

# ИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ В ГИПЕРСЕКРЕТЕ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И МОРФОЛОГИЯ ХОНДРОЦИТОВ И СИНОВИОЦИТОВ ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА У ПАЦИЕНТОВ С АВАСКУЛЯРНЫМ НЕКРОЗОМ ГОЛОВКИ БЕДРА

<sup>1</sup>Н.Н. Полещук, <sup>1</sup>А.Н. Асташонок, <sup>1</sup>Л.В. Рубаник, <sup>2</sup>А.Э. Мурзич,  
<sup>2</sup>Л.А. Пашкевич, <sup>2</sup>М.Т. Мохаммади

<sup>1</sup>ГУ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и  
микробиологии, Минск, РБ

<sup>2</sup>ГУ Республиканский научно-практический центр травматологии и  
ортопедии, Минск, РБ

**Резюме:** Исследованы образцы синовиальной жидкости, биоптаты хряща и синовиальной оболочки у пациентов с некрозом головки бедренной кости. Методами гистологического анализа и электронной микроскопии дана характеристика изменений в хондроцитах, синовиоцитах (А- и В-клеток) тазобедренного сустава. С использованием молекулярно-биологического и иммуноферментного анализа показано наличие антител и специфических фрагментов ДНК возбудителей (*S. trachomatis*, *Ch. pneumoniae*, вируса простого герпеса I и II типов, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр). Полученные данные важны для разработки тактики патогенетической терапии.

**Ключевые слова:** Хондроциты, синовиоциты, морфология, микробиологический анализ.

**Введение.** Заболевания, в основе развития и течения которых лежит хроническое воспаление костно-суставной системы, в последние годы неуклонно растут. Среди них аваскулярный некроз головки бедренной кости является наиболее тяжелой формой патологии, характеризующейся прогрессирующим течением, малоуспешностью консервативного лечения, сложностью и невысокой эффективностью оперативного лечения [1,2].

Характерной особенностью этого заболевания является поражение синовиальной оболочки, при этом в патологический процесс вовлекаются суставной хрящ, элементы костного мозга и кости, что на более поздних стадиях приводит к дегенерации головки бедра и артрозу тазобедренного сустава. С активностью и прогрессированием патологических процессов в костно-суставной системе, синовиальной оболочке и хрящевой ткани связаны различные маркеры, уровень экспрессии которых отражает активность воспаления и степень активации клеточного иммунитета [1,3].

В последние годы активно обсуждаются сведения о возможной роли инфекционных агентов как кофакторов в суставной патологии. Об этом свидетельствуют данные об обнаружении специфических антител и антигенов возбудителей в суставной жидкости и периартикулярных тканях пораженных

суставов. Имеются немногочисленные сообщения о детекции в синовиальной жидкости и оболочке, хрящевой ткани различных патогенов, таких как *C. trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *M. pneumoniae*, *M. arthritidis*, вирусов семейства *Herpesviridae* (цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, вируса герпеса II и VI типов), парвовируса B19, вируса краснухи и т.д. [4,5,6,7]. Актуальным вопросом является поиск специфических морфологических маркеров, позволяющих оценить активность и характер течения деструктивных процессов, происходящих в хрящевой ткани, синовиальной оболочке при поражениях тазобедренного сустава.

**Цель работы.** Выявить маркеры нарушения клеточно-матриксной архитектоники синовиоцитов и хондроцитов и провести микробиологическое исследование синовиальной жидкости у пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра.

**Материалы и методы.** Проведено комплексное лабораторное обследование 20 пациентов с аваскулярным некрозом бедра, находящихся на стационарном лечении и амбулаторном наблюдении в РНПЦ травматологии и ортопедии г. Минска. Образцы синовиальной жидкости (СЖ) собирали в стерильные центрифужные пробирки. Биоптаты синовиальной оболочки (СО) и суставного хряща (СХ) забирались в процессе эндопротезирования тазобедренного сустава и помещали в пробирки типа эппендорф с транспортной средой.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Полученные образцы синовиальной жидкости тестировались на наличие специфических антител классов IgM, IgA и IgG к различным инфекционным агентам – *C. trachomatis*, *Ch. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, вирусам семейства *Herpesviridae* (вирусу герпеса I-го и II-го типов, цитомегаловирусу, вирусу Эпштейн-Барр). Постановку реакций и оценку результатов проводили согласно прилагаемым к наборам инструкциям.

**Молекулярно-генетические исследования.** Детекцию ДНК *C. trachomatis* проводили с помощью ПЦР набора «АмплиСенс *Chlamydia trachomatis*-Eph». Наличие ДНК герпесвирусов определяли с использованием ПЦР наборов «АмплиСенс HSVI,II-EPh», «АмплиСенс CMV-EPh» и «АмплиСенс EBV-EPh» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Выявление ДНК *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* осуществляли методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией с использованием наборов «АмплиСенс *Mycoplasma genitalium*-FL», «РеалБест ДНК *Ureaplasma urealyticum*», «РеалБест ДНК *Mycoplasma hominis*».

**Электронная микроскопия.** Ультраструктурному анализу подвергались 20 образцов СЖ, 9 биоптатов СО, 9 биоптатов СХ, полученных в результате эндопротезирования тазобедренного сустава. Исследуемый материал

нарезали на серию из 20-40 фрагментов небольшого размера (до 1 мм<sup>3</sup>) и далее фиксировали в 2,5 % глутаровом альдегиде, приготовленном на 0.1 М какодилатном буфере (рН 7,4). После трехкратного промывания в буфере последующую фиксацию проводили 1% OsO<sub>4</sub>. Затем образцы промывали в том же буфере, обезвоживали этанолом возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), после чего дополнительно обрабатывали ацетоном и заливали смесью смолы марки Spurr (EM0300, Sigma). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме Ultracut E («Reichert», Австрия), контрастировали 1% уранилацетатом и лиммоноокислым свинцом и исследовали на микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при инструментальных увеличениях: x10 000- x100 000.

### **Результаты и их обсуждение.**

**Ультраструктурный анализ суставного хряща.** Электронно-микроскопические исследования показали, что во всех исследованных биоптатах тазобедренного сустава обнаруживались признаки нарушения клеточно-матриксной архитектоники. В хондроцитах I и II типа чаще отмечались как собственно дистрофические изменения, так и реже репаративно-восстановительные процессы. Ультраструктура клеток с грубыми дистрофическими проявлениями характеризовалась компактизацией ядрышка с потерей гранулярного компонента и исчезновением примембранного хроматина. В некоторых случаях отмечалась полная сегрегация гранулярного и фибриллярного компонента ядрышка. Внутриядерный хроматин был представлен плотными глыбками с перераспределением вдоль внутренней ядерной мембраны. Ядерные поры не просматривались. В цитоплазме обращали на себя внимание грубые изменения гранулярного эндоплазматического ретикулула с потерей рибосом и разбуханием цистерн. Цитоплазма заполнялась вакуолями за счет гиперплазии мембран аппарата Гольджи. Выявленные изменения указывали на частичное или даже полное блокирование белкового синтеза и гибели клеток по типу гидropической дистрофии.

Несколько другой тип изменений, который отмечался в 15% случаях, выявлен в хондроцитах, примыкающих к зонам деградации коллагенсодержащего матрикса. Цитоплазма этих хондроцитов характеризовалась повышенным содержанием вторичных лизосом и фаголизосом, заполняющих до 1/3 ее площади на фоне накопления микрофиламентов, образующих плотные тяжи. Митохондрии выглядели гиперхромными. Выявленные изменения указывали, с одной стороны, на активацию макрофагальной функции хондроцитов, а с другой – на снижение их секреторной и возможно коллагенообразующей функции.

Значительно реже (около 10%) отмечались хондроциты, в цитоплазме которых происходило накопление одиночных или множественных “липидсодержащие” включений.

Последние, могут быть связаны с аккумуляцией кальция и нарушением его клеточного обмена. Известно, что митохондрии хондроцитов принимают участие в активном транспорте кальция и минерализации внеклеточного матрикса [3]. Выявленные изменения на наш взгляд отражают процесс нарушения выхода кальция из клетки, что приводит в дальнейшем к ее “минерализации”.

**Ультраструктурный анализ биоптатов синовиальной оболочки.** При исследовании биоптатов синовиальной оболочки наблюдались очаги деструкции синовиальных клеток. Отмечены структурные признаки нарушения белкового и энергетического аппарата: расширение цистерн гранулярного эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи, набухание митохондрий преимущественно в “фибробластоподобных” (В-клетки) синовиоцитах.

Также визуализировались макрофагальные синовиоциты (А-клетки), содержащие значительное количество вакуолей и пиноцитозных везикул. Увеличивалось количество лимфоцитов, многие из которых находились в состоянии частичного разрушения. На срезах также отмечали локальные участки, содержащие фрагменты клеточного материала, образующиеся вероятно в результате клазматоза.

**Детекция инфекционных агентов в биоптатах синовиальной оболочки и клетках синовиальной жидкости.**

Ультраструктурное исследование биоптатов СО позволило в трех случаях верифицировать наличие бактериальных (*Mycoplasma sp.*) и вирусных агентов (вирусов семейства *Herpesviridae*). В одном случае выявлены специфические маркеры, характерные для микоплазменной инфекции. В цитоплазме синовиоцитов (преимущественно А-клеток) визуализировались многочисленные не сливающиеся друг с другом везикулы в виде “пузырей”. В подобных образованиях обнаруживались частицы плеоморфной (100-200 нм), округлой (200-250 нм), овальной (200-300 нм), палочковидной (250-400 нм) формы. Среди них различались также тельца, ограниченные унитарной мембраной и имеющие плотный внутренний матрикс, заполненный гранулярным материалом. По описанным признакам возбудитель отнесен к представителям семейства *Mycoplasmataceae*.

В двух других случаях в биоптате СО отмечались морфологические изменения, характерные для герпетической инфекции. Эти признаки не соответствовали типичной цитопатологической картине, связанной с образованием внутриклеточных телец Cowdry тип А или ядер в виде

“совиного глаза”, но характеризовались сложным морфологическим симптомо- комплексом. Отмечено очаговое нарушение целостности ядерной мембраны. В центральной части ядра визуализировались просветления, хроматин, как правило, располагался вдоль внутреннего слоя ядерной мембраны. У внутренней поверхности ядерной мембраны, а также в цитоплазме клеток прослеживались скопления мелкозернистого или крупнозернистого материала и обнаруживались электронно-плотные включения в виде “тутовой ягоды” с гранулярным материалом внутри. Также на срезах визуализировались клетки с сильно увеличенным ядром и наличием в цитоплазме миелиноподобных структур в виде петель или узелков.

В исследованных образцах СЖ только в 2 случаях удалось выявить частицы, которые по своим ультраструктурным особенностям соответствовали общему плану организации представителей семейства *Chlamydiaceae*. Характерной особенностью репродукции возбудителя было внутриклеточное накопление преимущественно мелких одиночных вакуолей с везикулярно-вакуолярными структурами внутри. В отдельных случаях внутри клетки визуализировались отдельные мелкие, электронно-плотные тельца диаметром 250-300 нм, ограниченные клеточной стенкой. Внутри протопласта сохранялась мелкозернистая цитоплазма, а в ней компактный осьmioфильный нуклеоид.

Проведенные дополнительно микробиологические исследования, включающие иммуноферментный анализ и ПЦР, показали наличие специфических антител и фрагментов нуклеиновой кислоты бактериальных и вирусных агентов. Методом ИФА в СЖ у 2 пациентов выявлены антитела класса IgA к *C. trachomatis* в титре 1:5 (положительный результат). Специфические IgG к МOMP (главный белок наружной мембраны) и плазмидному белку pgp3 *C. trachomatis* выявлены в 1 образце СЖ в титре 1:5. Иммуноглобулины класса М к *C. trachomatis* не были выявлены ни в одном из исследуемых образцов. Антитела класса IgG к *Ch. pneumoniae* выявлены в 1 случае IgG к вирусу простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типа определены у всех обследованных пациентов. У этих же пациентов выявлены специфические IgG к цитомегаловирусу (ЦМВ). При этом IgM к ВПГ 1 и 2 типу и ЦМВ не обнаруживались. Ни в одном из исследованных случаев не были обнаружены специфические иммуноглобулины класса IgM, направленные к капсидному антигену (VCA) или IgG к раннему антигену (EA) вируса Эпштейна-Барр.

Результаты ПЦР исследования показали наличие в синовиальной оболочке у 1 пациента ДНК цитомегаловируса. Специфический фрагмент нуклеиновой кислоты цитомегаловируса выявлен также у 2 пациентов в СЖ.

Другие патогены (ВПГ I-го и II-го типа, *Mycoplasma genitalium* в биоптатах синовиальной оболочки не были обнаружены). Возбудитель *C. trachomatis* был выявлен в 1 случае, вирус Эпштейна-Барр – в 4 исследованных случаях. В биоптатах суставного хряща только в 1 случае выявлен методом ПЦР возбудитель *C. trachomatis*.

Таким образом, на основании проведенных исследований впервые дана характеристика патоморфологических изменений в клетках синовиальной жидкости, биоптатах СО и СХ у пациентов с аваскулярным некрозом головки бедра. Методом электронной микроскопии показана возможность детекции в пораженной ткани суставов бактериальных и вирусных агентов, относящихся к различным классам и семействам. Полученные данные важны для понимания механизмов развития заболеваний опорно-двигательной системы человека и разработки стратегий профилактики и тактики этиопатогенетической терапии.

**Выводы.** Изменения хондроцитов и синовиоцитов отражают как процессы собственно дистрофии, так и внутриклеточные восстановительно-репаративные реакции в сохранившихся клетках, не вовлеченных в патологический процесс. Нарушения в синтезе коллагеновых волокон коррелирует с изменениями в ультраструктурной организации хондроцитов. Скрининговый поиск бактериально-вирусных антигенов выявил в ряде исследованных образцов такие патогены как *Mycoplasma* sp., вирусы семейства Herpesviridae, *C. trachomatis* и специфические антитела к ним. Дальнейшие исследования позволят выявить патогномичные звенья, ведущие к нарушению хондроцитами продукции коллагена и прояснить роль различных агентов в развитии дисбаланса в костно-хрящевой системе и прилегающей ей ткани.

### Литература

1. Нирнберг, Д. Идиопатический аваскулярный некроз головки бедра / Д. Нирнберг, М. Идельман, М. Штейн // Междунар. мед. журн. – 1998. – № 2. – С.179–182.
2. Проценко, Г.А. Асептический некроз костной ткани в ревматологии / Г.А. Проценко // Украинский ревматолог. журнал. – 2012. – № 3. – С.52–57.
3. Сустав: морфология, клиника, диагностика, лечение / И.Н. Павлова [и др.]. – Москва: Медицинское информационное агентство, 2011. – 552 с.
4. Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis / M. Kraan [et al.] // Arthritis Rheum. – 1998. – Vol.41. – P.1481–1488.
5. Detection of rubella, mumps, and measles virus genomic RNA in cells from synovial fluid and peripheral blood in early rheumatoid arthritis / D. Zhang [et al.] // J. Rheumatol. – 1997. – Vol. 24. – P. 1260–1265.
6. Geipel, U. Pathogenic organisms in hip joint infections / U. Geipel // Int. J. Med. Sci. – 2004. – Vol. 6, № 5. – P.234–240.

7. Infrequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis / M. Mousavi-Jazi [et al.] // J. Rheumatol. – 1998. – Vol. 25. – P. 623–628.