

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОНТРАКТУРЫ ДЮПУИТРЕНА ПО БИОХИМИЧЕСКОМУ СТАТУСУ STATUS LOCALIS

Осмоналиев И. Ж.¹, Микусев Г. И.¹, Байкеев Р. Ф.²

¹ГАОУЗ «Республиканская клиническая больница» МЗ РТ, Казань, Россия (420064, г. Казань, Оренбургский тракт, д.138) ikarkg-kaz@mail.ru, g.mikusew@mail.ru

²Казанский государственный медицинский университет, кафедра биохимии, Казань, Россия (420012, г. Казань, ул. Бултерова, д.49) baykeev@mail.ru

Контрактура Дюпюитрена (КД) – хроническое прогрессирующее рубцовое перерождение *aponeurosis palmaris*, сопровождающееся сгибательной контрактурой палкусевцев кисти. Особенностью идентификации КД является то, что еще с древних времен КД регистрируется, фактически, только по наличию нарушений функций *flexio* и *tensio* в области *metacarpophalangealis* и *interphalangealis* суставов кисти. Очевидно, что назрела необходимость принципиального изменения в диагностике КД. При выборе анализируемых морфо-биохимических параметров для идентификации КД в нашем исследовании исходили из генеза КД, относительной простоты их определения и возможности идентификации КД по данным биохимического анализа *in vivo*, что представляется возможным при использовании МРТ со спектроскопией высокого разрешения. Проведено исследование *status localis* при КД методом количественной гистохимии, ¹H-ЯМР спектроскопии высокого разрешения *in vivo*. Установлено, что идентификация прогноза КД *in vitro* возможна при регистрации площади сосудов (включая и стенку), жировой ткани в 78 %, а при измерении площади внутрисосудистого «молодого», «старого» и «старого» внесосудистого фибрина в 98 % случаев. Разработана перспективная биохимическая технология по диагностике КД в условиях *in vivo*. Неинвазивная идентификация КД по значению ¹H-ЯМР – релаксации T₂* возможна в 64 % случаев.

Ключевые слова: контрактура Дюпюитрена, биохимические изменения, ¹H-ЯМР спектроскопия, диагностика.

IDENTIFICATION OF DUPUYTREN'S CONTRACTURE BY BIOCHEMICAL STATUS OF STATUS LOCALIS

Osmonaliyev I. Zh.¹, Mikusev G. I.¹, Baikeev R. F.²

¹Autonomous State medical institution "Republican Clinical Hospital", Ministry of Health of the Republic of Tatarstan, Kazan., Russia (420064, Kazan, Orenburg tract, 138) ikarkg-kaz@mail.ru, g.mikusew@mail.ru

²Kazan State Medical University, Department of Biochemistry, Kazan, Russia (420012, Kazan, Butlerov street, 49) baykeev@mail.ru

Dupuytren's contracture (DC) – a chronic, progressive cicatricial degeneration of the *aponeurosis palmaris*, accompanied by flexion contracture of fingers. DC identifying feature is that from ancient times DC is recorded, in fact, only by the presence of disorders of *flexio* and *tensio* in *metacarpophalangealis* and *interphalangealis* joints. Obviously, there is a need of fundamental changes in the diagnosis of DC. When selecting the analyzed morphological and biochemical parameters to identify the DC in our study we came from genesis of DC, the relative simplicity of their revelation and the possibility of identifying the DC according to the biochemical analysis *in vivo*, which is possible by using MRI with high-resolution spectroscopy. The research of Dupuytren's contracture (DC) *status localis* using method of quantitative histochemistry and of high-resolution ¹H-NMR spectroscopy *in vivo* has been performed. It was found that the identification of DC diagnosis *in vitro* is possible after registration of blood vessels area square (including the wall), adipose tissue in 78%, and after measurement of the area of intravascular «young», «old» and «old» extra vascular fibrin in 98% of cases. Promising biochemical technology for the diagnostics of DC *in vivo* was developed. Non-invasive identification of DC by the results of ¹H-NMR - T₂* relaxation is possible in 64% of cases.

Key words: Dupuytren's contracture, biochemical changes, ¹H-NMR spectroscopy.

Введение

Контрактура Дюпюитрена (КД) – хроническое прогрессирующее рубцовое перерождение *aponeurosis palmaris*, сопровождающееся сгибательной контрактурой пальцев кисти. По определению McFarlane (1983), с момента создания комитета болезни Дюпюитрена, обра-

зованного в рамках Международной Федерации (1980), проблема КД заявила себя как всемирная. Болезнь Дюпюитрена составляет 20 % от всех заболеваний кисти у людей старше 65 лет. При рассмотрении с любой позиции главенствующим изменением при КД является стимуляция и пролиферация фибробластов, сопровождающиеся контрактурой пальцев кисти из-за утолщения коллагеновой основы *aponeurosis palmaris* и уменьшения его длины в целом.

Особенностью идентификации КД является то, что еще с древних времен КД¹ регистрируется, фактически, только по наличию нарушений функций *flexio* и *tensio* в области *metacarpophalangealis* и *interphalangealis* суставов кисти.

Очевидно, что назрела необходимость принципиального изменения в диагностике КД. При выборе анализируемых морфо-биохимических параметров для идентификации КД, в нашем исследовании исходили из генеза КД, относительной простоты их определения и возможности идентификации КД по данным биохимического анализа *in vivo*, что представляется возможным при использовании МРТ со спектроскопией высокого разрешения.

Цель исследования: идентифицировать диагноз КД по данным биохимического статуса *status localis* (морфометрия, проницаемость сосудов и динамический статус липидов) в зоне ладонного апоневроза (ЛА) при КД.

Материалы и методы исследования

Диагностика КД. Степень КД определяли в соответствии с классификацией А. П. Бейюл (1926) [2].

Объект исследования: 128 пациентов с КД (возраст 30–80 лет), контрольная группа – 7 клинически здоровых человека, возраст 29–45 лет, 17 *cadavera*.

Гистологическое исследование. Биопсийный материал – продольные тяжи рубцово-измененного ЛА (диагноз КД), 107 послеоперационных образцов, из них 89 мужчин в возрасте 34–79 лет и 18 женщин в возрасте 36–83 лет; степень КД – количество человек: I – 10, II – 32, III – 65; контрольная группа, *cadaver* материал – 17 образцов неизмененного ЛА (3 женщины в возрасте 45–60 лет и 14 мужчин возраст 30–65 лет). После общепринятой обработки материал заливался в парафин. Изготовленные на микротоме срезы окрашивались гематоксилин-эозином, пикрофуксином по ван Гизону и по пикро-Маллори в модификации, позволяющей идентифицировать «молодой», «зрелый» и «старый» фибрины [3]. Проводилось изучение ряда структурных компонентов тканей, при помощи морфометрической сетки случайного шага [1]: измерялась площадь паренхимы, стромы, кровеносных сосудов, жировой ткани, периваскулярного и перицеллюлярного отека, а также площадь различных видов

Примечание: ¹ – в сагах викингов 11 века имеется упоминание о 4 случаях заболевания сходного по описанию с контрактурой Дюпюитрена.

фибрина².

МРТ со спектроскопией ¹Н-ЯМР высокого разрешения. Использовали МР-томограф Vantage (XGV Exelart) с напряженностью магнитного поля 1,5 Т, катушку NV SPDR 7ch Head [9]. Зона исследования – область distalis palmaris кисти, в проекции продольного тяжа аponeurosis palmaris к пальцу. При анализе спектров определяли площадь сигнала, химический сдвиг (ppm), а для изотропной составляющей группы СН₂ вычисляли значение T₂^{*} (spin – spin relaxation) из значения Δν^{1/2} (рис. 1): 1. на середине высоты изотропного пика спектра СН₂ групп липидов биохимического компонента определяли ширину сигнала Δν^{1/2} ppm 2. Значения ppm переводили в Гц, исходя из расчета, что 3,5 ppm = 220Гц. Δν^{1/2} (Гц) = 1/(π · T₂^{*}), (π = 3,14), вычисляли значение T₂^{*} (с) = 1 / (π · Δν^{1/2}). 3. значение коэффициента величины T₂^{*} подставляли в полученное уравнение дискриминантного анализа.

Статистический анализ. Использовали непараметрические методы (Median, Mann-Whitney Test, коэффициент корреляции Spearman's), использовали метод дискриминантного анализа [6], с помощью табличного процессора Microsoft Excel 2002, и программу Statistica 6,0 (USA). Статистически достоверными принимали значения p ≤ 0,05.

Результаты исследований и их обсуждение

Адекватное понимание правильного подхода к курации КД должно основываться на том факте, что контрактура Дюпюитрена является доброкачественной фибропролиферативной опухолью, по МКБ 10 – фасциальный фиброматоз неизвестной этиологии (М 720). При исследовании взаимосвязи измеряемого параметра с идентификацией контрактуры Дюпюитрена в наших исследованиях значимые результаты получены при применении корреляционного (Spearman's, r) и дискриминантного анализа.

При этом мы исходили из того, что интерпретация изменения доли морфологических компонентов должна осуществляться на уровне функционирования органелл (ядро, митохондрии, аппарат Гольджи) и их молекулярных биохимических составляющих: вида белка, жира, углевода и т.д., которые будучи организованы в виде гистологических компонентов и определяют морфологические черты в зоне status localis, а выявление фибрина – прямой метод определения нарушения проницаемости сосудов кисти.

Регистрация in vivo химического состава зоны интереса ладонного аponeвроза является наиболее адекватным в плане неинвазивной диагностики КД. Ранее были проведены многочисленные морфологические исследования при КД. Гистологические исследования показали рост числа фибробластов. Главное биохимическое отклонение при КД – это увеличение

Примечание: ² – список сокращений: М – морфология, П – паренхима, С – строма, с – сосуды, Ж – жировая ткань, ПО – периваскулярный отек, По – перицеллюлярный отек; Ф – фибрин, ВМ – внутрисосудистый молодой, ВЗ – внутрисосудистый зрелый, ВС – внутрисосудистый старый, Вм – внесосудистый молодой, Вз – внесосудистый зрелый, Вс – внесосудистый старый.

соотношения коллагена тип III / тип I [4], при этом в коллагене I типа вместо пролина гидроксигированию подвергается лизин [8].

В наших исследованиях установлено, что отсутствовали системные изменения значений общей морфометрии при КД. Статистически значимые различия выявлены в содержании Ж при 1 и 3 степени КД (1 (16,9³) – 3 (3,9) ст. ($p = 0,05$)⁴). Выявлены незначительные величины коэффициентов корреляции (r), наличие КД – компонент морфометрии, значение (p): КД – С, $r = 0,223$ ($p = 0,021$), КД – с, $r = 0,241$ ($p = 0,007$), КД – По, $r = 0,246$ ($p = 0,006$).

Проницаемость сосудов. В проведенных ранее исследованиях показано, что в норме и при патологии вокруг клеток может откладываться фибрин [5]. Фибрин – конечный продукт свертывания крови – структурная основа кровяного сгустка, белок, образующийся из фибриногена (молекулярная масса 370 кДа, размер 10,0x15,8x11,0 (нм), концентрация в крови 2–3 г/л), под действием фермента тромбина. Экстравазальное отложение фибрина – это результат проникновения через сосудистую стенку и коагуляции плазменного фибриногена.

На сегодня разработана наиболее обобщенная схема генеза КД, объединяющая все состояния связанные с КД [7]. Иницирующим моментом является изменение состояния сосудов. Ряд генетических (в целом выделено 23 гена с повышенной или пониженной экспрессией при КД), возрастных факторов, факторов внешней среды (профессия, быт, прием алкоголя и т. д.) приводят к утолщению эндотелиальных клеток сосудов, ламинированию их базальных мембран, сужению просвета микрососудов в артериосклерозе. Возникающая локальная ишемия приводит к расщеплению АТФ на пуриновые основания, гипоксантин и ксантин; при участии ксантиндегидрогеназы и ксантиноксидазы образуется H_2O_2 и свободные радикалы O_2^- и OH^\bullet . Кислородные радикалы могут повреждать перicyты и приводить к их регенерации с последующим утолщением базальной мембраны и пролиферацией фибробластов.

В качестве прямого маркера при определении ожидаемого уменьшения проницаемости сосудов при КД и был использован фибрин.

Качественный анализ эволюции окраски внутрисосудистого и интерстициального фибрина позволяет дифференцировать срок инициации коагуляции: «молодой» < 6 часов, «зрелый» 6–24 часа, «старый» > 24 часа. При этом в тканях артериосклероза как в норме, так и при КД идентифицируются следующие виды фибрина: внесосудистый молодой, зрелый, старый; внутрисосудистый молодой, зрелый, старый.

Статистически значимые уменьшения отложения фибрина выявлены в содержании (вид фибрина, степень, %): ВМ 1 (0,05) – 2 (0,001) ($p = 0,047$), Вм 1 (0,002) – 2 (0,001) ($p =$

Примечание: ³ - Median, ⁴ - сравнение групп по Mann-Whitney Test.

0,034). Информативно определены коэффициент корреляции (r), КД – вид фибрина значение (p): 1. Слабая корреляция: КД – ВМ $r = 0,193$ ($p = 0,032$), КД – ВЗ $r = -0,201$ ($p = 0,025$), КД – ВС $r = -0,381$ ($p = 0,0001$); 2. Сильная отрицательная корреляция: КД – ВЗ $r = -0,705$ ($p = 0,0001$), КД – ВС $r = -0,784$ ($p = 0,0001$), что является молекулярным подтверждением пониженной проницаемости сосудов при КД.

^1H -ЯМР спектроскопия *in vivo*. Одним из регистрируемых параметров в ЯМР-спектроскопии *in vivo*, доступным непосредственно из вида спектра, является T_2^* (секунда): благодаря анализу частоты спада свободной индукции при помощи преобразования Фурье возникает возможность получения ЯМР-спектра с шириной линии $\Delta\nu^{1/2}$ (Гц) = $1 / (\pi \cdot T_2^*)$, где T_2^* – время поперечной (спин-спиновой) релаксации, которое определяется зависящими или независящими от времени локальными магнитными полями. В случае тканей ладони человека – от физико-химического состояния биохимических компонентов данного пациента: содержания воды, ионов, кислорода, степени ненасыщенности липидов и т.д.

При сочетании МРТ со спектроскопией высокого разрешения, в частности, на ядрах ^1H возможна регистрация T_2^* в условиях целостного организма, неинвазивно, в области конкретной анатомической локализации.

На рис. 1 представлен типичный ^1H -ЯМР спектр высокого разрешения области *distalis palmar rimula* кисти, полученный с помощью МР томографа, с обозначением химического сдвига CH_2 , CH_3 групп, ширины сигнала на половине высоты части CH_2 спектра ($\Delta\nu^{1/2}$), по которой вычисляется значение T_2^* .

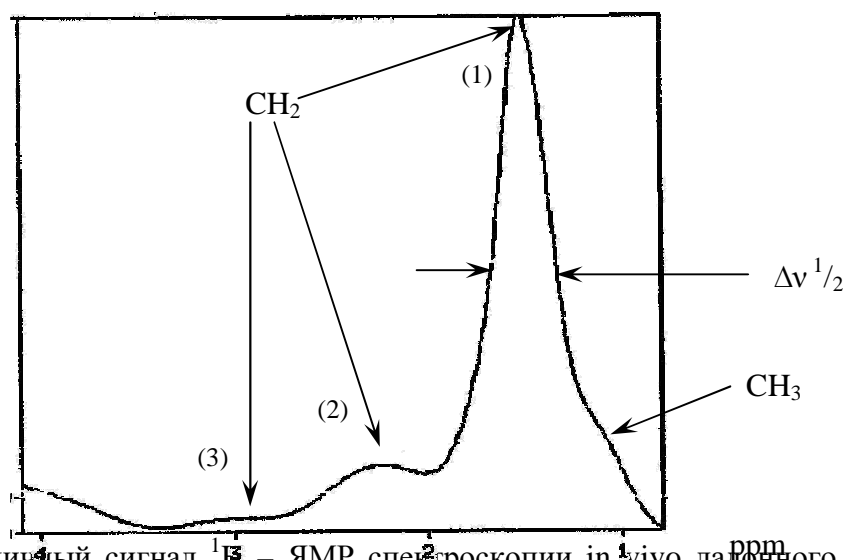


Рис. 1. Типичный сигнал ^1H – ЯМР спектроскопии *in vivo* ладонного апоневроза в зоне области *distalis palmar rimula* кисти. Пояснение в тексте

Статистически значимые различия при сравнении клинических групп не выявлены ($p > 0,05$) для T_2^* (секунда), S (условная единица), $\text{CH}_{2,(1)}$ (ppm), $\text{CH}_{2,(2)}$ (ppm), $\text{CH}_{2,(3)}$ (ppm), CH_3

(ppm). Выявлены умеренные коэффициенты корреляции (r), КД – параметры ^1H – ЯМР-спектроскопии, значение (p): КД – CH_2 (3) $r = -0,547$ ($p = 0,010$), КД – T_2^* , $r = -0,478$ ($p = 0,009$).

Очевидно, что конечной задачей всякого медицинского исследования является его прикладное значение в медицине. Полученные данные, в результате дескриптивной статистической обработки в частности Median, Mann-Whitney Test, коэффициент корреляции Spearman's, не позволяют диагностировать КД, т.к. они не предоставляют четких критериев по идентификации КД. Данным недостатком не обладает дискриминантное уравнение.

Дискриминантный анализ позволил идентифицировать КД по данным морфологии, интенсивности отложения фибрина в сосудах и экстравакуляро, а также по данным ^1H -ЯМР спектроскопии in vivo (Таблица №1).

Таблица №1

Идентификация контрактуры Дюпюитрена (КД) по данным морфометрии, депозиции фибрина и ^1H - ЯМР спектроскопии высокого разрешения in vivo.

№	Обсчитываемые факторы; клиническая группа (число человек)	Уравнение каноникальной дискриминантной функции (КДФ)	p	Значение КДФ как критерия для диагноза КД	Точность классификации, %
1.	Морфометрия; контроль (17), КД (107)	$\text{КДФ} = -0,019 - 0,277 \times \text{сосуд} + 0,068 \times \text{жировая ткань}.$	0,0001	$\leq -0,166$	78
2.	Фибрин; контроль (17), КД (107)	$\text{КДФ} = -0,917 - 0,772 \times \text{внутрисосудистый «молодой»} + 0,507 \times \text{внутрисосудистый «старый»} + 0,653 \times \text{внесосудистый «старый»}.$	0,0001	$\leq -0,936$	98
3.	Морфометрия + фибрин; контроль (17), КД (107)	$\text{КДФ} = -0,680 - 0,092 \times \text{сосуд} - 0,885 \times \text{внутрисосудистый «молодой»} + 0,554 \times \text{внутрисосудистый «старый»} + 0,651 \times \text{внесосудистый «старый»}.$	0,0001	$\leq -0,954$	98
4.	^1H - ЯМР спектроскопия in vivo; контроль (7), КД (21)	$\text{КДФ} = -3,373 + 0,242 \times T_2^*$	0,008	$\leq -0,313$	64

Оценку уравнений данного анализа осуществляли по 3 критериям: 1) простота уравнения; 2) его статистическая достоверность; 3) точность классификации – доля пациентов, описываемых соответствующим уравнением.

Все уравнения достаточно просты и статистически достоверны (№ 1–4, таблица 1).

Дискриминантный анализ исключил из рассмотрения несущественные параметры. Морфометрия позволяет идентифицировать КД по доле площади сосудов (включая толщину

стенки) и жировой ткани в 78 % случаев (№ 1, таблица 1). Определение отложения фибрина более надежный критерий – регистрация комбинаций VM, VC и Vc повышает точность классификации до 98 % (№ 2, таблица 1). Комбинация морфометрии с регистрацией доли фибрина увеличивает число членов уравнения с 3 до 4, но не повышает точность классификации – 98 % (№ 3, таблица 1).

Точность классификации КД по данным ^1H -ЯМР спектроскопия *in vivo* составляет 64,28 %, что ниже, чем регистрация депозиции фибрина или морфометрии, однако прикладное значение несопоставимо выше. Фактически, удалось идентифицировать КД неинвазивно по биохимическому статусу *status localis* в самом широком спектре ее развития, охватывая случаи 1–3 степени.

Показательно, что предметом информативности является не корпускулярный (молекулярный) параметр, а величина T_2^* , отражающая динамическое состояние CH_2 групп в структуре липидов жировой ткани. При этом жировая ткань фигурирует и в уравнении, основанном на данных морфометрии (№ 1, таблица 1), т.е. причинно-следственная связь КД – жировая ткань выявила закономерность, как на уровне изменения ее количества, так и качества, т.к. T_2^* прямой показатель физико-химического состояния конкретного магнитно-резонансного регистрируемого атома. Данный факт напрямую отражает цепь событий, имеющих место при КД: генерация свободных радикалов при КД оказывает прямое воздействие на состояние липидов в жировой ткани, в частности, вызывает перекисное окисление липидов [10], приводящее к замедлению их динамических характеристик, как отдельных химических групп CH_2 , CH_3 , так и к замедлению самодиффузии молекул в целом, что приводит к нарастанию ригидности тканей подкожной жировой клетчатки и уплотнению, наряду с апоневрозом, и других анатомических структур, в итоге – к контрактуре кисти.

Заключение

1. Проведенное исследование, основанное на регистрации интегральных морфо-биохимических параметров (доля сосудов и жировой ткани, депозиция фибрина), подтверждает количественную связь в изменении их содержания с диагнозом КД. Идентификация диагноза КД *in vitro* возможна при регистрации площади сосудов (включая и стенку), жировой ткани в 78 %, а при измерении площади внутрисосудистого «молодого», «старого» и «старого» внесосудистого фибрина – в 98 % случаев.

2. Разработана перспективная биохимическая технология по диагностике КД в условиях *in vivo*. Неинвазивная идентификация КД по значению ^1H -ЯМР-релаксации T_2^* возможна в 64 % случаев.

Список литературы

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Бюл А. П. Дюпюитреновская контрактура, ее патогенез // Новая хирургия. – 1926. – Т. 1. – С. 83–102.
3. Зербино Д. Д., Лукаевич Л. Л. Методика для определения «возраста» фибрина при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови // Архив патологии. – 1984. – № 8. – С. 72–75.
4. Bazin S. Biochemistry and histology of the connective tissue of Dupuytren's disease lesions / S. Bazin, M. Le lous, V.C. Duance et al. // Eur. J. Clin. Invest. –1980. – № 10. – P. 9–16.
5. Colucci M. Procoagulant activity of sarcoma with different metastatic potential / M. Colucci, M. Giavazzi, G. Alessandri // Blood. – 1981. – Vol. 57. – № 3. – P. 733–735.
6. Mendehall W. A second course in statistics: regression analysis / W. Mendehall, T.L. Sincich // Prentice Hall. – 1996. – P. 899.
7. Murreli G.A.C. Oxygen free radicals and Dupuytren's disease - Patobiochemistry and clinical management / G.A.C. Murreli, M.J.O. Francis. – Springer Verlag. Berlin,1993. – P. 227–234.
8. Notbohm H. Comperative study on the thermostability of collagen I of skin and bone: Influence of posttranslational hydroxylation of prolyl and lysyl residues / H. Notbohm, S. Mosler, M. Bodo et al. // J. Protein Chem. – 1992. – № 11. – P. 635–643.
9. TOSHIBA MEDICAL SYSTEMS. Vantage Exelart series / TOSHIBA MEDICAL SYSTEMS CORPORATION 2003-2006, All rights reserved. P. 615.
10. White MJ. Oxygen free radicals and wound healing / MJ. White, FR. Heckler // Clinics in Plastic Surgery. – 1990. – № 17. – P. 473–484.

Авторы выражают благодарность профессору КГМУ д.м.н. Д. Э. Цыплакову за техническую помощь при выполнении гистохимических исследований тканей.

Рецензенты:

Скворцов Алексей Петрович, д.м.н., доцент кафедры травматологии и ортопедии ГБОУ ДПО КГМА Минздравсоцразвития России, г. Казань.

Панков Игорь Олегович, д.м.н., доцент кафедры травматологии и ортопедии ГБОУ ДПО КГМА Минздравсоцразвития России, г. Казань.