133 Україна, МПК G09B 23/00. Спосіб моделювання механічного міжвиросткового дефекту суглобного хряща / О.К. Гулевський, Г.В. Іванов, Є.Г. Іванов.– Заявлено 19.01.2009, опубл. 25.06.2009.– Бюл. №12.
7. Abramson S.B. Osteoarthritis and nitric oxide // Osteoarthritis Cartilage.– 2008.– N2.– P. 15–20.
8. Cillero–Pastor B., Martin M.A., Arenas J. et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells // BMC Musculoskelet. Disord.– 2011.– Vol. 8, N12.– P. 42.
9. Feilisch M. The chemical biology of nitric oxide – an outsider's reflections about its role in osteoarthritis // Osteoarthritis Cartilage.– 2008.– N2.– P. 3–13.
10. Nakagawa S., Arai Y., Mazda O. et al. N-acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis // J. Orthop. Res.– 2010.– Vol. 28, N2.– P.156–163.
11. Peng H., Zhou J.L., Liu S.Q. et al. Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes *in vitro* // Inflamm. Res.– 2010.– Vol. 59, N7.– P. 519–530.
12. Scher J.U., Pillinger M.H., Abramson S.B. Nitric oxide synthases and osteoarthritis // Curr. Rheumatol. Rep.– 2007.– Vol. 9, N 1.– P. 9–15.
13. Vuolteenaho K., Moilanen T., Knowles R.G., Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis // Scand. J. Rheumatol.– 2007.– Vol. 36, N4.– P. 247–258.

Поступила 27.09.2011
Рецензент А.В. Шило

References

1. Tarasenko V.I. Cryoeffect at arthroplastics of hip joint: Author's Abstract of Candidate of Medical Sciences Degree.– Kharkov.– 1989.– 18 p.
2. Cherepovskiy A.V., Nikulin S.V., Dubikov et al. Role of nitrogen oxide in pathogenesis of osteoarthritis: current notions // Voprosy Biologicheskoy, Meditsynskoy i Farmatsevticheskoy Khimii.– 2005.– N1.– P. 3–7.
3. Shilo A.V., Lomako V.V., Bondar T.N., Babiychyk G.A. Final products of nitrogen oxide metabolism at artificial hypometabolism in rats and hamsters // Problems of Cryobiology.– 2005.– N1.– P. 3–11.
4. Patent 56629 Ukraine, IPC G09B 23/28 Method for modeling destructive and degenerative process in knee joint/ B.P. Vvedensky, S.Ye. Galchenko, G.O. Kovalyov et al.– Applied 07.06.2010. Publ. 25.01/2011. Bul. N2.
5. Patent 31600 Ukraine IPC 33/52 Method of quantitative examination of nitrite-anion in biological liquid/ A.V. Kutsyuryuba, T.V. Simikopna, O.P. Viktorov et al.– Applied 30.09.98. Publ. 15.12.2000. Bul.N7.
6. Patent 42133 Ukraine, IPC G09B 23/00. Method for modeling mechanical intercondylic defect of joint cartilage/ O.K. Gulevskiy, G.V. Ivanov, Ye.G. Ivanov.– Applied 19.01.2009. Publ. 25.06.2009. Bul. N12.
7. Abramson S.B. Osteoarthritis and nitric oxide // Osteoarthritis Cartilage.– 2008.– N2.– P. 15–20.
8. Cillero–Pastor B., Martin M.A., Arenas J. et al. Effect of nitric oxide on mitochondrial activity of human synovial cells // BMC Musculoskelet. Disord.– 2011.– Vol. 8, N12.– P. 42
9. Feilisch M. The chemical biology of nitric oxide – an outsider's reflections about its role in osteoarthritis // Osteoarthritis Cartilage.– 2008.– N2.– P. 3–13.
10. Nakagawa S., Arai Y., Mazda O. et al. N-acetylcysteine prevents nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in an experimental model of osteoarthritis // J. Orthop. Res.– 2010.– Vol. 28, N2.– P.156–163
11. Peng H., Zhou J.L., Liu S.Q. et al. Hyaluronic acid inhibits nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes *in vitro* // Inflamm. Res.– 2010.– Vol. 59, N7.– P. 519–530
12. Scher J.U., Pillinger M.H., Abramson S.B. Nitric oxide synthases and osteoarthritis // Curr. Rheumatol. Rep.– 2007.– Vol. 9, N 1.– P. 9–15
13. Vuolteenaho K., Moilanen T., Knowles R.G., Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis // Scand. J. Rheumatol.– 2007.– Vol. 36, N4.– P. 247–258

Accepted 27.09.2011