

УДК 616.72-008.811.9:576.376:616.72-002.77

А. И. Дубиков

Городская клиническая больница № 2 (г. Владивосток)

АПОПТОЗ КЛЕТОК СИНОВИАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ*Ключевые слова: ревматоидный артрит, синовиоциты, апоптоз.*

Исследовали образцы крови, синовиальной оболочки и синовиальной жидкости у 78 больных ревматоидным артритом. Интенсивность апоптоза изучали методом TUNEL (terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick end-labeling), основанном на выявлении фрагментированных цепочек ДНК. Интенсивность программированной клеточной смерти клеток синовиальной оболочки зависела от баланса анти- и проапоптотических молекул на морфологическом (Bcl-2 и p53) и гуморальном (sFas) уровнях. Полученные результаты указывают на низкую интенсивность апоптоза на ранней стадии и значительную его активизацию на поздних стадиях ревматоидного артрита. По мере прогрессирования заболевания морфологический профиль апоптотических структур смешался в сторону фибробластов стромального слоя гипертрофированной синовиальной оболочки.

Введение. За последние 50 лет концепция патогенеза ревматоидного артрита претерпела значительную эволюцию. Это связано с накоплением знаний о так называемых «малых молекулах», участвующих в передаче внутриклеточных сигналов и регуляции различных феноменов, в том числе апоптоза — программированной клеточной смерти. Ранние стадии ревматоидного артрита (РА) характеризуются такими морфологическими изменениями, как гиперплазия синовиальной оболочки, неангиогенез и инфильтрация ее клетками мононуклеарного ряда [2]. Существенный вклад в эти процессы вносят макрофаго-подобные и фибробласто-подобные синовиоциты. Последние характеризуются наличием пренеопластических свойств, высоким инвазивным потенциалом и экспрессией протоонкогенов [7]. Морфогенез поздней стадии РА отличается снижением интенсивности пролиферативных процессов и частым развитием склероза [2]. Одним из объяснений пролиферации ревматоидной синовии является нарушение баланса между интенсивностью клеточной пролиферации и апоптозом. В связи с этим исследование механизмов активации и подавления апоптоза кажется перспективным для разработки нового терапевтического подхода [6].

Целью настоящего исследования явилось определение активности про- и антиапоптотических молекул на ранней и поздней стадиях РА.

Материал и методы. В исследование были включены 78 больных РА (70 женщин и 8 мужчин), средний возраст — $42,34 \pm 1,49$ года. Диагноз РА во всех случаях соответствовал критериям Американской ревматологической ассоциации [3]. У всех больных был «классический» серопозитивный РА, течение которого отличалось стойкой активностью, несмот-

ря на применение нестероидных противовоспалительных препаратов, и отсутствием спонтанных и лекарственно индуцированных ремиссий. Пациенты отбирались по мере поступления в стационар после клинического, лабораторного и инструментального обследования. В этот период проводилась симптоматическая терапия только нестероидными противовоспалительными препаратами. Больных условно разделили на две группы: с ранним (длительность от 2 месяцев до 3 лет) и поздним (длительность более 3 лет) РА, 35 и 43 человека соответственно. С помощью гистохимического, иммуноцитохимического и общеморфологического методов исследовали образцы синовиальной оболочки и синовиальной жидкости, а также сыворотки крови. Материал из суставов забирали во время артроскопии и синовкапсулэктомии, проведенных согласно показаниям (непрерывно рецидивирующий синовит коленного сустава в течение не менее 2 месяцев). Информационное согласие было получено от всех пациентов. В качестве контроля использовались образцы синовиальной оболочки и хряща 7 здоровых мужчин в возрасте от 21 до 50 лет, погибших от комбинированной травмы (забор материала производился в течение не более 2 часов после смерти). Синовиальная жидкость для контроля взята у 10 пациентов (4 мужчины и 6 женщин в возрасте от 25 до 55 лет) во время эксплоративной артротомии коленного сустава по поводу предполагавшегося повреждения менисков. Образцы сыворотки крови и синовиальной жидкости немедленно после забора замораживались при температуре -70°C . Изучение апоптоза проводилось иммуноцитохимическим методом TUNEL (terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick end-labeling), основанного на выявлении фрагментированных цепочек ДНК. Для выявления TUNEL-окрашенных структур использовали набор реактивов ApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon). Количественную оценку TUNEL-позитивных ядер проводили с помощью окуляр-морфометрической сетки на участках ткани хряща и синовии размерами 100×100 мкм. Апоптотический индекс (АИ) определяли как отношение общего числа TUNEL-позитивных ядер (N_{TUNEL}) к количеству клеток, окрашенных толуидиновым синим и имеющих видимое непикнотизированное ядро (N_{T}) по формуле: $\text{АИ} = (N_{\text{TUNEL}} \times 100) / N_{\text{T}}$. На образцах синовиальной оболочки коленного сустава человека изучали локализацию генов Bcl-2 и p-53. Срезы толщиной 20 мкм помещали в фосфатный буфер. Иммуноцитохимическое окрашивание срезов включало

Таблица 1

АИ клеток хряща и синовиальной оболочки коленного сустава человека при РА ($x \pm s$)

Клетки	Контроль	Ранний РА	Поздний РА
Хондробласты	-	0,07±0,05	0,40±0,09 ¹
Хондроциты	-	-	0,01±0,03
Синовиальные лимфоциты	-	-	0,03±0,01
Синовиоциты	-	2,10±0,50	5,80±0,20 ¹

¹ Разница с ранним РА статистически значима.

Таблица 2

Относительное содержание и распределение p53-иммунореактивных клеток в синовиальной оболочке на разных стадиях РА, %

Клетки	Контроль	Ранний РА	Поздний РА
Лимфоциты	-	2,7±0,5	5,1±0,3 ¹
Синовиоциты	-	4,8±1,5	12,3±0,5 ¹

¹ Статистическая достоверность различий с ранним РА.

несколько последовательных этапов: преинкубация, обработка в растворе первичных антител, обработка вторичными антителами и постановка иммунопероксидазной реакции с использованием реагентов ImmunoCruz Staining System (Santa Cruz). Количественное определение растворимого Fas-рецептора в исследуемых сыворотках крови и пробах синовиальной жидкости проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора Bender Med Systems. Статистическая обработка полученных данных выполнялась с помощью пакета программ «Статистика 6» для Windows с использованием приложения Biostat.

Результаты исследования. Интенсивная флюоресценция ядер апоптотических клеток, окрашенных с помощью метода TUNEL, обнаруживалась как на ранних, так и на поздних стадиях РА. Отличие заключается в количестве маркированных клеток. В контрольной группе у практически здоровых людей реакция клеток с TUNEL отсутствовала.

Ядра синовиоцитов, окрашенные с помощью реагентов TUNEL, выглядели как флюоресцирующие точки (апоптотические тельца), которые, сливаясь, образовывали кольца, полукольца, а также сплошные однородные конгломераты. Они локализовались на месте презумтивного ядра, были равномерно распределены по цитоплазме, смещались к цитоплазматической мембране либо группировались у одного из полюсов клеточной сомы. На ранней стадии воспаления TUNEL-позитивные клетки концентрировались главным образом в периваскулярных пространствах, где их локализация совпадала с расположением воспалительных инфильтратов. Среди них на срезах, окрашенных толуидино-

вым синим, идентифицировались лимфоциты. При этом стенки микрососудов с TUNEL не реагировали. В покровном слое синовиальной оболочки отмечалась флюоресценция фрагментированных ядер единичных синовиоцитов, которые иногда формировали скопления, или кластеры.

Полученные результаты указывают на низкую интенсивность апоптоза на ранних стадиях РА (табл. 1). Распространенность апоптоза коррелировала с длительностью и выраженностью воспалительной инфильтрации синовиальной оболочки. На поздней стадии РА выявлена значительная активизация апоптоза. Морфологический профиль апоптотических структур здесь смещался в сторону фибробластов стромального слоя гипертрофированной синовиальной оболочки. В периваскулярных инфильтратах также отмечалась повышенная плотность TUNEL-позитивных клеток, однако локализовались они чаще в субпокровном слое синовию.

Обращал на себя внимание высокий АИ хондробластов. Они локализовались преимущественно в поверхностной зоне хряща, объединялись в изогенные группы, каждая из которых содержала от 1 до 3 клеток. В глубине хряща, где активность пролиферативных процессов существенно ниже, TUNEL маркировал единичные ядра хондроцитов.

По нашим наблюдениям, локализация молекул p53 и Bcl-2 в синовиальной оболочке человека не совпала и зависела от стадии патологического процесса.

При раннем РА p53 выявлялся в единичных скоплениях синовиоцитов покровного слоя. Они имели округлую или овальную форму и, по всей видимости, принадлежали к популяции пришлых клеток или синовиоцитов типа А. Однако в позднем периоде РА p53-иммунореактивные клетки становились многочисленнее, большая их часть выявлялась в стромальном слое синовию (табл. 2).

Картина распределения Bcl-2-иммунореактивных синовиоцитов имела противоположную тенденцию. Их абсолютное большинство выявлялось на ранней стадии РА, где они обнаруживаются практически повсеместно. Однако по мере хронизации воспаления количество маркируемых клеток снижалось (табл. 3).

Местом преимущественной локализации молекулы Bcl-2, по нашим данным, являлись лимфоцитарные инфильтраты, поверхностный слой синовиальной

Таблица 3

Экспрессия Bcl-2 и s-Fas в структурах синовиальной оболочки, жидкости и сыворотке крови человека при РА, %

Элементы	Контроль	Ранний РА	Поздний РА
Лимфоциты	-	7,6±1,1	0,8±0,1 ²
Синовиоциты	1,2±0,1	10,4±0,5 ¹	1,1±0,2 ²
s-Fas-sin	210,42±55,90	2665,21±262,27 ¹	1381,00±16,52 ^{1,2}

¹ Разница статистически значима по сравнению с контролем.

² Разница между группами статистически значима.

оболочки, гладкомышечные клетки синовиальных сосудов. На поздней стадии характер локализации не изменялся, однако интенсивность значительно снижалась.

Было проведено сопоставление экспрессии молекулярных посредников апоптоза на морфологическом и гуморальном уровнях. Исследование концентрации sFas-рецептора, препятствующего активизации Fas-зависимого пути апоптоза через связывание лиганда Fas в системном кровотоке и синовиальной жидкости, позволило установить следующую динамику: в группе «позднего» РА концентрация в синовиальной жидкости была достоверно ниже (s-Fas-sin) в сравнении с группой «раннего» РА (табл. 3). Содержание sFas в синовиальной жидкости неуклонно снижалось от «раннего» РА к «позднему».

Обсуждение полученных данных. Нарушения механизмов индукции апоптоза, ведущие к его угнетению или, наоборот, к излишней активации, могут быть важным звеном в патогенезе РА. Согласно полученным результатам можно говорить о различной интенсивности апоптоза клеточных структур синовиальной оболочки у больных РА на ранней и поздней стадиях: низкая апоптотическая активность синовиальной оболочки у больных с «ранним» и высокая у больных с «поздним» РА. Есть все основания полагать, что процессы регуляции апоптоза лежат в основе прогрессии ревматоидного синовита и на клиническом уровне это означает различную терапевтическую стратегию в зависимости от стадии течения патологического процесса [15].

Патологическая реорганизация синовиальной оболочки человека при РА протекает одновременно с уменьшением плотности хондробластов, которые подвергаются апоптозу в условиях длительного ревматоидного воспаления. Не исключено, что эти эффекты, инициированные предшествующим синовитом, способны ограничивать рост и регенерацию хряща, оставляя свой деструктивный след в виде вторичного остеоартроза.

Морфотипическая гетерогенность TUNEL-реактивных клеток детерминирована различным механизмом их программированной гибели. В этой связи предполагается наличие альтернативных путей, запускающих апоптоз [8]. Один из них, митохондриальный, индуцируется выработкой транскрипторного фактора p53, дефект которого ведет к опухолеподобной пролиферации синовиоцитов [9]. Другой механизм апоптоза развивается в лимфоцитах и блокируется фактором Bcl-2 [15].

Обнаружен закономерный стереотип экспрессии Bcl-2 в синовиальной ткани в зависимости от стадии РА: от гиперэкспрессии на ранней стадии до гипоекспрессии на поздней. Можно полагать, что экспрессия Bcl-2 на ранней стадии болезни лимитирует количество апоптотических клеток, создает благоприятный фон для пролиферации, выживания и активного функционирования соответствующих

воспалительных элементов. Приведем наблюдения, подтверждающие наши результаты: высокий уровень экспрессии Bcl-2 в гладкомышечных клетках сосудов синовиальной оболочки, полученной от больных РА [13], более высокая концентрация и РНК Bcl-2 в синовиальной ткани больных РА в сравнении с больными остеоартрозом [10].

Поскольку основной мишенью Bcl-2 семейства является митохондрия, то можно предполагать заинтересованность преимущественно митохондриального пути апоптоза при РА. В митохондриальном апоптозе молекула p53 играет важную роль в изменении стабильности мембраны данной ультраструктуры и непосредственно в запуске запрограммированной клеточной смерти [14]. В мембране митохондрий был обнаружен белок (p53AIP1), опосредующий p53-зависимый путь апоптоза [11].

При анализе взаимоотношения p53 и Bcl-2 выявлена определенная закономерность. Согласно собственным данным, при интенсивной экспрессии Bcl-2 на ранней стадии РА и в острой фазе адьювантного артрита отмечается низкая экспрессия проапоптотической молекулы p53 и, соответственно, низкий апоптотический индекс [1]. Напротив, на поздней стадии РА и в хронической фазе адьювантного артрита резко возрастала экспрессия p53 и критически снижалась экспрессия Bcl-2, что сопровождалось интенсивным апоптозом клеточных элементов суставной среды.

Некоторые авторы ранее высказывались в пользу способности p53 репрессировать ген-промоутер Bcl-2 [12] и способности Bcl-2 в свою очередь супрессировать проапоптотическую функцию p53 [15]. Следовательно, в процессе эволюции РА «работает» молекулярный реостат Bcl-2/p53, который может в значительной мере определять апоптотическую активность клеток синовиальной среды сустава.

Экспрессия молекулы Bcl-2 исследовалась при многих заболеваниях, но практически ничего не известно о ее клиническом значении при РА. Высокий уровень экспрессии Bcl-2 ассоциирован с плохим прогнозом при карциноме мочевого пузыря, болезни Ходжкина, раке предстательной железы [4]. Кроме того, коэффициент Bcl-2/Bax показал хорошие прогностические характеристики при химиотерапии острого миелолейкоза и рака желудка [5]. Согласно собственным данным, повышенная экспрессия Bcl-2 молекулы коррелировала с числом воспаленных суставов ($r=0,67$, $p<0,05$) и функциональным классом больных РА ($r=0,71$, $p<0,05$). Это позволяет говорить о прогностической ценности антиапоптотического маркера и одновременно о новой мишени терапевтических воздействий.

Стереотип изменения концентрации s-Fas, антиапоптотического фактора, соответствовал направленности изменений экспрессии молекул p53 и Bcl-2 и интенсивности апоптоза. С увеличением АИ на поздней стадии РА снижался уровень s-Fas в синовиальной

жидкости. При отмеченных связях s-Fas со степенью активности ($r=0,62$, $p<0,05$) и функциональным классом больных РА ($r=0,83$, $p<0,05$), а также АИ ($r=-0,74$, $p<0,05$) s-Fas может быть использован как интегративный показатель напряженности и характера происходящих в синовиальной оболочке процессов программированной клеточной смерти.

Литература

1. Дубиков АМ. Ревматоидный артрит, апоптоз, оксид азота: новые аспекты патогенеза. — Владивосток : Изд-во Дальневост. ун-та, 2004.
2. Насонова В.А., Бунчук Н.В. Ревматические болезни. — М.: Медицина, 1997.
3. Arnett F.C., Edworthy S.M., Bloch D.A. et al. // *Arthritis Rheum.* - 1988. - Vol. 31. - P. 315-324.
4. Atug F., Turkeri L., Ozyurek M., Akdas A. // *Intern. Urology & Nephrology.* - 1998. - Vol. 30, No. 4. - P. 455-461.
5. Bincoletto C., Saad S.T., da Silva E.S., Queiroz M.L. // *Europ. J. Hematology.* - 1999. - Vol. 62, No. 1. - P. 38-42.
6. Catrina A.I., Ulfgren A.K., Lindblad S. et al. // *Annals of the Rheum. Diseases.* - 2002. - Vol. 61, No. 10. - P. 934-936.
7. Firestein G.S. // *Arthritis Rheum.* - 1996. - Vol. 39, No. 11. - P. 1781-1790.
8. Firestein G.S., Yeo M., Zvaifler N.J. // *J. Clin. Investigation.* - 1995. - Vol. 96, No. 3. - P. 1631-1638.
9. Itoh K., Hase H., Kojima H. et al. // *Rheum.* - 2004. - Vol. 43, No. 3. - P. 277-285.

10. Liang H. Y., Jiang M., Chen H. M., Wang Y. C. // *British J. Rheum.* - 1996. - Vol. 35, No. 8. - P. 803-804.
11. Matsuda K., Yoshida K., Taya Y. et al. // *Cancer Research.* - 2002. - Vol. 62, No. 10. - P. 2883-2889.
12. Miyashita T., Harigai M., Hanada M., Reed J. C. // *Cancer Research.* - 1994. - Vol. 54, No. 12. - P. 3131-3135.
13. Perlman H., Georganas C., Pagliari L. G. et al. // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 164. - P. 5227-5235.
14. Rich T., Allen R. L., Wyllie A. H. // *Nature.* - 2000. - Vol. 407(6805). - P. 777-783.
15. Smith M. D., Walker J. G. // *Rheum.* - 2004. - Vol. 43, No. 4. - P. 405-407.

Поступила в редакцию 14.07.2008.

APOPTOSIS OF THE SYNOVIAL CELLS AT PATIENTS WITH THE RHEUMATOID ARTHRITIS

A.I. Dubikov

City Hospital No. 2 (Vladivostok)

Summary — The samples of blood, synovia and synovial liquid at 78 patients with rheumatoid arthritis were investigated. Intensity of the apoptosis studied by TUNEL method (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), based on revealing of the fragmented DNA chains. Intensity of programmed cellular death of synovial cells depend on balance of anti- and pro-apoptotic molecules on morphological (Bcl2 and p53) and humoral (sFas) levels. The received results specify low apoptosis intensity at early stage and its significant activation at late stages rheumatoid arthritis. In process of disease progressing the morphological structure of the apoptotic structures was changed to fibroblasts of stromal layer of the hypertrophied synovia.

Keywords: rheumatoid arthritis, synoviocytes, apoptosis.

Pacific Medical Journal, 2008, No. 4, p. 20-23.

УДК 616.71-001.5-089.84-053.9

Е.П. Костив¹, П.Е. Костив², В.В. Аксенов², А.А. Морозов², И.В. Назаренко²

¹ Владивостокский государственный медицинский университет, ² Городская клиническая больница № 2 (г. Владивосток)

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНТРАМЕДУЛЛЯРНОГО ОСТЕОСИНТЕЗА В ЛЕЧЕНИИ ПЕРЕЛОМОВ ПРОКСИМАЛЬНОГО ОТДЕЛА БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Ключевые слова: переломы бедра вертельной локализации, остеопороз, проксимальный бедренный стержень.

Проанализированы результаты хирургического лечения 29 больных с переломами бедренной кости вертельной локализации с использованием интрамедуллярного проксимального бедренного стержня «Остеомед» за 2006—2008 гг. Среди пациентов преобладали лица пожилого и старческого возраста (75,9%), у которых переломы развились на фоне остеопороза. Оперативное вмешательство в 86,2% случаев проводилось малоинвазивным способом. Клиническое обследование и рентгенография выполнены через 1, 3, 6, 12 месяцев после операции. Отслежены отдаленные результаты у 19 человек: во всех случаях отмечено сращение переломов и восстановление двигательной активности в срок до 3 месяцев после операции.

Введение. Актуальность проблемы хирургического лечения переломов проксимальной части бедра обусловлена увеличением их частоты из-за роста в попу-

ляции численности лиц пожилого и старческого возраста, неудовлетворительными результатами лечения и материальными затратами. О медицинской и социальной значимости этой проблемы свидетельствует тот факт, что в США ежегодно в травматологические центры поступают до 250000 пациентов с переломами вертельной локализации; прогнозируется, что к 2050 г. эта цифра вырастет как минимум в 2 раза [6, 9]. В средней полосе Российской Федерации частота данных переломов на фоне остеопороза составляет среди мужчин 67,9 и среди женщин 104,5 на 10000 населения [3].

Современные взгляды на проблему лечения переломов проксимального отдела бедра предусматривают преимущественно оперативную фиксацию, позволяющую раньше активизировать пациента. Чаше