

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО НАРОДНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ

ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ имени ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

9 89-5
2072-9

На правах рукописи

ПАНАСЮК Андрей Федорович

УДК: 616.72—002.77—07:616.5—008.939.6—074

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА ФИБРОБЛАСТОВ
ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ

(14.00.16 — патологическая физиология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва — 1989

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте ревматологии АМН СССР.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Н. К. Хитров**,
доктор медицинских наук, профессор **В. С. Репин**,
доктор биологических наук, профессор **А. В. Зеленин**.

Ведущая организация — Центральный научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови.

Защита диссертации состоится « » 1989 г.
в часов на заседании специализированного совета
Д 053.22.01 при Университете дружбы народов им. П. Лумумбы (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Университета дружбы народов им. П. Лумумбы (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6).

Автореферат разослан « » 1989 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Г. А. ДРОЗДОВА

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ГОСУДАРСТВЕННАЯ
БИБЛИОТЕКА
СССР
им. В. И. Ленина
1989 г.

Актуальность проблемы. Изучение закономерностей и механизмов развития фиброза привлекает внимание широких кругов биологов и медиков ввиду большой теоретической и практической важности этой проблемы. Системная склеродермия /ССД/ - заболевание с неизвестной этиологией и мало изученным патогенезом, является природной моделью прогрессирующего фиброза. Оно характеризуется избыточным накоплением коллагена, обуславливающим развитие так называемого первичного генерализованного фиброза. Вопрос о природе повышенной метаболической активности фибробластов остается нерешенным. В основе изменений обмена соединительной ткани /СТ/ могут лежать либо воздействия эндо- и экзогенных факторов, либо генетические нарушения. Для ССД эта проблема не решена и остается одной из основных для понимания патогенеза данного тяжелого заболевания.

Выяснение на клеточном уровне фенотипических особенностей фибробластов, таких как продукция основных компонентов СТ, является необходимым для утверждения генетической концепции этиопатогенеза ССД. Метод монослойного культивирования фибробластов открывает широкие возможности для подобных исследований. Его существенным достоинством является то, что показатели обмена клеток могут быть изучены в отсутствии влияния на них других категорий клеток и/или нейро-гуморальных факторов регуляции.

К настоящему времени обменные характеристики фибробластов изучены при ССД недостаточно, хотя исследования этих клеток на органном и клеточном уровнях проводились неоднократно /LeRoy, 1972; Fleischmajer и соавт., 1975-1987; Buckingham и соавт., 1978, 1983; Д.А.Лебедев, 1978; В.А.Владимирцев, и соавт., 1981/. В научной литературе практически отсутствуют данные о молекулярных основах патогенеза ССД. Исследования последних лет показали, что контроль синтеза коллагена при ССД изменен уже на уровне транскрипции ДНК /Staves и соавт., 1983; Rosenbloom и соавт., 1986/, тем не менее причина, лежащая в основе нарушения регуляции обмена фибробластов и коллагена, в частности, остается неизвестной.

У больных ССД описаны факты, косвенно указывающие на нарушения гормональной регуляции СТ и сосудистой системы /Э.С.Мач 1976; Fleischmajer, 1964; Winkelman, 1977; Jayson, 1984/.

Исследование влияния адреналина на транспорт кальция в фибробластах больных ССД /М.Д.Гроздова и соавт., 1978/ свидетельствует о нарушении функции мембран. Однако, в литературе отсутствуют данные об обмене циклических нуклеотидов /ЦН/ и о регуляции их уровня со стороны катехоламинов в склеродермических фибробластах. Очевидно, что без знаний о состоянии системы вторичных мессенджеров нельзя подойти к решению многих вопросов о фенотипическом статусе патологической клетки.

Синтезируемые фибробластами компоненты СТ после выхода из клеток претерпевают сложные химические и конформационные изменения на всех уровнях структурной организации. Большинство из этих изменений генетически "запрограммировано" и детерминировано молекулярной структурой компонентов СТ /В.В.Серов и Шехтер А.Б., 1981/. Следовательно, необходимость изучения структуры и функциональных свойств межклеточного матрикса при ССД диктуется тем, что при патологии свойства матрикса могут меняться и по механизму обратной связи приводить к развитию фиброза и хронизации процессов возбуждения СТ.

Исследование молекулярных основ патогенеза ССД связано с одновременным изучением механизмов действия лекарственных препаратов, направленно влияющих на нарушения обмена.

В последнее десятилетие для лечения ССД и ревматоидного артрита в качестве базисного средства применяют Д-пеницилламин /ДПА/- производное бензилпенициллина. Большинство механизмов действия ДПА на клеточном и молекулярном уровнях остаются не раскрытыми, что является определенным недостатком в разработке подходов к схемам лечения и дозировке препарата.

О применении препаратов, оказывающих влияние на обмен ЦН и кальция, имеются лишь единичные указания об их положительном терапевтическом эффекте на ряд клинических показателей при лечении ССД и других ревматических заболеваний /Sovenim-Soker и соавт., 1985; А.Б.Щербakov, 1987/. Именно отсутствие знаний о молекулярных механизмах патологического процесса при ССД является существенным препятствием для назначения таких лекарств больным.

Таким образом, исследование специфики нарушений обмена фибробластов при ССД, механизмов, обуславливающих развитие фиброза и хронизации процесса, представлялось наиболее актуальным направлением в изучении патофизиологии этого тяжелого заболе-

вания и СТ в целом.

Цель исследования. Изучить особенности обмена фибробластов кожи, межклеточного матрикса и роста СТ, приводящих к развитию фиброза при ССД; исследовать механизмы регуляции биосинтетической активности фибробластов при ССД и разработать подходы к направленной коррекции повышенной продукции коллагеновых белков.

В соответствии с этим решались следующие задачи:

1. Изучить культуры фибробластов кожи больных ССД как возможную модель для исследования механизмов патогенеза ССД; определить общие физиологические показатели жизнедеятельности фибробластов здоровых доноров /ЗД/ и больных ССД.

2. Выяснить особенности биосинтеза основных компонентов СТ /коллагеновых белков, гликопротеинов, протеогликанов/ фибробластами в культурах кожи больных ССД с различной степенью её поражения; оценить динамику продукции компонентов СТ.

3. Охарактеризовать обмен фибронектина /ФН/ в культурах склеродермических фибробластов - продукцию, накопление в клеточном слое и возможности регуляции им биосинтеза коллагена.

4. В фибробластах больных ССД определить базальный уровень внутриклеточного аденозинмонофосфата циклического /цАМФ/ и циклического гуанозинмонофосфата /цГМФ/, изучить влияние адреналина на концентрацию цАМФ в клетке, исследовать роль цАМФ в активации клеток при ССД и в регуляции биосинтеза коллагена.

5. Исследовать белковую структуру межклеточного матрикса в монослойных культурах фибробластов кожи ЗД и больных ССД.

6. Изучить некоторые механизмы действия Д-пеницилламина, теофиллина и верапамила на рост и метаболическую активность фибробластов в условиях *in vitro*.

Новизна полученных результатов. В работе впервые проведено систематическое исследование продукции основных компонентов СТ в культурах фибробластов кожи больных ССД. Определены ранее спорные параметры продукции коллагеновых белков, гликопротеинов и протеогликанов, впервые убедительно доказано, что эти показатели являются стабильными факторами патогенеза ССД. Одновременное определение данных характеристик обмена позволило выявить существенную диспропорцию в их продукции.

Продемонстрировано, что свойство склеродермических фибробластов к повышенной синтетической активности сохраняется в

ряду клеточных поколений и доказано, что эти клетки имеют особенности обмена, которые выявляются на начальных стадиях заболевания. Утверждение о фенотипических особенностях фибробластов при ССД, как о стабильном факторе патогенеза, доказывается и равнозначной встречаемостью повышенной метаболической активности клеток при различных вариантах течения болезни.

В настоящей работе впервые на культурах фибробластов кожи больных ССД продемонстрировано отклонение от нормы внутриклеточных концентраций ЦН и их соотношения. Доказано, что уменьшение концентрации цАМФ в клетке является одной из причин гиперпродукции коллагена склеродермическими фибробластами. Вскрыт дефект контроля за функциональной активностью клетки при ССД со стороны общих факторов регуляции.

Впервые расшифрован один из молекулярных механизмов нарушения регуляции продукции коллагена при ССД. Найдено, что повреждение локализовано на уровне передачи сигнала от комплекса гормон-рецептор к каталитической субъединице.

В культурах фибробластов кожи больных ССД впервые изучена белковая композиция внеклеточного матрикса. Полученные результаты доказывают положение о взаимозависимости процессов синтеза и формообразования внеклеточного вещества. Увеличенный синтез компонентов СТ при ССД приводит к избыточному их отложению в межклеточном матриксе и формированию внеклеточного вещества с измененной композицией.

Впервые установлено действие ДПА на уровень цАМФ в фибробластах. Найдено, что этот препарат оказывает влияние не только на созревание коллагена, но и на другие обменные процессы в клетке — пролиферацию и синтез коллагена. Обнаружено, что лишь незначительная часть ДПА /менее, чем 0,1% / связывается с фибробластами и может определять эффект его действия.

На культурах фибробластов впервые проведена оценка влияния теофиллина и верапамила, препаратов, направленно действующих на систему ЦН и обмен кальция. Показано, что оба препарата в терапевтических дозах оказывают выраженное антипролиферативное действие, а теофиллин подавляет и продукцию коллагена. На основании этих наблюдений предложены подходы к патогенетически обоснованной терапии локального фиброзного процесса.

В результате проведенных исследований впервые предложена и частично доказана концепция о структурно-функциональных на-

рушениях клеточной мембраны фибробластов как особого патологического состояния данных клеток, при котором изменяется обмен ЦН и кальция.

Теоретическая значимость исследования. Результаты работы обосновывают положение о патогенетической значимости нарушений обмена компонентов СТ на клеточном уровне, обусловленных генетическими особенностями фибробластов больных ССД. Они позволяют рассматривать отдельные звенья пато- и морфогенеза ССД на клеточном и молекулярном уровнях, глубже понять механизмы развития фиброза.

Теоретическое значение имеют данные о состоянии системы ЦН в склеродермических фибробластах, механизмах регуляции ими обмена коллагеновых белков в этих клетках.

Разработка концепции о структурно-функциональных перестройках клеточной мембраны фибробластов, как одной из ведущих причин патофизиологии ССД позволило расшифровать некоторые молекулярные механизмы патогенеза ССД и определить тактику терапевтической коррекции.

Практическая ценность исследования. Многолетний опыт изучения культур фибробластов кожи ЭД и больных ССД позволил доказать возможность применения этого метода в качестве модельной системы для изучения обмена клеток СТ и молекулярных механизмов регуляции их метаболической активности для разработки путей направленной терапевтической коррекции.

Развитие предложенной концепции патофизиологии ССД, в основе которой господствующее место занимает нарушение функции клеточной мембраны и обмена ЦН, позволило доказать, что ССД по существу представляет собой своеобразную мембранную патологию; углубить представления о механизмах патогенеза ССД; определить подходы к патогенетической терапии фиброзного процесса. Использование теofilлина и ДПА, способствующих накоплению в клетках ЦАМФ, оправдано в качестве средств, оказывающих действие на продукцию коллагеновых белков. Определение влияния терапевтических средств на пролиферацию клеток в системе *in vitro* и на концентрацию в них ЦН позволяет прогнозировать эффект действия препарата на процессы воспаления и фиброобразования.

Внедрение в практику. Полученные данные постоянно используются в практической работе лаборатории по изучению нарушений метаболизма СТ при ревматических заболеваниях Института ревма-

тологии АМН СССР, для теоретических исследований процессов фиброобразования и его регуляции, при чтении лекций в занятиях цикла усовершенствования врачей по ревматологии и учебном процессе при обучении студентов медицинских институтов.

Методы получения культур фибробластов и оценки их функциональной активности внедрены в практику работы лаборатории иммунохимии НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи АМН СССР /г.Москва/, межлабораторной группы по культуре ткани Института медицинской и биологической химии АМН СССР /г.Москва/, отдела аллотрансплантации тканей МНТК "Микрохирургия глаза" МЗ РСФСР /г.Москва/.

Материалы диссертации были экспонированы в 1983 году на ВДНХ СССР и были удостоены бронзовой медали.

По материалам работы подана I заявка на открытие и получено I авторское свидетельство на изобретение:

1. Явление агрегации антител в комплексы в момент их взаимодействия с антигеном / регистрационный номер ОТ-11369 от 12.06.86 г./.
2. Способ моделирования катаракты / А.с. № 1426578 А1 СССР, МКИ⁴ А 61 F 9/00 от 01.06.88 г./.

Внесено 2 рационализаторских предложения, на которые выданы удостоверения МНТК "Микрохирургия глаза" МЗ РСФСР: I. "Способ истощения антисывороток на культуре клеток"-№668 от 22.01.87 г. 2. "Способ выявления аутоантител против хрусталика и его капсулы"-№697 от 12.06.87 г.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации доложены на: IV Конгрессе ревматологов ЧССР /Пьештяны, 1977 /, II Всесоюзном съезде ревматологов /Москва, 1978/, IV Всесоюзном съезде биохимиков /Ленинград, 1979/, V Всесоюзной конференции по соединительной ткани /Новосибирск, 1980/, VI Европейском симпозиуме по изучению соединительной ткани /Прага, 1980/, VIII Всесоюзном совещании терапевтов /Москва, 1981/, Всесоюзной конференции по циклическим нуклеотидам /Минск, 1982/, X Европейском конгрессе ревматологов /Москва, 1983/, III Всесоюзном симпозиуме по медицинской энзимологии /Махачкала, 1986/, XVI Европейском симпозиуме по остеоартрологии /Сочи, 1987/.

По теме диссертации опубликовано 28 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 293 страницах машинописного текста, иллюстрирована 54 таблицами и 41 рисунком. Она состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и приложения, в котором пред-

ставлены материалы и методы исследования. Указатель литературы включает 688 источников, из них 87 - на русском языке.

Положения, выносимые на защиту.

1. Генетические особенности фибробластов кожи больных ССД, выражающиеся в устойчивой повышенной продукции основных компонентов СТ в системе *in vitro*, являются стабильным фактором патогенеза данного заболевания.

2. Повышенная метаболическая активность фибробластов при ССД и, в особенности, избыточная продукция коллагена сопряжена с изменением внутриклеточной концентрации ЦН, с нарушением реакции фибробластов на катехоламины, с ослаблением регуляторного влияния на синтез коллагеновых белков как ЦАМФ, так и общих факторов гомеостаза.

3. В основе развития фиброза при ССД лежат структурно-функциональные нарушения клеточных мембран фибробластов, обуславливающие определенную автономность данных клеток СТ в отношении общих факторов регуляции обмена.

4. Механизмы действия ряда препаратов, способных модулировать обмен СТ, заключаются в повышении концентрации внутриклеточного ЦАМФ и последующем подавлении пролиферации фибробластов и их коллагенсинтезирующей активности.

Материал и методы исследования. В качестве объекта исследования были выбраны культуры фибробластов кожи, полученные от 39 здоровых доноров и 70 больных ССД, находившихся на лечении в клинике Института ревматологии АМН СССР с 1975 по 1985 гг. Диагноз заболевания, оценка варианта течения, стадии развития и степени активности процесса проводились в соответствии с принятыми критериями и классификацией заболевания /Н.Г.Гусева, 1975/. Среди обследованных больных преобладали женщины /85% / в возрасте от 14 до 60 лет и длительностью заболевания от 6 месяцев до 21 года. По клинической характеристике это были больные преимущественно с умеренной активностью процесса /51% / и II стадией /65% /. Типичная картина заболевания с характерным поражением кожи наблюдалась у 62% больных.

Монослойное культивирование фибробластов проводили по общепринятой методике с собственными модификациями. При изучении кинетики клеточных популяций количество клеток в пробах оценивали с помощью прямого счета клеток на счетчике клеток "Культроникс" /Франция/.

Интенсивность синтеза ДНК, РНК и белка в фибробластах определяли по включению меченых предшественников, соответственно ^3H -тимидина, ^{14}C -уридина, ^{14}C -пролина.

Для выяснения вопроса о величине продукции коллагеновых белков выявление пептидосвязанного ^{14}C -оксипролина проводили по методу Java и Groskor /1966/ в модификации Д.А.Лебедева /1978/, а также определение количества коллагеназо-чувствительных белков - по методу Peterkofsky и Dregelmann /1971/.

Производство гликопротеинов определяли по включению ^{14}C -ацетилнейраминовой кислоты по оригинальной методике, разработанной нами совместно с И.И.Рассохиной. Содержание ФН в клетках, межклеточном матриксе и культуральной среде определяли с помощью иммуноферментного метода /ELISA / по Engvall и Pearlmann /1971/, а также метода непрямой иммунофлуоресценции по Hedman и соавт./1982/. Для получения ФН и антител к нему использовали методы препаративного выделения ФН с помощью двухступенчатой аффинной хроматографии /Vuento и Vaheri, 1978/ и иммунизации кроликов по Zardi и соавт./1981/.

Определение продукции протеогликанов осуществляли с помощью метаболического мечения фибробластов ^{14}C -глюкуроновой кислотой и ^3H -глюкозаминном по методу Buckingham и соавт./1983/.

Межклеточный матрикс получали двумя известными в настоящее время методами его выделения: с помощью дезоксихолата натрия по Hedman /1979/ и тритона X-100 по Fridman и соавт./1985/.

Концентрацию белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт./1951/, а его качественного состава с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по методу Laemmli /1970/.

Оценку количества белка в образцах электрофоретических гелей и фотоматериалах осуществляли с помощью метода отраженной денситометрии на телевизионной системе анализа изображения Tas Plus /Лейтц, ФРГ/.

Внутриклеточную концентрацию цАМФ и цГМФ определяли с помощью радиоиммунологического метода, используя стандартные наборы фирмы "Амершам" /Англия/ в соответствии с методикой Steiner и соавт./1972/.

Статистическая обработка результатов проводилась методом вариационной статистики, сравнение средних величин осуществляли с помощью параметрических и непараметрических критериев, частотных характеристик - по критерию Пирсона.

ГЛАВА I. СПЕЦИФИКА ОБМЕНА СТ ПРИ ССД.

Изучение продукции основных компонентов СТ - коллагеновых белков, гликопротеинов и протеогликанов - в культурах фибробластов кожи больных ССД показало увеличение функциональной активности патологических клеток по всем трем показателям /табл. I/.

Таблица I. Показатели продукции основных компонентов СТ в культурах фибробластов кожи / расп/мин/10⁶клеток /.

показатели	II пассаж		IV пассаж	
	6 день	12 день	6 день	12 день
<u>Коллагеновые белки</u>				
норма	7447±1228 n = 23	7636±1621 n = 16	7797±1384 n = 25	8820±1604 n = 17
ССД	19728±2284 ^x n = 46	20319±3845 ^x n = 17	16686±1824 ^x n = 34	14554±1597 ^x n = 24
<u>Гликопротеины</u>				
норма	9104±853 n = 20	8607±465 n = 17	4514±453 n = 21	4271±454 n = 17
ССД	17965±3122 ^x n = 19	17352±2730 ^x n = 16	13220±2094 ^x n = 20	14626±2261 ^x n = 18
<u>Протеогликаны</u>				
норма	17765±3621 n = 21	15977±2800 n = 16	16142±2111 n = 21	17333±2519 n = 17
ССД	23693±2285 n = 19	25718±2117 ^x n = 16	27693±3618 ^x n = 20	30715±2017 ^x n = 19

Примечание : x - p < 0,01.

На всех изученных этапах культивирования величина средней продукции коллагеновых белков в культурах ССД достоверно превышала аналогичный показатель для ЗД. На 6 день II пассажа среднее значение продукции коллагеновых белков в фибробластах ССД в 2,8 раза превышало контроль, а на 6 и 12 дни культивирования на IV пассаже данный показатель соответственно в 2,2 и 1,65 раза превышал значение в норме. Частота повышения этого показателя для культур фибробластов ССД составила более 75%.

Средняя величина продукции гликопротеинов фибробластами ССД на 6 день II пассажа составила 17965±3122 расп/мин/10⁶клеток, что в 1,97 раз превышало соответствующий показатель для нормы. Достоверное повышение продукции гликопротеинов также

прослеживалось и на IV пассаже /табл. I/. Следует отметить, что средние показатели продукции коллагеновых белков и гликопротеинов существенно не изменялись как в течение одного пассажа, так и при длительном культивировании патологических фибробластов в условиях их постоянного пассирования. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при культивировании в пределах одной фазы роста и пассажа склеродермические фибробласты сохраняют способность к стабильному синтезу коллагеновых белков и гликопротеинов.

При изучении продукции ФН, одного из основных гликопротеинов СТ, было найдено повышение его синтеза и секреции в культуральную среду фибробластами больных ССД. Увеличение продукции ФН было достоверным / $p < 0,05$ / и составляло на II пассаже $52,2 \pm 5,0$ мкг белка/мл среды после 24 часов культивирования, что в 1,6 раза превышало средний уровень нормы. Это повышение было сравнимо с тем, которое было выявлено нами с помощью тотального мечения всех вновь синтезированных гликопротеинов.

Параллельно усилению синтеза ФН при ССД наблюдалось увеличение накопления ФН в клеточном слое. При этом средние концентрации ФН на II и IV пассажах составили соответственно $25,8 \pm 5,4$ и $20,5 \pm 5,0$ мкг на 10^6 клеток против $11,7 \pm 1,9$ и $8,6 \pm 1,7$ в норме. Различия между группами культур были статистически достоверными и более чем в 2 раза превышали контроль. В данном случае мы оценивали суммарное количество ФН на поверхности фибробластов и в межклеточном матриксе.

Аналогично двум другим компонентам СТ продукция протеогликанов фибробластами ССД была повышена на всех изученных этапах культивирования. На II пассаже средние величины исследуемого показателя, хотя и превышали соответствующие значения для нормы /табл. I/ в 1,3 и 1,6 раза, но различие было достоверным только на 12 день культивирования данного пассажа. На IV пассаже в патологических клетках продукция протеогликанов нарастала, тогда как в норме практически не изменялась. Это и обуславливало достоверность различия и на 6, и на 12 дни культивирования данного пассажа.

Следовательно, в культурах фибробластов кожи больных ССД повышена общая метаболическая активности клеток, характеризующаяся увеличением продукции всех основных компонентов СТ - коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов. Важно отметить, что

выявляемая на клеточном уровне в условиях длительного культивирования повышенная биосинтетическая активность склеродермических фибробластов носит стойкий характер.

Параллельное изучение продукции коллагеновых белков и гликозаминогликанов /ГАГ/ в динамике между 7 и 10 днями культивирования продемонстрировало, что их обмен различается в штаммах фибробластов ЗД и больных ССД. В культурах фибробластов ЗД продукция коллагеновых белков снижалась к 10 дню культивирования в среднем в 1,48 раза, тогда как в культурах фибробластов ССД это снижение было менее выражено. Одновременно различие по этому показателю между группами культур ЗД и больных ССД было достоверным на 8 - 10 дни культивирования.

Аналогично этому продукция ГАГ в культурах фибробластов ЗД достоверно снижалась 2,6 раза по мере культивирования и практически не изменялась при ССД.

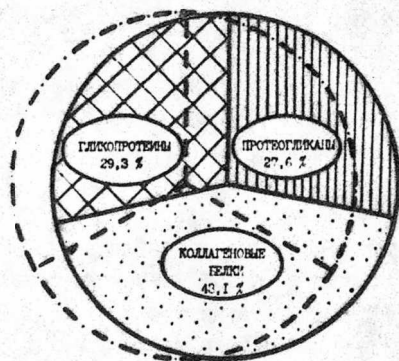


Рис. 1. Соотношение продукции основных компонентов СТ в культурах фибробластов ЗД /-.-/ и больных ССД /—/.

Особенностью обмена склеродермических фибробластов, подтверждающей утверждение о системном нарушении обмена СТ и серьезной расбалансировке его отдельных звеньев, является отличие в соотношении синтезируемых компонентов СТ. Сопоставление величин продукции коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов показывает, что абсолютная величина повышения продукции каждого отдельного компонента фибробластами кожи больных ССД на II пассаже составила 2,62 : 1,79 : 1,67, а их пропорция соответственно 1,0 : 0,68 : 0,64 /рис.1/. Из результатов видно, что

доля вновь синтезируемого коллагена по отношению к другим компонентам СТ выше в культурах фибробластов больных ССД и имеется существенное нарушение в пропорции данных макромолекул между собой по сравнению с нормой.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что фибробласты кожи и ЗД, и больных ССД с относительно высокой продукцией коллагеновых белков в культуре имеют в большинстве случаев сниженные показатели биосинтеза протеогликанов по сравнению со средними значениями для всей группы. Оказалось, что коэффициенты корреляции между продукцией коллагеновых белков и протеогликанов в культурах ССД имеют отрицательное значение. Между этими показателями выявлена достоверная обратная корреляционная зависимость с варьированием коэффициента от $-0,53$ до $-0,75$ для разных пассажей и сроков культивирования.

Между показателями продукции коллагеновых белков и гликопротеинов, наоборот, прослеживается линейная зависимость с коэффициентами корреляции от $0,71$ до $0,92$. В культурах ЗД эти зависимости имеют сходный характер.

Таким образом, продукция коллагеновых белков и гликопротеинов находятся в обратной зависимости от биосинтеза протеогликанов. Между продукцией коллагенов и гликопротеинов в большинстве случаев прослеживается линейная корреляционная связь.

В целом полученные нами результаты показали, что на всех исследованных сроках культивирования средние показатели продукции основных компонентов СТ в группе культур фибробластов кожи больных ССД статистически достоверно превышали контроль. Это однозначно доказывает отличие по данному признаку склеродермических фибробластов от фибробластов ЗД. В условиях *in vitro*, когда происходит автономная реализация наследственных свойств клеток, усиленная продукция коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов фибробластами кожи больных ССД позволяет предположить генетическую закрепленность этого признака.

а. Влияние сывороток крови больных ССД на продукцию коллагеновых белков в культурах фибробластов кожи ЗД.

В результате исследования влияния сывороток II больных ССД было найдено, что они оказывают разнонаправленный эффект на продукцию коллагеновых белков в культурах фибробластов кожи ЗД. В среднем эффект сывороток больных на данный показатель не отличается по величине от влияния сывороток ЗД и он составлял

6669±1157 расп/мин/ 10^6 клеток. Однако, если в норме изменение этой характеристики отмечалось в узких пределах от 5219 до 7479 расп/мин/ 10^6 клеток, то индивидуальное варьирование для сывороток ССД было существенно шире : от 2641 до 15736. Эта разнородность влияния сывороток на один из основных показателей обмена фибробластов может указывать на различия в регуляции обмена СТ со стороны центральных регуляторных систем организма на отдельных стадиях развития заболевания.

Нами выявлена определенная корреляция между влиянием сывороток больных на продукцию коллагеновых белков и вариантом течения, а также стадией заболевания. Для больных с хроническим вариантом течения характерно, в основном, стимулирующее влияние сыворотки на продукцию коллагеновых белков.

Полученные результаты позволяют нам считать, что в сыворотке крови больных ССД отсутствует фактор, специфически влияющий на повышение продукции коллагенов в фибробластах. В то же время обнаруженное широкое варьирование показателя доказывает высокую неоднородность составляющих сыворотки крови при ССД.

6. Пролиферативные свойства фибробластов кожи ЗД и больных ССД и содержание общего белка в культуре.

Установлено, что склеродермические фибробласты растут практически в 1,5 раза медленнее, чем клетки ЗД /рис.2/ при культивировании их на среде, содержащей 10% сыворотки человека.

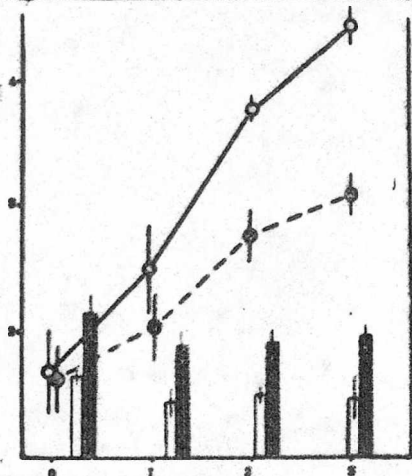


Рис. 2. Динамика изменения клеточной численности и содержание белка в культурах фибробластов ЗД /—○—/ и больных ССД /—●—/. По оси абсцисс — время культивирования /дни/; по оси ординат — слева: количество клеток $\times 10^5$, справа: концентрация белка в мкг на 10^6 клеток $\times 10^2$.

Однако, при культивировании фибробластов на среде с 10% сыво-

ротки эмбрионов коровы клетки обоих видов пролиферировали с одинаковой скоростью.

В монослойных культурах фибробластов кожи больных ССД отмечено увеличение количества общего белка за счет повышения его концентрации в клетках и накопления в межклеточном матриксе /рис.2/. В среднем этот показатель был достоверно выше в 1,44 раза, по сравнению с нормой, и составлял 620 ± 53 мкг белка на 10^6 клеток.

Полученные факты указывают на существенные различия в физиологическом состоянии данных клеток и на их разную чувствительность к ряду биологически активных субстанций.

ГЛАВА II. ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА.

Основными белками внеклеточного матрикса в монослойных культурах фибробластов кожи больных ССД, как определено нами с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, были ФН и коллагеновые белки. В матриксе представлены также минорные компоненты с различной молекулярной массой. В патологических куль-

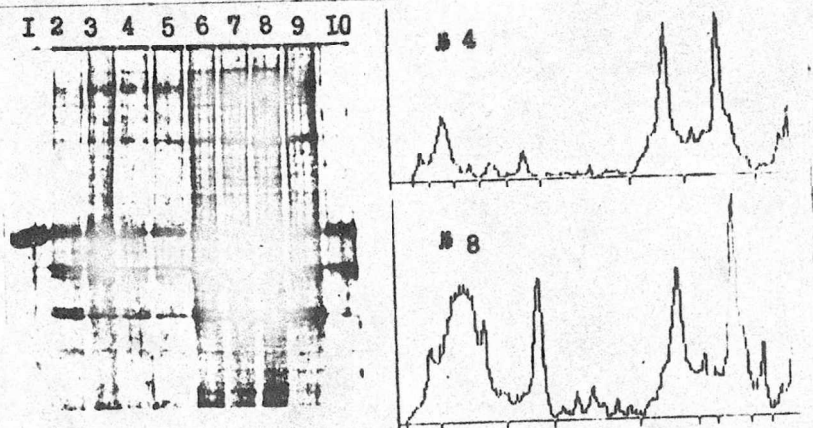


Рис. 3. Электрофореграмма и сканограмма образцов межклеточного матрикса культур фибробластов. Образцы получены в динамике роста культур между 5-м и 20-м днями культивирования. №1 - альбумин, №2-5 - ЗД, №6-9 - больной ССД.

турах межклеточный матрикс по своему белковому составу в основном был подобен матриксу в культурах ЗД, но, как правило, концентрация некоторых его компонентов была выше в культурах

больных ССД. Кроме того, отмечено появление добавочных минорных белков с молекулярной массой 30-40 кД в матриксе склеродермических культур /рис.3/.

Иммунофлуоресцентный анализ подтвердил увеличение содержания ФН в межклеточном матриксе культур фибробластов ССД. Это исследование продемонстрировало также, что повышение содержания ФН в матриксе сохраняется в ряду клеточных поколений и, по-видимому, это свойство у индивидуальных штаммов генетически детерминировано. Таким образом, выявлено нарушение в композиции межклеточного матрикса в культурах фибробластов кожи больных ССД в отношении содержания ФН. Учитывая ведущую роль матрикса в обеспечении формообразовательных процессов и ФН, как одного из главных его компонентов, можно утверждать, что при ССД изменены взаимодействия клетка - матрикс и, как следствие этого нарушены процессы физиологического ремоделирования СТ.

ГЛАВА III. ЦИКЛИЧЕСКИЕ НУКЛЕОТИДЫ ПРИ ССД.

Результаты определения концентрации ЦН в культивируемых фибробластах кожи больных ССД показали существенные отличия по данным показателям от нормы /табл.2/. Внутриклеточная концентрация цАМФ в штаммах разных больных изменялась от 11,2 до 50,0 пмоль/мг белка и была достоверно ниже аналогичного показателя у ЗД в 1,57 раза. Напротив, концентрация цГМФ была значительно повышена в патологических клетках - в среднем в 2,24 раза.

Таблица 2. Внутриклеточное содержание ЦН в монослойных культурах фибробластов кожи.

	Здоровые доноры /n =15 /	Больные ССД /n =21 /	p
Концентрация белка /мкг на 10 ⁶ клеток/	472±22	683±70	<0,01
Концентрация цАМФ /пмоль на мг белка/ / на 10 ⁶ клеток /	54,0±2,1 25,5±1,6	34,5±2,4 19,9±1,0	<0,001 <0,05
Концентрация цГМФ /пмоль на мг белка/ / на 10 ⁶ клеток /	2,19±0,23 0,98±0,11 n =7	4,9±0,5 3,2±0,7 n =9	<0,005 <0,01
Соотношение цАМФ/цГМФ	25,7±3,2	7,8±1,1	<0,005

Соотношение ЦН в склеродермических фибробластах резко изменено по сравнению с нормой, обуславливая, по-видимому, серьезные обменные перестройки в патологических клетках.

В культурах фибробластов кожи больных ССД нами обнаружено изменение чувствительности аденилатциклазной системы к действию адреналина. При ССД концентрация цАМФ в фибробластах в присутствии адреналина достигала всего 67,4 пмоль/мг белка, что в 4 раза меньше средней концентрации цАМФ в стимулированных адреналином клетках ЗД /рис.4/. Резко изменена и динамика реагирования склеродермических фибробластов на данный гормон.

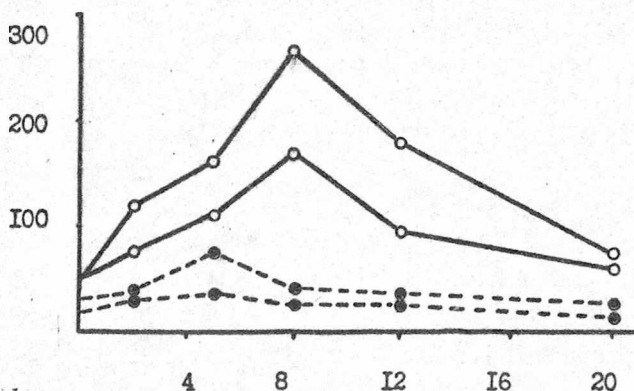


Рис.4. Влияние адреналина на внутриклеточную концентрацию цАМФ в фибробластах ЗД /-○-/ и больных ССД /-●-/. По оси абсцисс - время инкубации /в мин/, по оси ординат - концентрация цАМФ /пмоль на мг белка /.

β -агонист /изопротеринол/ оказывал сходное действие в нормальных и склеродермических штаммах фибробластов, повышая внутриклеточную концентрацию цАМФ. Однако, стимулирующее влияние изопротеринола на патологические клетки было выражено более, чем в 4 раза слабее, чем в контроле, и концентрация цАМФ в стимулированных фибробластах ССД в среднем не отличалась от базального уровня нормы. В культурах фибробластов кожи ЗД изопротеринол тормозил продукцию коллагеновых белков в среднем на 29-55%. Аналогичным действием обладал дибутирил-цАМФ : в концентрации 10^{-4} М он снижал продукцию коллагена на 28-55%. В культурах фибробластов ССД положительное влияние изопротеринола выявлялось только в штаммах клеток с уровнем синтеза колла-

гена, близким к средней границе нормы и с относительно высоким базальным уровнем цАМФ. В присутствии изопротеринаола внутриклеточная концентрация цАМФ в данных штаммах повышалась до 76-110 пмоль/мг белка, то есть почти в 2 раза превышала базальный уровень нормы. В штаммах фибробластов ССД с существенно повышенной продукцией коллагеновых белков эффект изопротеринаола отсутствовал, а стимулированный уровень цАМФ при этом не достигал среднего значения базального уровня нормы. Аналог цАМФ /дibuтирил-цАМФ/, легко проникающий в клетку, значительно тормозил продукцию коллагеновых белков в культурах фибробластов ЗД и в обоих видах культур фибробластов кожи больных ССД.

Следовательно, нарушение регуляции синтеза коллагена со стороны катехоламинов происходит на уровне рецептор-аденилатциклаза, а не на стадии реализации регуляторного эффекта самого цАМФ.

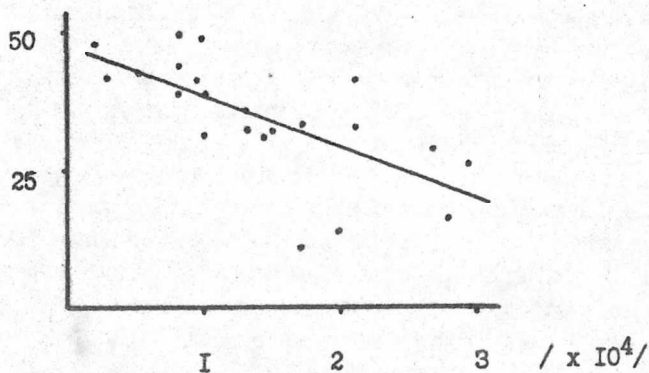


Рис. 5. Зависимость между внутриклеточным содержанием цАМФ и продукцией коллагена в культурах фибробластов больных ССД. По оси абсцисс - продукция коллагена /расп. в мин на 10^6 клеток/, по оси ординат - концентрация цАМФ /пмоль на мг белка /.

Таким образом, повышение коллаген-синтезирующей активности фибробластов кожи больных ССД сопряжено со снижением внутриклеточной концентрации цАМФ как базальной, так и в присутствии катехоламинов. Это позволяет утверждать, что в увеличение продукции коллагена при ССД определенный и существенный вклад вносит аденилатциклазная система. Этот вывод подтверждается и тем, что выявлена обратная корреляционная зависимость /рис.5/ меж-

ду внутриклеточным содержанием цАМФ и продукцией коллагеновых белков в культурах нормальных и патологических клеток. О нарушении функционирования аденилатциклазной системы свидетельствует и изменение динамики увеличения внутриклеточного цАМФ в фибробластах ССД после добавления к культурам этих клеток ад-реналина и изопротеринола.

Кроме того, при исследовании внутриклеточной концентрации цАМФ в фибробластах ЗД и ССД в присутствии холерного токсина было выявлено, что ответ аденилатциклазной системы патологических клеток существенно изменен. Для фибробластов ССД отмечен более высокий порог чувствительности по сравнению с нормой и запаздывание активации аденилатциклазы токсином в этих клетках. Полученные результаты свидетельствуют о сохранности каталитической субъединицы фермента и о возможном нарушении прохождения сигнала на участке рецептор-М-белок - фермент.

Таким образом, в основе неуправляемой продукции коллагена и, возможно, других компонентов СТ, при ССД лежат два внутриклеточных процесса: снижение активности аденилатциклазы и понижение транспорта Ca^{2+} в клетку /М.Д.Гроздова и соавт.1978/. Вследствии этого снижается внутриклеточная концентрация цАМФ, нарастает концентрация цГМФ, и фибробласт переходит на другой уровень обмена. Соотношение этих ЦН в фибробластах ССД в 3,3 раза ниже, чем в норме, и соответствует показателю, характерному для быстроделющихся клеток, тогда как скорость роста этих клеток в культуре в 1,5 раза снижена по сравнению с фибробластами ЗД. При ССД, по-видимому, имеет место разобщение взаимосвязанных, последовательных процессов синтеза и роста, где существенную роль играют нарушения в обмене ЦН.

ГЛАВА IV. ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ФИБРОБЛАСТОВ В КУЛЬТУРЕ И ХАРАКТЕР КЛИНИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ.

Результаты исследования продукции основных компонентов СТ в монослойных культурах фибробластов кожи больных ССД в сопоставлении с клиническими параметрами болезни представлены в таблице 3. Во всех группах культур фибробластов, полученных из участков кожи с различной степенью поражения, продукция коллагеновых белков, гликопротеинов и протеогликанов была повышенной по сравнению с контролем и по величине существенно не различалась между отдельными группами.

У больных ССД с разными вариантами течения средние значе-

Таблица 3. Сопоставление показателей продукции основных компонентов СТ в монослойных культурах и клинических характеристик больных ССД.

Клиническая характеристика	Продукция / расп/мин/10 ⁶ клеток /		
	коллагеновых белков	гликопротеинов	протеогликанов
<u>Характер поражения кожи</u>			
клинически не-измененная	17887±1824 n = 20	14274±3156 n = 8	24462±3578 n = 8
пораженная	16273±1807 n = 32	16144±2747 n = 13	28953±2127 n = 13
плотный отек	16407±2604 n = 12	18723±3966 n = 5	30159±2715 n = 5
индурация	16687±3511 n = 15	16138±5052 n = 5	25920±3554 n = 5
атрофия	14714±5192 n = 5	11857±6625 n = 3	31998±6119 n = 3
<u>Течение заболевания</u>			
острое	23007±3625 n = 8	28242±289 n = 2	17363±4923 n = 2
подострое	15745±2133 n = 24	12930±2708 n = 8	27603±2331 n = 8
хроническое	19940±2443 n = 13	17657±3362 n = 8	26285±3241 n = 8
<u>Стадия заболевания</u>			
I	20572±3285 n = 8	18839±4904 n = 6	24652±4444 n = 6
II	18254±1836 n = 28	16418±2081 n = 9	24294±3054 n = 9
III	13505±4933 n = 7	13192±7511 n = 3	26423±3622 n = 3
<u>Активность заболевания</u>			
I	20690±3405 n = 14	17657±3362 n = 8	26285±3241 n = 8
II	18707±1873 n = 22	19590±3271 n = 7	22645±4264 n = 7
III	9858±1232* n = 7	7328±2062* n = 3	32345±4264 n = 3
<u>Контроль</u>	7447±1228 n = 28	9104±853 n = 20	17765±3621 n = 21

Примечание: * - p < 0,05 в соответствующей группе сравнения.

ния изученных показателей продукции компонентов СТ также существенно не отличались между собой, как правило, значительно превышая аналогичные показатели в культурах ЗД. Только при остром быстропрогрессирующем варианте течения ССД продукция протеогликанов не отличалась от нормы. В то же время в культурах фибробластов больных с данным вариантом течения прослеживалась определенная тенденция к увеличению обмена коллагеновых белков и гликопротеинов по сравнению с другими вариантами течения заболевания.

Сопоставления средних показателей обмена со стадией заболевания не выявило существенных отличий между анализируемыми группами штаммов клеток. На поздних стадиях патологического процесса наблюдалось некоторое снижение синтеза коллагеновых белков и гликопротеинов, но при этом варьирование показателей было значительным, особенно в культурах фибробластов, полученных от больных с III стадией заболевания /табл.3/.

Анализ результатов биосинтетической активности фибробластов в культуре в зависимости от активности заболевания показал, что для фибробластов больных с I и II степенью активности процесса характерно повышение всех трех исследованных параметров обмена, тогда как при III степени активности продукция коллагеновых белков и гликопротеинов практически не изменена по сравнению с контролем.

Возможным объяснением полученного результата может быть тот факт, что III степень активности мало свойственна ССД /Гусева Н.Г., 1975/ и по клиническим и лабораторным показателям эта группа больных больше напоминает системную красную волчанку. Развивающиеся в этой группе типичные фиброзные изменения СТ могут быть следствием других этио-патогенетических причин, где ведущее место занимает иммунологическая активация клеток собственно СТ /Postlethwaite и соавт., 1982, Vuorio и соавт. 1984/.

Сопоставление внутриклеточных концентраций ЦН с клиническими показателями также не выявило сколько-нибудь выраженных зависимостей между исследованными показателями. Отмечено только, что реакция фибробластов на адреналин у больных ССД старше 30 лет снижена не только по сравнению с нормой, но и с больными более молодого возраста. Этот факт может частично объяснять более частое возникновение ССД у людей старше 30 лет.

В рамках проведенного исследования нам не удалось выявить

определенных зависимостей между основными клиническими характеристиками и показателями обмена фибробластов в монослойной культуре. Тем не менее биосинтетическая активность фибробластов ССД была значительно повышена в более, чем 75% исследованных штаммов.

Таким образом, несмотря на различия клинической картины и лабораторных показателей, культуры фибробластов больных ССД объединяет общее качество - повышение метаболической активности, являющееся особым патофизиологическим состоянием фибробластов дермы при данном заболевании.

ГЛАВА У. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ДПА И ПРЕПАРАТОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА СИСТЕМУ ЦН В КЛЕТКЕ.

Д-пеницилламин. В терапевтических дозах от 50 до 200 мкг/мл ДПА оказывал слабое влияние на пролиферацию клеток в обоих видах культур фибробластов. Действие ДПА зависело и от дозы, и от времени культивирования клеток в его присутствии.

ДПА в концентрации 200 мкг/мл достоверно увеличивал количество общего белка в клеточном монослое /в среднем на 34,7%/. ДПА оказывал разнонаправленное действие на обмен коллагена и ФН. Концентрация коллагеновых белков в культуральной среде и в фибробластах снижалась под влиянием 50 мкг/мл ДПА. Параллельное определение концентрации $\alpha_1(I)$ - и $\alpha_1(III)$ -цепей коллагена также показало снижение их количества в обработанных препаратом культурах. Продукция ФН и его накопление в клеточном слое, наоборот, значительно возрастала в присутствии ДПА. При этом наблюдался дозо-зависимый ответ. При дозе 50 мкг/мл концентрация ФН в культуральной среде возрастала в среднем на 10-15%, а при дозе 200 мкг/мл - до 43-49%. Сходное действие ДПА оказывал и на накопление ФН в клеточном слое. Отмечена тенденция к более выраженному эффекту ДПА на патологические клетки по сравнению с фибробластами ЗД. Фибробласты кожи больных ССД в культуре связывали больше 3H -ДПА, чем аналогичные клетки ЗД. Количество связавшегося с фибробластами 3H -ДПА прямо коррелировало с концентрацией лекарства в инкубационной среде, но при этом лишь малый процент добавленного к культуральной среде изотопа связывался с клетками и с белками культуральной среды - в среднем соответственно 0,06 и 1,0%.

Механизм влияния ДПА на продукцию коллагена, по-видимому,

связан с его действием на аденилатциклазную систему, поскольку обработка фибробластов дозой 100 мкг/мл в течение 20 часов приводит к повышению внутриклеточной концентрации цАМФ в среднем на 72% в культурах клеток и ЗД, и больных ССД.

Особенностью связавшегося с клеткой ДПА является его способность длительно персистировать в ней. В фибробластах обоих видов культур /ЗД и ССД/ практически 50% связавшегося ^3H -ДПА присутствовало в течение последующих 24-72 часов инкубации после удаления свободного изотопа.

Определено, что действие ДПА связано с непосредственным присутствием препарата в тканях, потому что скорость продукции коллагеновых белков практически не менялась в штаммах фибробластов кожи, полученных от одних и тех же больных до лечения и после 6-12 месяцев применения ДПА. Наблюдаемая вариация значений в обследованных группах культур была невелика. Следовательно, длительное применение ДПА не вызывает устойчивых перестроек в обмене фибробластов, обратимо влияя на биосинтез коллагена.

Теofilлин. При всех исследованных концентрациях от 50 до 250 мкг/мл теofilлин подавлял размножение клеток, оказывая аналогичное действие на культуры фибробластов ЗД и больных ССД. В среднем снижение пролиферации составляло 22,3%.

Теofilлин, являясь ингибитором фосфодиэстеразы, в концентрации 100 мкг/мл повышал внутриклеточную концентрацию цАМФ в склеродермических фибробластах в среднем на 77,3%, что указывает на чувствительность патологических фибробластов к данному регуляторному воздействию.

Увеличивая концентрацию цАМФ в фибробластах, теofilлин оказывал выраженный эффект на биосинтез коллагеновых белков. В течение 20-часового воздействия препарата в дозе 100 мкг/мл он снижал продукцию коллагеновых белков в культурах фибробластов ЗД на 22,4%, а при ССД - на 27,7%.

Верапамил. В терапевтических дозах: 1-10 мкг/мл, верапамил, подобно теofilлину, подавлял пролиферацию фибробластов и увеличивал внутриклеточную концентрацию цАМФ в среднем соответственно на 29,6 и 65,2%. Действие препарата носило дозозависимый характер. Однако, эффект верапамила на коллаген-синтезирующую активность фибробластов имел свои особенности. На культуры ЗД препарат практически не оказывал действия, тогда как фибробласты больных ССД в присутствии верапамила резко уси-

ливали синтез белка и коллагена, в частности. В настоящий момент трудно объяснить подобное поведение склеродермической клетки в ответ на введение верапамила, но полученный факт дополнительно свидетельствует об изменении физиологии обмена и реагирования клеток СТ при ССД.

Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что ДПА и теофиллин являются препаратами, направленно воздействующими на процессы фиброобразования, и их применение патогенетически оправдано. Эти препараты, а также верапамил, могут быть успешно использованы и в качестве противовоспалительных средств локального действия, потому что в известных концентрациях они обладают выраженным антипролиферативным эффектом на клетки СТ.

ГЛАВА VI. ПАТОФИЗИОЛОГИЯ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ.

Значительной трудностью в понимании патофизиологии ССД является практически полное отсутствие знаний об этиологии данного заболевания. В настоящее время на базе экспериментальных и клинических наблюдений выдвинуты три основные концепции патогенеза ССД. Одной из них является рабочая гипотеза, где в качестве ведущей причины развития болезни выделяется повышение продукции коллагенов и других компонентов СТ как проявление фенотипических особенностей фибробластов данных больных.

Целенаправленные исследования на культурах фибробластов кожи больных ССД, проведенные нами, подтвердили состоятельность этого воззрения и позволили расшифровать некоторые молекулярные механизмы патогенеза ССД.

Полученные нами результаты о стабильном повышении продукции основных компонентов СТ фибробластами ССД в течение ряда последующих клеточных генераций доказывают генетическую закрепленность данного признака и его реализацию в условиях монослойного культивирования. Кроме того, наблюдается непропорциональное увеличение продукции компонентов СТ, приводящее в конечном счете к формированию межклеточного матрикса с измененной композицией. В организме формирование измененного межклеточного вещества должно определять как развитие фиброза, так и воспалительные реакции, которые практически всегда наблюдаются около сосудов или диффузно на разных этапах развития ССД.

Хотя первичный причинный агент при ССД остается неизвестным, в клетке можно выделить то звено, которое в большинстве случаев может определять ту гамму расстройств, которая наблюдается в различных тканях больных ССД. Таким участком в клетке является поверхностная или плазматическая мембрана. Как показали наши исследования, плазматическая мембрана фибробластов ССД имеет ряд структурно-функциональных особенностей по сравнению с нормой. Увеличена так называемая "фибронектиновая шуба" клетки, изменена деятельность ассоциированной с мембраной аденилатциклазной системы, нарушена чувствительность клетки к действию адреналина и ФН, повышен транспорт кальция. В единичных работах также отмечены нарушения физиологии клеточного обмена при ССД /Д.А.Лебедев и соавт., 1982/, свидетельствующие о возможных перестройках поверхностной мембраны фибробластов. В целом, продемонстрированные нами особенности обмена фибробластов ССД показывают, что функциональные изменения затрагивают различные уровни клеточного метаболизма, а само заболевание имеет черты своеобразной мембранной патологии.

Следовательно, нарушение функции клеточной мембраны фибробластов при ССД является одной из ведущих причин утраты механизмов внешнего контроля за клеточным ростом и обменом. Именно перестройки в клеточной мембране обуславливают изменение регуляции активности склеродермических фибробластов /рис.6/. При этом ключевая роль принадлежит извращенному метаболизму цАМФ, цГМФ и кальция. Снижение амплифицирующего пути реализации гормональных сигналов и изменение транспорта кальция в клетку, а, возможно, и других биологически активных веществ - это характерное проявление патофизиологии системной склеродермии на клеточном и молекулярном уровнях.

Устойчивое изменение обмена ЦН в фибробластах ССД подтверждает воззрение о переходе этих клеток в иное, чем в норме, специализированное состояние с определенным статусом обмена. Склеродермический фибробласт становится нечувствительной, а следовательно, и неуправляемой клеткой в отношении общих нейрогуморальных факторов контроля и в конечном счете приобретает определенную автономию.

Вскрытые молекулярные механизмы патогенеза ССД на модели культур фибробластов позволили нам предложить подходы к патогене-

нетически обоснованной терапии с использованием препаратов, направленно влияющих на обмен ЦАМФ.

Таким образом, полученные в работе факты о фенотипических особенностях фибробластов кожи больных ССД и некоторых молекулярных механизмах их возникновения, позволяют рассматривать функциональные нарушения метаболизма фибробластов в качестве одного из основных звеньев патогенеза ССД. Возможно, что именно эти нарушения лежат в основе нескольких порочных кругов

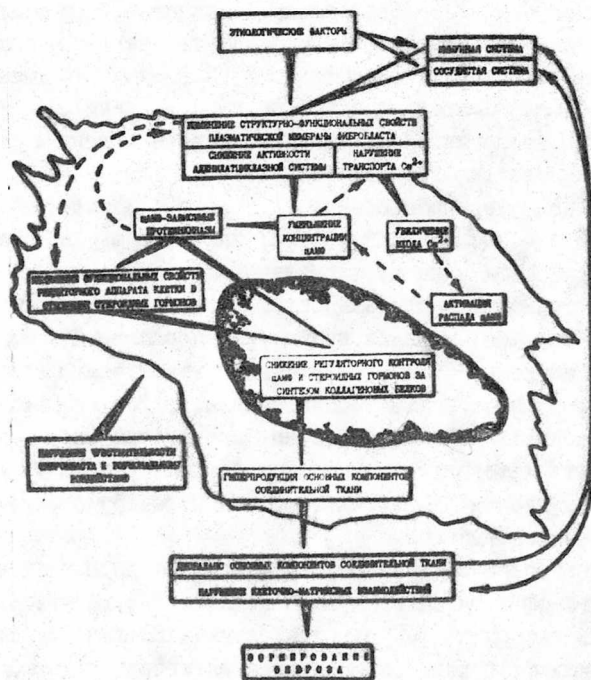


Рис. 6. Схема молекулярных механизмов нарушения регуляции обмена коллагеновых белков при ССД. Непрерывными линиями внутри фибробласта указаны звенья патологического процесса, экспериментально доказанные в ходе выполнения настоящего исследования.

само- и взаимно-активации. Один из них, специфичный только для ССД, возникает в результате метаболических сдвигов в интерстиции СТ и/или сосудистой трани и приводит к поражению капилля-

ров и локальных участков СТ. Другие, такие как аутоиммунная стимуляция, нарушение дифференцировки, клеточно-матриксные взаимодействия и т.д., посредством механизмов соответствующей регуляции и в конечном итоге через воспаление приводят к стабилизации возбуждения коллагенсинтезирующих клеток, гиперпродукции компонентов СТ и развитию фиброза и склероза.

ВЫВОДЫ.

1. Одним из ведущих факторов патогенеза системной склеродермии является нарушение на клеточном уровне обмена основных компонентов соединительной ткани - коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов, характеризующееся устойчивым повышением функциональной активности фибробластов. В результате повышенной непропорциональной продукции компонентов соединительной ткани изменяется физиологический баланс тканевого обмена в целом, приводящий к развитию генерализованного фиброза при ССД.

2. Специфические особенности обмена склеродермических фибробластов в монослойных культурах характерны для больных ССД разного возраста и пола, с различными вариантами течения, степенями активности и длительностью заболевания, а также фибробластам, полученным из биоптатов как пораженной, так и клинически неизмененной кожи. Отсутствие существенных отличий в обмене фибробластов внутри обследованных групп больных при всем многообразии клинико-лабораторных проявлений заболевания доказывает, что патология этих клеток соединительной ткани является ведущим звеном в патогенезе ССД и отражает специфику данной патологической единицы.

3. Сыворотки больных ССД не оказывают выраженного одностороннего эффекта на продукцию коллагена в культурах фибробластов кожи здоровых доноров, что свидетельствует об отсутствии фактора или факторов, специфически активирующих коллагенсинтезирующую деятельность фибробластов при ССД.

4. Гиперпродукция склеродермическими фибробластами одного из основных регуляторных гликопротеинов - фибронектина, устойчиво проявляющаяся при длительном культивировании *in vitro*, лежит в основе нарастания количества этого белка в соединительной ткани больных ССД, формирования межклеточного матрикса с измененной композицией и функциональными свойствами, хронической активации клеток соединительной ткани при ССД.

5. Характерным патологическим признаком ССД на клеточном уровне является нарушение внутриклеточного обмена циклических нуклеотидов. Найденное изменение баланса цАМФ/цГМФ в патологической клетке более, чем в 3 раза, за счет уменьшения концентрации цАМФ и повышения цГМФ, определяет переход фибробластов на другой уровень обмена, при котором, возможно, нарушается взаимосопряженность процессов повышенного биосинтеза и репродукции в клеточной системе.

6. Молекулярный механизм повышения коллагенсинтезирующей активности фибробластов при ССД обусловлен уменьшением внутриклеточной концентрации цАМФ и снижением чувствительности аденилатциклазной системы к действию катехоламинов, что приводит к неконтролируемому синтезу коллагена и последующему формированию фиброза. Снижение концентрации цАМФ в клетке при ССД связано с недостаточностью собственно аденилатциклазной системы. Нарушение локализовано на уровне передачи сигнала от рецептора к каталитической субъединице фермента.

7. В основе патофизиологии ССД лежит нарушение структурно-функциональных свойств клеточной мембраны фибробласта. Заболевание имеет черты своеобразной мембранной патологии, при которой извращение передачи внешних сигналов, таких как гормоны, кальций, лиганды, является одной из ведущих причин неконтролируемой повышенной деятельности клеток соединительной ткани. Вследствии этого склеродермические фибробласты обладают определенной автономностью, менее зависимы от общих факторов регуляции и определяют развитие генерализованного фиброза в организме.

8. Д-пеницилламин является препаратом, оказывающим выраженное действие на биосинтез коллагена, обмен фибронектина и пролиферацию фибробластов в монослойной культуре. Связываясь с клетками в незначительных количествах /менее 1% / и длительно персистируя в них, Д-пеницилламин значительно повышает концентрацию цАМФ в фибробластах и подавляет их функциональную активность. Следовательно, Д-пеницилламин - препарат патогенетического типа и может быть с успехом использован при коррекции нарушений обмена соединительной ткани.

9. Теофиллин и верапамил в терапевтических дозах обладают модулирующим действием на обмен клеток соединительной ткани, подавляя в условиях *in vitro* рост фибробластов и повышая в них внутриклеточный уровень цАМФ. Одновременно теофиллин существен-

но снижает продукцию коллагеновых белков и это является прямым указанием для патогенетически обоснованного применения данного отечественного препарата при лечении локальных фиброзных процессов, ассоциированных с нарушением обмена циклических нуклеотидов.

10. Повышенная продукция основных компонентов соединительной ткани и нарушение обмена циклических нуклеотидов, сохраняющиеся в ряду клеточных генераций, доказывают концепцию о существенной роли генетических факторов в патогенезе ССД. Реализация генетических особенностей фибробластов *in vivo* является одним из основных механизмов патогенеза этого заболевания, определяющих и избыточную продукцию компонентов соединительной ткани с последующим фиброзом, и хронизацию процессов воспаления с персистирующей активацией клеток собственно соединительной ткани.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Рекомендуется применение метода монослойного культивирования фибробластов и методов комплексной оценки их обмена для изучения конкретных механизмов патогенеза ревматических заболеваний, выяснения на клеточном и молекулярном уровнях отдельных звеньев патологического процесса и разработки подходов к их коррекции.

2. Рекомендуется расширить и углубить исследования по изучению структурно-функциональных характеристик клеточных мембран фибробластов при ССД с целью расшифровки закономерностей развития патологического процесса и патофизиологии заболевания.

3. Рекомендуется применение Д-пенициллина, теофиллина и верапамила в качестве препаратов местного противовоспалительного действия, а теофиллина и Д-пенициллина - для коррекции обмена соединительной ткани и локального подавления процессов фиброобразования.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Study of skin collagen metabolism in patients with systemic scleroderma . - Тезисы докладов IV конгресса ревматологов Чехословакии.- Пьештяны.- 1977.- с.144. /соавт. Лебедев Д.А., Рассохина И.И., Насонова В.А. /.

2. Характеристика метаболизма соединительной ткани при

ревматических заболеваниях.- В сб: Основные достижения в изучении ревматических заболеваний в СССР.- Тезисы докладов II Всесоюзного съезда ревматологов.- Москва.- 1978.- с.150 / соавт. И.И.Рассохина, Д.А.Лебедев /.

3. Потребление ионов кальция культурой фибробластов кожи в норме и при системных поражениях соединительной ткани.- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 1978.- с.287-289./ соавт. М.Д.Гроздова, И.Л.Шарлова /.

4. Современное состояние проблемы патогенеза системной склеродермии.- Терапевтический архив.- 1979.- №7.- с.114-117. / соавт. И.И.Рассохина, Д.А.Лебедев, М.Д.Гроздова, Г.И.Яковлева/.

5. Метаболизм соединительной ткани при ревматических заболеваниях.- Тезисы докладов IV Всесоюзного биохимического съезда.- Ленинград.- 1979.- т.1.- с.233. / соавт. А.С.Кайнова, И.И.Рассохина, М.Д.Гроздова и др. /.

6. Функциональная активность фибробластов кожи при ревматических заболеваниях.- В сб: Физиология и патология соединительной ткани.- Новосибирск.- 1980.- т.П.- с.142-143./ соавт. И.И.Рассохина /.

7. Метаболизм коллагена при системной склеродермии /клинико-биохимические сопоставления /.- Там же.- т.П.- с.114-115. / соавт. Н.Г.Гусева, И.И.Рассохина, Д.А.Лебедев и др. /.

8. Применение Д-пеницилламина для лечения больных ревматоидным артритом и некоторые механизмы его действия.- Терапевтический архив.- 1980.- №6.- с.110-115. / соавт. Т.М.Трофимова, К.И.Авдеева, Т.А.Тарасенкова и др. /.

9. Влияние адреналина на уровень циклического 3',5'-аденозинмонофосфата в норме и при системной склеродермии.- Медицинский реферативный журнал.- 1980.- разд.ХУ.- №12.- публ. 1646. / соавт. В.В.Хохлова /.

10. The influence of D-penicillamine on normal and scleroderma fibroblasts monolayer cultures.- Тезисы докладов VII Европейского симпозиума по изучению соединительной ткани.- Прага.- ЧССР.- 1980.- с.222-223. / соавт. В.В.Buckingham, P.K.Prince, J.M.Seyer /.

11. Патофизиологические механизмы фиброза на модели системной склеродермии.- В сб: Предболезнь - болезнь - выздоровление.- Ленинград.- 1981.- т.1.- с.565-567. / соавт. Н.Г.Гусева, И.И.Рассохина, Г.И.Яковлева /.

12. Нарушение бета адренорецепторной функции фибробластов кожи больных системной склеродермией.- В сб: Циклические нуклеотиды.- Минск.- 1982.- с.46. / соавт. М.Д.Гроздова, Ю.В.Хохлова /.

13. Действие адреналина на культуру фибробластов кожи в норме и при системной склеродермии.- Вопросы медицинской химии.- 1982.- №6.- с.51-56. / соавт. М.Д.Гроздова, Ю.В.Хохлова, Н.Г.Гусева /.

14. Влияние сыворотки больных системной склеродермией на биосинтез фибробластами коллагена до и после применения антилимфоцитарного иммуноглобулина.- Терапевтический архив.- 1982.- №3.- с.113-115. / соавт. Д.А.Лебедев, И.М.Ганжа, О.Б.Яценко /.

15. Патогенетическое значение нарушения рецепторной функции фибробластов при ревматических заболеваниях.- Терапевтический архив.- 1983.- №7.- с.12-15. / соавт. М.Д.Гроздова /.

16. Comparative analysis of synthesis of protein, RNA and DNA in cultured skin fibroblasts of healthy donors and patients with rheumatic diseases.- Тезисы докладов X Европейского конгресса ревматологов.- Москва.- 1983.- №996.- с. 290. / соавт. О.Ю.Абакумова, Н.Г.Куценко /.

17. Эффект изопротеринаола на синтез коллагена в культурах фибробластов кожи больных системной склеродермией.- Вопросы медицинской химии.- 1984.- №6.- с.92-95. / соавт. Ю.В.Хохлова, М.Д.Гроздова /.

18. Cyclic nucleotides and calcium transport in cultured dermal fibroblasts from progressive systemic sclerosis and rheumatoid arthritic patients.- Arthrit.Rheum.- 1984.- № 10.- p. 1144-50 / соавт. Ю.В.Хохлова, М.Д.Гроздова, Н.Г.Гусева, Т.М.Трофимова /.

19. Генетические аспекты реакций гуморального иммунитета к коллагену у человека и животных.- Генетика.- 1985.- №5.- с. 868-871. / соавт. Ю.В.Несвижский, Г.Н.Плесковская /.

20. Механизмы действия противоревматических препаратов на клеточном уровне.- Тезисы докладов III Всесоюзного съезда ревматологов.- Вильнюс.- 1985.- с.258-259. / соавт. Ю.В.Хохлова, Л.Н.Капняикова, Гроздова М.Д. и др. /.

21. Синтез белка, РНК и ДНК в культуре фибробластов кожи здоровых доноров и больных ревматическими заболеваниями.- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 1985.- №2.- с.

156-158. / соавт. О.Ю.Абакумова, Н.Г.Купченко /.

22. Длительное применение Д-пенициллина при системной склеродермии и ревматоидном артрите.- Клиническая медицина.- 1986.- №6.- с.44-50. / соавт. Н.Г.Гусева, Т.М.Трофимова, Г.Г.Оскилко и др. /.

23. Влияние среды с низким содержанием сыворотки на синтез и секрецию белка, синтез РНК и ДНК в культуре фибробластов кожи больных ревматоидным артритом и системной склеродермией.- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.- 1986.- №12.- с.706-709. / соавт. О.Ю.Абакумова, Н.Г.Купченко, Н.И.Соловьева, О.С.Чекмолаева /.

24. Явление агрегации антител в комплексы в момент их взаимодействия с антигеном.- / регистрационный номер ОТ-11369 от 12.06.1986/. / соавт. Е.В.Ларионов, В.И.Васин, С.Н.Багров/- 22 с.

25. Нарушение регуляции продукции коллагена в фибробластах кожи больных системной склеродермией.- Известия АН СССР /сер.биол./.- 1986.- №4.- с.571-576. / соавт. М.Д.Гроздова, Ю.В.Хохлова, Л.Н.Кашникова /.

26. Активация обмена кальция в культурах фибробластов с повышенной коллаген-синтезирующей активностью. Эффект эстрадиола.- Тезисы докладов VI Всесоюзного симпозиума по медицинской энзимологии.- 1986.- Махачкала.- с. 193 / соавт. Л.Н.Кашникова, М.Д.Гроздова /.

27. Роль протеолиза фибронектина в функционировании клеток соединительной ткани при ревматических заболеваниях.- Тезисы докладов XVI Европейского симпозиума ортопедов: "Деструкция суставов".- Сочи.- 1987.- с.5 / соавт. О.Ю.Абакумова, Н.Г.Купченко /.

28. А.с. № 1426578 А1 СССР МКИ⁴ А 61 № 9/00.- Способ моделирования катаракты/ С.Н.Федоров, А.Ф.Панаски, Е.В.Ларионов и др. (СССР) /.- 4 с.

Тематический план 1989 г., № 524

Подписано в печать 24.04.89 г. Л-28881. Формат 60х90/16.
Ротапринтная печать. Усл.печ.л. 2,0. Усл.кр.-отт.2,125.
Уч.-изд.л. 1,97. Тираж 100 экз. Заказ 544. Бесплатно.

Издательство Университета дружбы народов
117923, ГСП-1, Москва, ул.Орджоникидзе, 3

Типография Издательства УДН. 117923, ГСП-1, Москва,
ул.Орджоникидзе, 3

121201



2021438036