

Взгляд на патогенез гиперпаратиреоза как на проблему роста отдельных клонов клеток паращитовидной железы

(к вопросу об обосновании сроков начала превентивного лечения вторичного гиперпаратиреоза при почечной недостаточности)

А.И. Новиков

НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ

An Approach To The Problem Of Renal Hyperparathyroidism, As To A Disorder Of Growth Of The Separate Parathyroid Cell Clones

(an implication for the early preventive treatment of hyperparathyroidism in chronic renal failure)

A.I. Novicov

Ключевые слова: гиперпаратиреоз, моноклональная аденома, скорость роста, хроническая почечная недостаточность.

Целью работы явилось измерение скорости роста аденомы паращитовидной железы по экспрессии ядерного антигена пролиферации Ki-67 при хронической почечной недостаточностью (ХПН). Исследованы материалы историй болезни и патоморфологии паращитовидных желез 14 больных в возрасте $41,62 \pm 14,15$ г., которым через 5-7 лет после начала лечения гемодиализом (ГД) была произведена тотальная паратиреоидэктомия. Во всех случаях операция сопровождалась реимплантацией самой маленькой из удаленных паращитовидных желез в ткань грудино-ключично-сосцевидной мышцы. Показатели пролиферации клеток паращитовидной железы рассчитывались по частоте экспрессии Ki-67, способного сохраняться в ядрах клеток тканей, фиксированных формалином и залитых в парафин. По числу Ki-67 положительных клеток на 10000 гистохимически «отрицательных» (label index, LI) и, исходя из того, что Ki-67 антиген держится на поверхности мембраны ядра клетки в течение 24 часов до момента ее вступления в фазу митоза и деления, были рассчитаны средняя продолжительность жизни клеток ($100/LI \times 3,65$ г) и их рождаемость в %/год ($LI/(10000) \times 365/10000 \times 100 = LI \times 3,65$). Установлено, что скорость удвоения малых клонов клеток паращитовидной железы составляет от 8,3 до 30 лет, что не позволяет во многих случаях рассматривать моноклональную аденому как моноклональную в строгом смысле слова. Полученные данные позволяют допустить, что большие аденомы паращитовидной железы происходят не из единственной клетки-прародительницы, а возникают вследствие слияния нескольких клонов меньшего размера, которые за все время заболевания успевают сделать 2-3 последовательных деления. Из полученных данных о минимальном времени удвоения клона клеток паращитовидной железы и медленном росте аденомы следует, что профилактику вторичного гиперпаратиреоза кальцитриолом или 1-альфа-гидроксихолекальциферолом целесообразно начинать минимум за 8,3 г. до предполагаемого начала диализа. Соответственно лечение и профилактику гиперпаратиреоза следует начинать на самой ранней стадии ХПН.

The aim of this study was to estimate the parathyroid cells proliferation rate according to the expression of Ki-67 antigen. We retrieved embedded tissue blocks of parathyroids removed at surgery from 14 dialysis patients. New sections were cut and examined for expression of Ki-67, a cell-cycle marker, using MIB-1 antibody with antigen retrieval, and tonsil or thymus as positive control. Using an eyepiece graticule with unbiased square-counting frame, positively labeled chief cells were counted and the prevalence of Ki-67 positive cells per 10^4 cells (label index or LI) was calculated. Label index converted to cell birth rate assuming that the duration of Ki-67 expression was 24 hours. With this assumption mean cell birth rate [%/year] and corresponding cell life span [years] were calculated (mean cell birth rate [%/year] = $LI(10000) \times 365/100000 \times 100 = LI \times 3,65$; and cell life span [years] = $100/LI \times 3,65$). Our calculations confirmed the point that parathyroid cell growth is very slow. We suggest that it is reasonable to start the preventive treatment with phosphate- binders and calcitriol (1-alfa-hydroxycholecalciferol) minimum for 8,3 years before the start of dialysis treatment.

*Адрес для переписки: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1, НИИ Трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ
Телефон: (095) 193-88-33. Новиков Андрей Ильич*

В обзоре, опубликованном нами ранее [3], обсуждались современные представления о патогенезе гиперпаратиреоза (ГПТ). Согласно одному из них проблема этого заболевания может рассматриваться как проблема нарушения скорости пролиферации основных клеток паращитовидной железы [13]. Эта точка зрения обсуждается как альтернативная концепции Bricker [4, 5], господствовавшей в течение последних трех десятилетий.

Как известно, в основу гипотезы Bricker были положены представления о том, что при хронической почечной недостаточности (ХПН) главным стимулом в развитии ГПТ является гипокальциемия, которая возникает в ответ на гиперфосфатемию, связанную с ретенцией фосфатов [4, 5, 6]. Развитие этого представления привело далее к устойчивым взглядам, согласно которым: 1) При ХПН возникает патологическая фенотипическая модуляция рецепторов к ионизированному кальцию на поверхности клеток паращитовидной железы. Как следствие, увеличивается секреторная set-point, и клетки паращитовидной железы начинают высвобождать ПТГ в ответ уже не только на низкую, но и на нормальную концентрацию ионизированного кальция в крови больного [7]. 2) Снижение концентрации в крови $1,25(\text{OH})_2$ дигидрокси-холекальциферола и увеличение концентрации фосфатов, свойственные ХПН, сами по себе являются прямыми стимуляторами синтеза ПТГ [4, 5, 6]. 3) Наконец, при почечной недостаточности, особенно в терминальной ее стадии, устанавливается резистентность к действию ПТГ, что отчасти происходит из-за изменения молекулярной структуры и количества рецепторов к этому гормону на поверхности клеток органов-мишеней (кость, кишечник и другие), что кардинально изменяет гомеостаз кальция [3, 4].

Эти представления легли в основу широкого клинического применения у гемодиализных пациентов фосфор-связывающих препаратов и кальцитриола. В результате удалось добиться более благоприятного течения ренальных остеодинострофий. Однако это не уменьшило остроту проблемы ГПТ. Паратиреоидэктомии больным, длительно получающих гемодиализ (ГД), выполняются относительно часто. Таким образом, проблема ГПТ и, в частности, закономерностей роста паращитовидных желез при ХПН остается в центре внимания исследователей. Одной из актуальных сторон этой проблемы является вопрос о скорости пролиферации клеток паращитовидных желез.

Целью настоящей работы явилось измерение скорости роста аденомы паращитовидной железы по экспрессии ядерного антигена пролиферации Ki-67 у больных, страдающих ХПН.

Материал и методы исследования

При выполнении работы были изучены истории болезни и результаты патоморфологических исследований паращитовидных желез 14 ГД-больных, которым в период с 1987 по 1996 г. была произведена паратиреоидэктомия. Возраст больных находился в диапазоне от 17 лет до 61 года (в среднем $41,6 \pm 14,2$ г.). Все больные были оперированы на 5-7 году лечения ГД; произведена тотальная паратиреоидэктомия с реимплантацией самой маленькой из удаленных паращитовидных желез

в ткань грудинно-ключично-сосцевидной мышцы.

Удаленная ткань железы была фиксирована нейтральным формалином и залита в парафин по общепринятой методике. Срезы с архивированных парафиновых блоков обрабатывались с целью выявления антигена пролиферации Ki-67.

Каждый отдельный клон клеток паращитовидной железы был морфометрирован с целью расчета размеров клеточного клона, числа клеток в клоне и вероятности выявления Ki-67 антигена. Всего было измерено 157 отдельных клеточных клонов.

Гистохимическая методика выявления антигена Ki-67

Известно, что Ki-67 антиген может быть выявлен в ядрах препаратов тканей, залитых в парафин много лет назад. Он замечателен тем, что появляется на поверхности ядра в синтетическую фазу S-митотического цикла и исчезает после полного завершения митоза. В среднем антиген Ki-67 держится на поверхности ядра клеток паращитовидной железы в течение 24 часов, что позволяет рассчитать их рождаемость и продолжительность жизни. Время сохранения Ki-67 антигена на поверхности ядерной мембраны не зависит от возраста, пола, расы, а также сроков хранения парафиновых блоков [10].

Принцип гистохимической реакции выявления Ki-67 антигена состоит в том, что после прогревания в микроволновой печи с целью разрушения ядерной мембраны препараты обрабатываются MIB-1 антителами (Immunotech, Inc., Cat. № 0505) с последующим выявлением мест преципитации антител биотин-стрептавидиновым методом.

Методика: парафиновые срезы толщиной 5 мкм после депарафинирования обрабатывались в течение 5 мин. 3% раствором перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы и прогревались далее в течение 5 мин. в 10мМ цитратном буфере при pH 6,0 в микроволновой печи мощностью 1080 W с целью дефрагментации ядерной мембраны. После 15-минутного охлаждения до комнатной температуры срезы обрабатывались 5% конской сывороткой в течение 40 мин. и далее инкубировались в течение ночи при температуре 4°C с 1:100 MIB-1 моноклональными антителами (Immunotech, Inc., Cat. № 0505). Затем следовали 30-минутная обработка биотинилированным конским IgG, после чего – 60-минутная инкубация с конъюгированным с пероксидазой стрептавидином. Наконец, места гистохимической реакции проявлялись путем 5-минутной инкубации в растворе 3-амино-9-этилкарбазола (AEC, Sigma, Poole, UK). При положительной реакции на Ki-67 антиген возникало интенсивное грязное желто-коричневое прокрашивание всего ядра клетки, причем в ряде случаев окраска могла выходить и за его пределы. При неполном или слабом прокрашивании ядра и цитоплазмы реакция оценивалась как отрицательная. В нашей работе в качестве положительного гистохимического контроля при реакции на Ki-67 антиген использовался парафиновый срез ткани миндалина или тимуса, которые, будучи герминационными центрами лимфоидной ткани, всегда богаты делящимися, то есть Ki-67 антиген-положительными,

клетками.

Гистоморфометрия препаратов и расчет индекса мечения клеток паращитовидной железы (label index, LI): клетки паращитовидной железы человека делятся относительно редко, и средняя продолжительность их жизни в норме составляет приблизительно 20 лет [11, 12, 13, 16]. При патологических состояниях вероятность деления этих клеток может в несколько раз увеличиваться, но деление доброкачественных клеток никогда не носит взрывного характера, как это, например, происходит при раке паращитовидной железы. Последний является редким заболеванием и практически никогда не осложняет течение терминальной ХПН.

Анатомически ткань паращитовидной железы можно разделить на отдельные клоны клеток. При планировании исследования мы исходили из гипотезы, согласно которой каждый клеточный клон формируется из одной материнской клетки. Кроме того, известно также, что в паращитовидной железе человека разные клеточные клоны различаются как по своей функциональной и пролиферативной активности, так и по размерам [4]. С целью выяснения связи между этими тремя характеристиками в настоящей работе были рассчитаны размеры клонов и скорость их роста. Для получения более достоверных результатов скорость роста каждого клеточного клона, доступного для изучения в данной серии препаратов, была соотнесена с его размерами.

Морфометрия производилась при помощи окулярных сеток [1, 17]. При этом измерялась площадь поперечного сечения клеточного клона, из которой исключалась площадь области склероза, кальцификатов или жировой ткани. Количество клеток паращитовидной железы на 1 мм² собственно железистой ткани пересчитывалось на площадь поперечного сечения одного клона, что позволяло судить об общем числе клеток в этом сечении. Далее при большом увеличении (объектив 40, окуляр 15) подсчитывалось общее количество Ki-67 антиген-положительных клеток на всей поперечной поверхности клона. Таким образом оказывался возможным расчет индекса мечения (label index, LI), то есть количества Ki-67 антиген-положительных клеток на 10000 клеток ткани паращитовидной железы.

Определение рождаемости и продолжительности жизни клеток паращитовидной железы и расчетного времени роста клеточного клона: принимая во внимание, что Ki-67 антиген сохраняется на поверхности мембраны ядра клетки в течение 24 часов до ее вступления в фазу митоза и деления, продолжительность жизни клеток, то есть промежуток времени между двумя последовательными митозами, может быть рассчитана как

$$10000 / LI \times 365,$$

где LI – индекс мечения, 10000 – стандартное количество клеток ткани паращитовидной железы, используемое при расчете LI, 365 – число дней в году.

Соответственно, показатель рождаемости клеток может быть рассчитан как:

Рождаемость (%/год) = LI × 3,65, где 3,65 – коэффициент пересчета.

Согласно законам формальной логики, необходимо было бы сделать поправку на величину естественной убыли клеток. Однако в литературе мы не нашли указаний на возможность выявления в паращитовидной

железе признаков апоптоза, то есть генетически детерминированной смерти клетки. Более того, по данным Belezikian [4], вероятность такой смерти клеток паращитовидной железы низкая. Поэтому при расчете указанных выше показателей мы сочли возможным не делать поправки на естественную убыль клеток.

Для обсуждения полученных результатов мы ввели дополнительную переменную – расчетное условное время роста клона или моноклональной аденомы, под которым понимали условное время, необходимое для роста клона минимальных размеров до величины самого большого клона, допуская при этом, что они растут из одной и той же материнской клетки. При расчете этой переменной исходили из следующих соображений: если все измеренные клоны расположить в последовательность, началом которой является клон с минимальным числом клеток (N_1), а окончанием – клеточный клон с максимальным числом клеток (N_m), то указанная последовательность имеет вид:

$$N_1 < N_2 < N_3 < \dots < N_{m-1} < N_m.$$

Зная среднюю продолжительность жизни клеток в каждом из клонов (t_m), можно рассчитать время роста клона N_{m-1} до величины следующего клона N_m . Это время (τ_m) может быть рассчитано как:

$$\tau_m = [(N_m - N_{m-1}) / N_m] \times t_m,$$

где N – число клеток в клоне.

Расчетное условное время (T_m) роста клона с числом клеток N_m рассчитывалось как

$$T_m = \tau_1 + \tau_2 + \tau_3 + \dots + \tau_{m-1} + \tau_m$$

Таким образом, между членами последовательностей:

$$N_1 < N_2 < N_3 < \dots < N_{m-1} < N_m$$

$$\tau_1; \tau_2; \tau_3; \dots; \tau_{m-1}; \tau_m \text{ и}$$

$$T_1 < T_2 < T_3 < \dots < T_{m-1} < T_m$$

существует взаимно однозначная связь, то есть каждому члену одной из последовательностей соответствуют один и только один член другой последовательности.

Порядок расчета количества клеток N_m в отдельном клоне: подсчет общего числа клеток в одном клоне позволяет оценить справедливость гипотезы, согласно которой скорость роста клона (или моноклональной аденомы) паращитовидной железы является функцией общего числа клеток в клоне [11, 12, 13]. При микроскопии препарата паращитовидной железы исследователю не может непосредственно подсчитать общее число клеток в клоне, так как в плоском препарате видны только клетки, случайно попавшие в поперечный срез. Для подсчета общего количества клеток в одном клоне необходимо знать его геометрическую форму. Если допустить, что это выпуклое тело (сфера, сплюснутый или вытянутый эллипсоид), то расчеты могут быть выполнены, исходя из известной связи между средней площадью поперечного сечения и объемом геометрического тела [17].

Объем клона = $\beta \times$ (средняя площадь поперечного сечения)^{3/2}, где β – коэффициент пересчета, который для сферы, вытянутого и сплюснутого эллипсоида равен соответственно 1, 38; 1, 58; 1, 55 [17].

Мы исходили из того, что форма клеточного клона, особенно молодого, то есть клона малых размеров, может быть подобна форме выпуклого тела, промежуточного между шаром, вытянутым или сплюснутым

эллипсоидом. Поэтому мы полагали, что коэффициент β может быть вычислен как среднее арифметическое из коэффициентов для трех названных выше геометрических тел: $\beta = (1,38 + 1,58 + 1,55) / 3 = 1,503$.

Таким образом, количество клеток N_m в отдельном клоне рассчитывалось по формуле: $N_m = 1,503 \times n^{3/2}$, где n_m – число клеток на поперечном срезе отдельного клона.

Зная общее число клеток, можно легко рассчитать число удвоений гипотетической материнской клетки в клоне как $n = \log_2 N_m$ (логарифм с основанием 2 используется в связи с тем, что $N_m = 2^n$).

Результаты исследований

Показатели пролиферации клеток – Л, рождаемость и продолжительность их жизни – были рассчитаны для 157 клонов и соотнесены с расчетной величиной времени роста клеточного клона, а также с общим количеством клеток в соответствующем клоне.

При анализе типов статистического распределения обсуждаемых переменных оказалось, что нормальный тип распределения был присущ только плотности клеток на 1 мм² случайного поперечного среза клона. Что же касается количества клеток на этом срезе, расчетного общего числа клеток в клоне, индекса мечения (L), продолжительности жизни и рождаемости клетки,

то эти переменные имели асимметричный, близкий к логарифмически-нормальному типу распределения¹.

Результаты исследований представлены на рисунках 1–5.

На рис. 1 в логарифмических осях отражена зависимость числа клеток в клоне от расчетного времени его роста, то есть от условного времени (в годах), необходимого для роста минимального из измеренных клонов до размеров каждого из других измеренных клонов, при допущении, что единственным источником роста последних был клон минимальных размеров. Видно, что указанная зависимость имеет S-образную форму. Точки излома полученной функциональной кривой, а именно точки A, A₁, B, C, D мы использовали для деления групп клонов по их величине. Соответственно все 157 клонов разделились на 5 групп: группу 1 – очень маленьких клонов (черные точки); 2 – малых клонов (полые кружки); 3 – «смешанную» группу клонов (светлые квадраты); 4 – моноклональные аденомы средних размеров (светлые треугольники) и группу 5 – большие моноклональные аденомы. (черные треугольники)².

Как видно на рис. 1, расчетное, условное время роста для очень больших аденом превышало 1000 лет. Поэтому на следующем этапе анализа мы выделили только те случаи, в которых время роста было не более 145 лет.

На рис. 2 представлены результаты регрессионного анализа, из которого следует, что для каждой из выде-

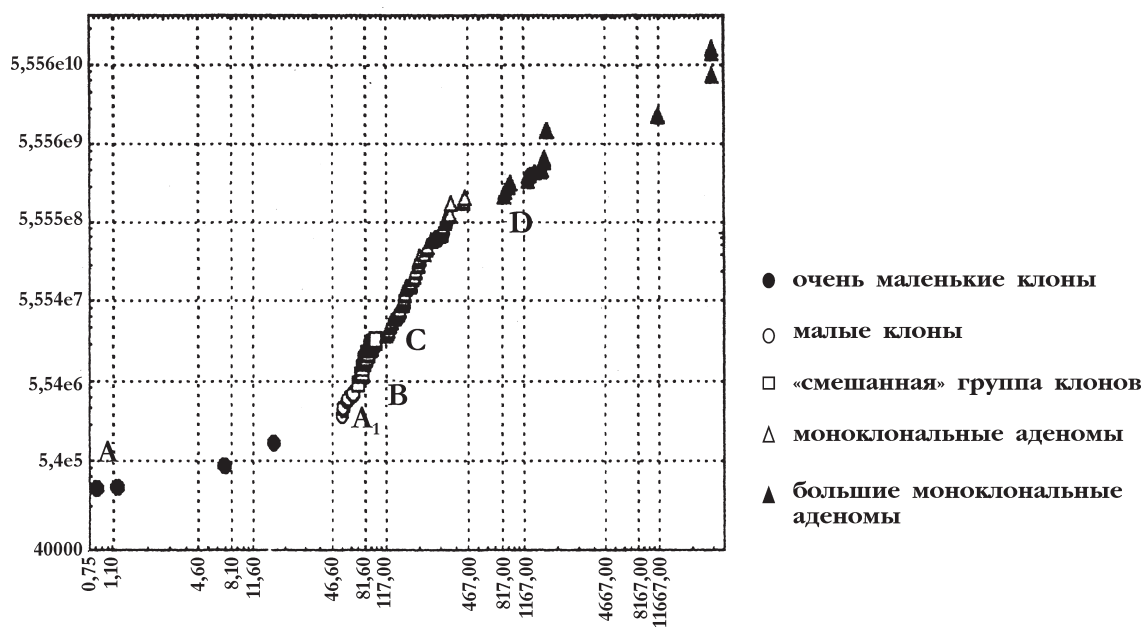


Рис. 1. Зависимость численности отдельного клеточного клона паразитовидной железы от величины расчетного времени его роста.

По оси ординат: численность отдельного клеточного клона [число клеток].

По оси абсцисс: t – расчетное время роста отдельного клеточного клона [годы].

Условные обозначения этих групп клеточных клонов и названия этих групп переносятся на остальные рисунки, относящиеся к этой публикации

¹ Логарифмически-нормальный закон распределения имеет место в случае, когда случайная величина формируется под действием большого числа случайных независимых факторов, причем воздействие каждого из них «равномерно незначительно» и равновероятно по знаку, а характер воздействия мультипликативный. Таким образом, случайный прирост, обусловленный действием каждого фактора, пропорционален уже достигнутому к этому моменту значению. Это означает, что при воздействии фактора на величину «а» образуется величина $a + \Delta \times a$. Именно это и отличает логарифмически-нормальный тип распределения от нормального (Гауссовского), где характер воздействия случайных факторов носит аддитивный характер, то есть при воздействии фактора на величину «а» образуется величина $a + \Delta$. В обоих случаях коэффициент Δ относительно мал и равновероятен по знаку [2].

² Во всех рисунках использованы одинаковые условные обозначения групп.

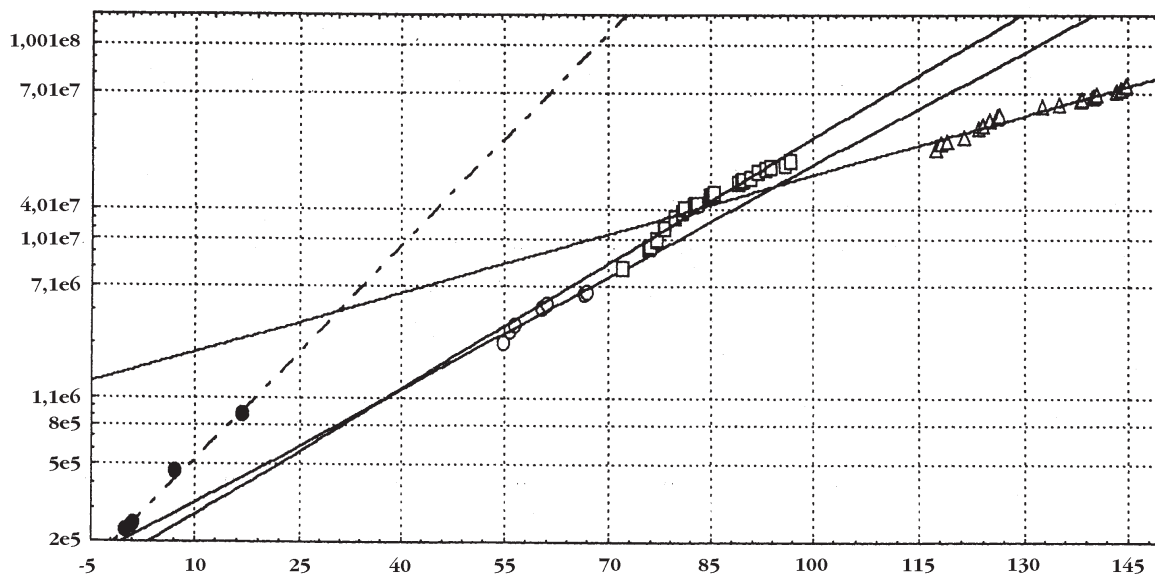


Рис. 2. Зависимость между численностью клеточного клона и временем его роста.

По оси ординат: численность отдельного клеточного клона [число клеток].

По оси абсцисс: t – расчетное время роста отдельного клеточного клона [годы].

Уравнения регрессии:

Группа очень маленьких клонов = $2,319 \times 10^5 \exp(0,084t) + \text{eps}$

Группа малых клонов = $2,061 \times 10^5 \exp(0,044t) + \text{eps}$

«Смешанная» группа клонов = $1,702 \times 10^5 \exp(0,049t) + \text{eps}$

Группа моноклональных аденом = $1,49 \times 10^6 \exp(0,023t) + \text{eps}$

Результаты регрессионного анализа были использованы для расчета времени удвоения клеточных клонов

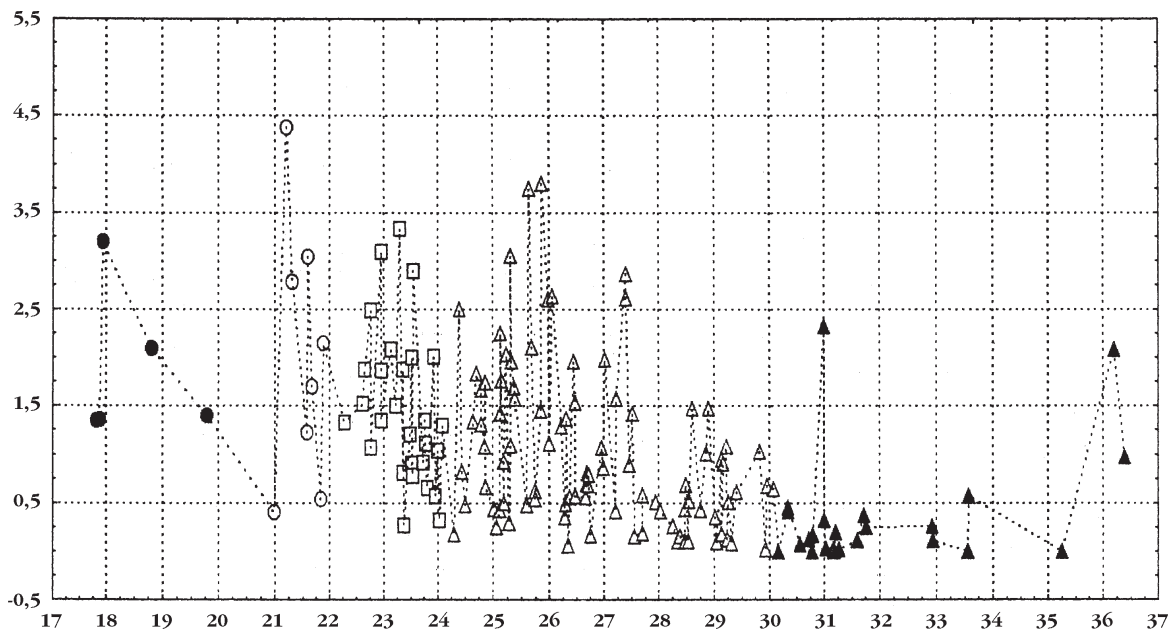


Рис. 3. Зависимость величины индекса мечения от количества клеток в клоне.

По оси ординат: индекс мечения или Label Index.

По оси абсцисс: \log_2 (число клеток в клоне (или в аденоме))

ленных групп клонов существует своя регрессионная зависимость. По уравнению регрессии было рассчитано время удвоения клона³. Оказалось, что в группе очень маленьких клонов время удвоения составляет 8,3 г, в группе малых клонов – 15,7 г, в «смешанной» группе клонов – 14,15 г, а в группе моноклональных аденом

оно достигает 30,14 г. Эти результаты позволяют заключить, что пролиферативная активность в ткани паращитовидной железы очень низкая, и период удвоения клеточного клона находится в диапазоне от 8 до 30 лет. Следовательно, реально представить, что в течение болезни, продолжающейся около 20 лет, возможны только

³ Функциональная зависимость между размерами клона и временем его роста имела вид экспоненты $N = N_0 \exp(k \times t)$, где N - число клеток в клоне, k - коэффициент регрессии, t - время. Следовательно, время удвоения равно $T_{\text{удвоения}} = (1/k) \times \ln 2$.

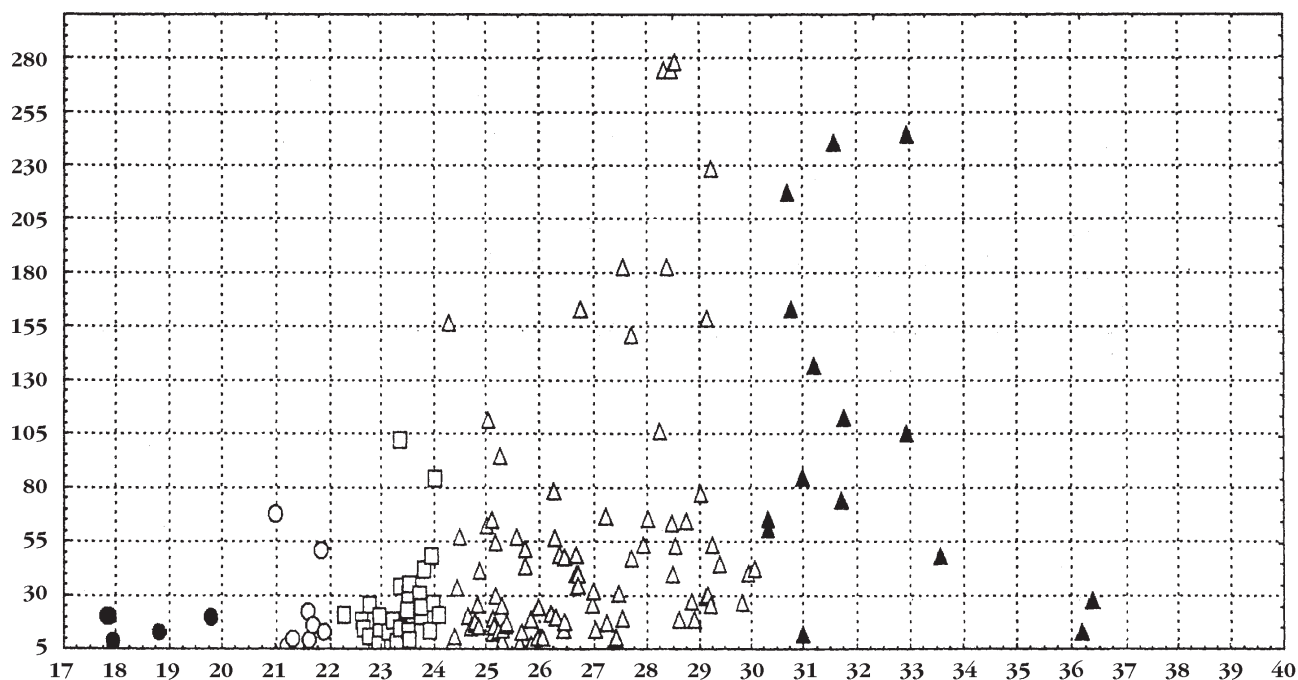


Рис. 4. Зависимость продолжительности жизни клеток паразитовидной железы от числа удвоений гипотетической клетки прародительницы клона.

По оси ординат: Продолжительность жизни клетки паразитовидной железы или время удвоения клона [годы].
По оси абсцисс: \log_2 (число клеток в клоне (или в аденоме)) или число удвоений гипотетической клетки прародительницы

2 – 3 последовательных митоза (удвоения) основной клетки ткани паразитовидной железы.

На рис. 3 в полулогарифмической системе координат обозначена зависимость величины индекса мечения от количества клеток в клоне. По оси абсцисс (логарифмическая ось) отмечено число удвоений гипотетической клетки прародительницы клона, которое равно величине логарифма с основанием 2 от общего числа клеток в клоне. Соответственно, один шаг по этой оси соответствует удвоению клона. По оси ординат отложена величина индекса мечения I_i . На рисунке видно, что по мере увеличения числа клеток в клоне I_i , характеризующий их пролиферативную активность, имеет тенденцию к снижению. Следовательно, имеются основания полагать, что по мере роста клона (или аденомы) уменьшается вероятность каждого последующего деления. Таким образом, можно прогнозировать даже прекращение последнего по мере формирования аденомы. Из этого, в свою очередь, следует и другой вывод: аденома паразитовидной железы растет до известных пределов, после чего ее рост должен остановиться.

На рис. 4 представлена зависимость продолжительности жизни клеток паразитовидной железы, или, что то же самое, времени удвоения клетки (интервала между двумя митозами) от числа удвоений гипотетической клетки прародительницы. Как и на рис. 3, число удвоений представлено в виде логарифма с основанием 2 от количества клеток в клоне. Как видно на рис. 4, продолжительность жизни клеток значительно возрастает по мере увеличения числа делений.

При изучении рождаемости клеток выяснилось, что ее средний показатель в каждой из 5 выделенных групп уменьшается с увеличением размеров клона (рис. 5). Более того, из представленных данных следует, что клетки в сформировавшейся аденоме паразитовидной

железы перестают делиться. Таким образом эти данные полностью согласуются с предположениями, уже высказанными выше.

Из полученных данных можно заключить, что: 1) клон клеток паразитовидной железы растет очень медленно и за время болезни (чаще всего около 20 лет) может увеличиться только в 2-3 раза; 2) индекс мечения, оцененный по экспрессии ядерного антигена Ki-67, в препаратах моноклональной аденомы значительно снижен, что позволяет предполагать прекращение дальнейшего роста аденомы; 3) предложенный нами показатель – условное, расчетное время роста клеточного клона – сохраняет свой физиологический смысл только в отношении очень маленьких и малых клонов, в то время как в применении к клонам больших размеров и к моноклональным аденомам он не имеет смысла в связи со своей нереальной величиной. Поэтому вполне оправдано предположить, что аденомы паразитовидной железы формируются в результате ряда последовательных делений клеток не только одного клона, но и слияния нескольких клонов, клетки которых утратили способность делиться.

Обсуждение

При прогнозе возможных вариантов течения эндо-кринного заболевания представляет значительный интерес вопрос о взаимосвязи между функцией эндокринной железы, ее размером и скоростью роста. К сожалению, при физикальном обследовании относительно легко определяются только размеры щитовидной железы, а также половых желез у мужчин. В остальных случаях о размерах эндокринных желез судят по данным УЗИ, компьютерной томографии и по косвенным

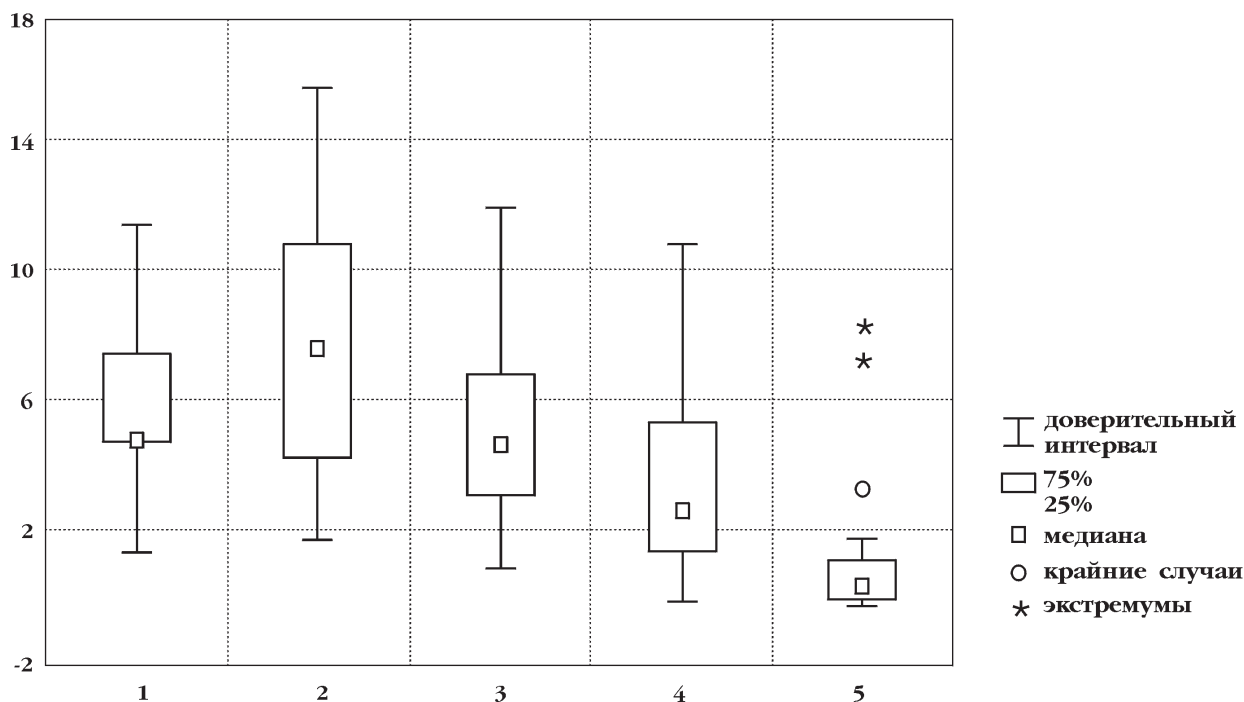


Рис. 5. Средняя рождаемость клеток в каждой из 5 групп клонов клеток паращитовидной железы.
 По оси ординат: Средняя рождаемость клеток паращитовидной железы [%/год].
 По оси абсцисс: Группы клеточных клонов
 1- группа: Группа очень маленьких клонов
 2- группа: Группа малых клонов
 3- группа: «Смешанная» группа клонов
 4- группа: Группа моноклональных аденом
 5- группа: Группа больших моноклональных аденом

признакам. К ним относятся клиническая картина заболевания и концентрации гормона или его метаболитов в плазме крови. Именно этот подход используется чаще всего при диагностике гиперпаратиреоза. Более того, на практике, как правило, предполагается, что высокая концентрация паратгормона в крови означает увеличение размеров паращитовидной железы и наоборот. Прижизненное определение размеров последней представляет значительные трудности. Методы визуализации при помощи ультразвука, сцинтиграфии с Tl^{201} или сестамибием, а также компьютерной рентгеномографии, хотя и достаточно надежны, но требуют специального оснащения и квалификации. Кроме того, при их использовании количество ложноположительных заключений по поводу аденомы относительно велико. Таким образом, для определения размеров паращитовидной железы ни одна из упомянутых методик не может быть рекомендована как абсолютная. Вместе с тем, решение этого вопроса имеет принципиальное значение для построения обоснованной лечебной тактики.

Механизмы, стимулирующие рост паращитовидных желез, до сих пор остаются во многом невыясненными. Хотя концепция Bricker [5, 6] обоснованно стимулировала строгое ограничение фосфатов в пище и обязательное

раннее применение кальцитриола у диализных пациентов, она, однако, не позволяла ответить на ряд вопросов. К ним, в частности, относятся: 1) почему при гиперпаратиреозе, обусловленном ХПН, в аденому трансформируется чаще всего только одна из паращитовидных желез, тогда как две аденомы возникают очень редко; 2) почему в контролируемых исследованиях не удалось наблюдать убедительной регрессии гиперплазии паращитовидных желез у ГД-больных, длительно леченных кальцитриолом и фосфор-связывающими препаратами; 3) почему широкое клиническое применение кальцитриола снизило вероятность фиброзного остеита и остеомалации, но мало повлияло на вероятность гиперпаратиреоза; 4) почему гиперпаратиреоз чрезвычайно медленно регрессирует после пересадки почки.

Отсутствие ответов на эти вопросы заставляет вспомнить старые исследования проблемы ГПТ, в которых он рассматривался в аспекте проблемы роста паращитовидных желез.

В 1966 Stanbury и Lumb [14] в поисках ответа на вопрос о взаимосвязи между весом паращитовидных желез и наличием или отсутствием изменений скелета проанализировали данные 119 случайных аутопсий больных ХПН. Авторы установили, что суммарный вес паращитовидных желез распределяется по логарифми-

⁴ В связи с тем, что вес паращитовидных желез оказался распределенным по логарифмически нормальному закону, результаты статистической обработки, выполненной Stanbury и Lumb, как и другими цитируемыми авторами, представлены средним геометрическим, вычисленным по формуле:

$GM = \exp(1/n \times \sum \ln(x_i))$, где GM – среднее геометрическое, n – число наблюдений. В скобках указана величина дисперсии, определяемая по формуле $\sigma^2 = 1/n - 1/n \times \sum (\ln x_i - GM)^2$ [2]. Это же относится и к показателям пролиферации клеток, продолжительности их жизни и рождаемости, а также LI.

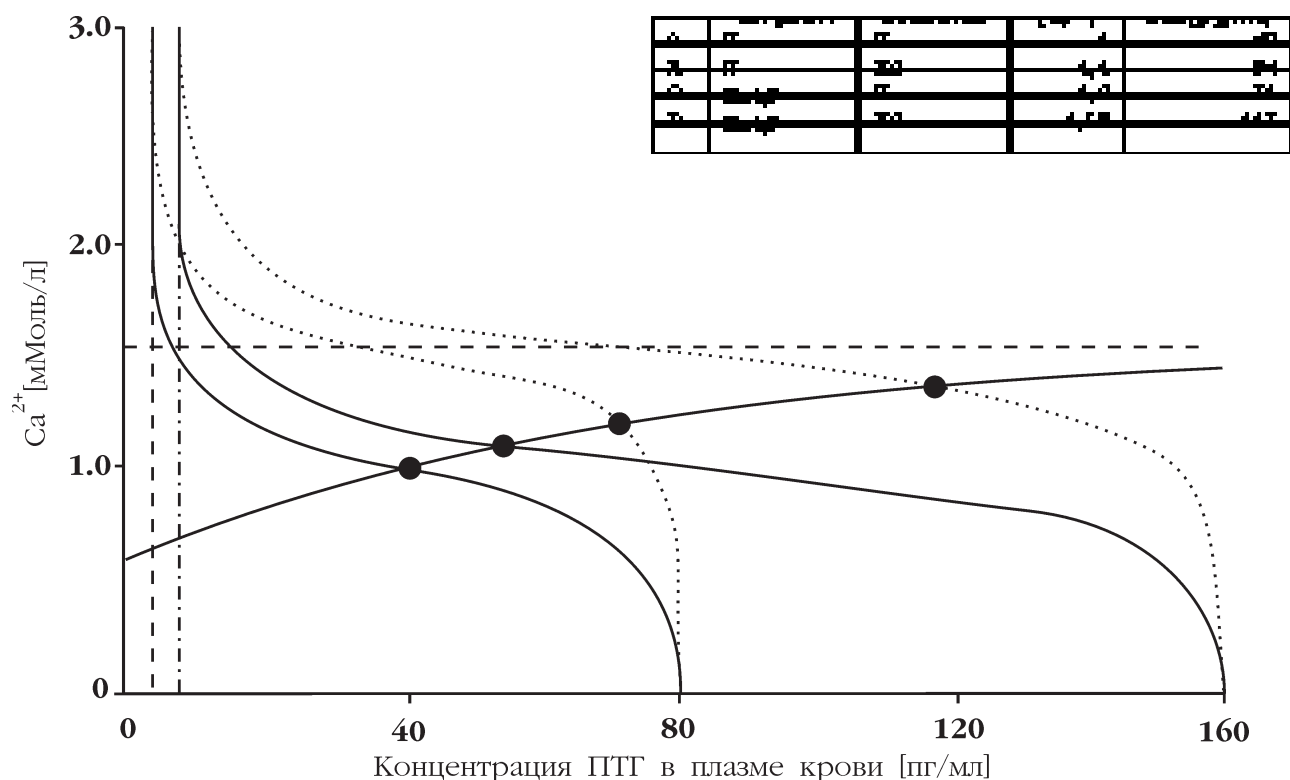


Рис. 6. Графическая схема модели, описывающей взаимосвязь между концентрацией ионизированного кальция в плазме крови, концентрацией паратгормона и степенью увеличения общего числа клеток в ткани паращитовидной железы (по А.М. Parfitt, 1969 [11, 12, 13])

Математическая модель, которая описывает соотношение между концентрацией ионизированного кальция в плазме крови, концентрацией ПТГ и общим количеством клеток во всех паращитовидных железах в зрелом организме записывается достаточно сложной системой уравнений. Поэтому для наглядности, с целью обсуждения обнаруженных взаимосвязей [10] на рис. 6, в верхней его части, представлена графическая схема этой модели. На поле в координатах, где по оси ординат обозначена концентрация ионизированного кальция в плазме крови ($[Ca^{2+}]$ мМ), а по оси абсцисс — концентрация ПТГ [пг/мл] в плазме крови можно разместить множество S-образных кривых, описывающих взаимосвязь между концентрациями ионизированного кальция и ПТГ в плазме крови. Повышение концентрации $[Ca^{2+}]$ угнетает, а снижение увеличивает секрецию ПТГ. Равновесное состояние характеризуется так называемой set-point (или равновесной точкой). Координаты последней соответствуют уровню $[Ca^{2+}]$ при базальной концентрации ПТГ, то есть в условиях, когда отсутствуют сигналы усилить или ослабить интенсивность секреции ПТГ. В норме секреторные клетки находятся в состоянии функционального покоя при $[Ca^{2+}] = 1$ мМ. Согласно теории E. Brown [7] в патологии (например, при ХПН) возникает мутация генов, ответственных за структуру рецептора к $[Ca^{2+}]$. Как следствие, клетки начинают усиленно секретировать ПТГ в ответ не на низкую, а на нормальную концентрацию $[Ca^{2+}]$. Это приводит к сдвигу set-point, что соответствует сдвигу S-образной кривой вверх по оси ординат. С другой стороны, при увеличении числа секретирующих клеток (и соответственно размеров железы) возрастает базальная секреция ПТГ, что определяет сдвиг set-point и соответствующей S-образной кривой вправо по оси абсцисс. Теоретически в клинике возможно любое ее сдвигов ограничено. В рассматриваемой модели они располагаются вдоль и вокруг некоторой линии {A,B,C,D}. В таблице в верхней части рис. 6 разъясняется: точке A соответствует нормальное положение set-point и нормальное положение S-образной кривой. При увеличении числа клеток в ткани паращитовидных желез без сопутствующей мутации рецепторов к $[Ca^{2+}]$, точка смещается в положение B. При мутации генов, отвечающих за структуру рецептора к $[Ca^{2+}]$ без изменения общего числа клеток в железистой ткани, соответствующая S-образная кривая пройдет через точку C. Если имеют место и то и другое, то кривая сместится в точку D. Такова суть математической модели [11], которая соединяет в себе две гипотезы. Одна из них сформулирована E. Brown [7]. В соответствии с этой гипотезой первопричиной гиперпаратиреоза является мутация рецепторов к $[Ca^{2+}]$, вследствие которой клетки железы начинают воспринимать нормальную концентрацию ионизированного кальция как низкую и, следовательно, получают постоянный сигнал к усиленной секреции, что каким-то образом, стимулирует в дальнейшем деление клеток и рост железы. Вторая гипотеза предложена А.М. Parfitt [12,13]. Она рассматривает гиперпаратиреоз как проблему ускоренной (в сравнении с нормой) скорости пролиферации клеток ткани паращитовидной железы.

чески нормальному закону. Оказалось, что при отсутствии фиброзного остеита его среднее геометрическое значение равно $0,187 (2,23) \text{ г}^4$ с коэффициентом вариации 67% и разбросом от 0,045 до 0,891 г. В то же время в 26 случаях, в которых имелись признаки фиброзного остеита, этот показатель был в 20 раз больше и составил $3,52 (2,35) \text{ г}$ с разбросом от 0,78 до 12,0 г. Следует

подчеркнуть, что, за небольшим исключением, при отсутствии признаков фиброзного остеита суммарный вес всех паращитовидных желез не превышал 1,0 г, в то время как во всех случаях фиброзного остеита он был более 1,0 г. Позднее эти данные были подтверждены и другими авторами [10, 11, 12, 15]. Наши данные о близком к логарифмически-нормальному типу статисти-

ческого распределения количества клеток в отдельных клеточных клонах паращитовидных желез согласуются с результатами этих исследований.

Логарифмически-нормальный тип распределения становится понятным, если допустить, что интенсивность пролиферации клеток паращитовидной железы зависит от появления в их геноме мутаций, влияющих на скорость клеточного цикла [11, 12, 13]. Мутации, накапливаемые от деления к делению, носят случайный «по знаку» характер, так что деление клеток после одной из ближайших мутаций может прекратиться. Возможно также, что после мутации, ускоряющей клеточный цикл, возрастает вероятность мутации, его замедляющей. При допущении такого закона накопления мутаций становится понятным рост до размеров аденомы только одной из четырех желез, тогда как превращение в аденому всех желез представляется мало вероятным.

После детального анализа этой проблемы Parfitt в 1969 [11] предложил теоретическую модель (рис. 6), в которой учитывались как мутации, ответственные за скорость пролиферации клеток, так и мутации, определяющие структуру и чувствительность рецепторов к ионизированному кальцию [7]. Авторы модели исходили из того, что на первых этапах развития ГПТ ведущую роль играет не число клеток в паращитовидной железе, а мутация генов ее рецепторов к ионизированному кальцию. Нарушение структуры этих рецепторов приводит к гиперсекреции ПТГ, возникающей даже при физиологически нормальной концентрации ионизированного кальция в плазме крови. На этой стадии гиперсекреция парат-гормона может быть подавлена более высокой концентрацией ионизированного кальция. На поздних этапах, при автономном, или неподдаваемом ГПТ секрета гормона даже при повышенной концентрации ионизированного кальция снижается мало, так как на этой стадии болезни секреция парат-гормона определяется уже общим количеством клеток (рис. 6) [11]. В модели предусматривался алгоритм расчета размеров аденомы паращитовидной железы по известной концентрации ионизированного кальция. Авторы установили, что гиперплазия паращитовидных желез развивается медленно, но регрессирует она еще медленнее, если такая регрессия вообще возможна.

Если принять, что гиперплазия и гипертрофия определяются последовательным накоплением мутаций, в геноме клеток паращитовидной железы с изменением их рецепторных свойств и скорости деления, и именно это составляет суть ГПТ при ХПН, то, следовательно, ключ к пониманию патогенеза последнего следует искать в изучении закономерности деления клеток паращитовидной железы. Известно, что все ткани организма условно подразделяются на состоящие из быстро и медленно делящихся клеток (быстро и медленно делящиеся ткани). В отличие от быстро обновляемых тканей, в которых обособленные «молодые клетки» обеспечивают регенерацию, в то время как другие несут определенную функциональную нагрузку, ткани с низкой скоростью обновления, к числу которых относится и паращитовидная железа, построены из клеток, выполняющих специфическую функцию и одновременно способных к делению. Parfitt, Wang а. Palnitkar [16] изучили показатели пролиферации клеток

аденомы паращитовидной железы при первичном ГПТ. Оказалось, что средняя «рождаемость» этих клеток составила 9,97 (3,63) %/год с разбросом от 0,61 до 177 %/год, а расчетная продолжительность жизни в среднем была равна 10,03 (3,68) г. с разбросом от 0,73 до 136 лет. В паращитовидной железе, расположенной рядом с аденомой, средняя «рождаемость клеток» равнялась 2,58 (2,26) %/г. с разбросом от 0,52 до 12,2 %/г., а расчетная продолжительность жизни достигала в среднем 38,8 (2,26) г. с разбросом от 8,2 до 192 лет. При отсутствии гиперпаратиреоза средняя «рождаемость клеток» паращитовидной железы человека оказалась равной 5,24 (2,54) %/г. с разбросом от 1,07 до 22,5 %/г., а расчетная продолжительность жизни составила в среднем 19,1 (2,54) г. с разбросом от 4,4 до 93 лет. Авторы отметили также, что в центре аденомы пролиферация клеток отсутствует или выражена значительно слабее, чем на периферии. Очагов с интенсивной пролиферацией клеток при этом не было обнаружено. На основании полученных данных авторы пришли к выводу, что после появления постоянного секреторного стимула происходит фенотипическая модуляция рецепторов к ионизированному кальцию, вследствие которой ПТГ секретируется в ответ не на низкую, а на нормальную концентрацию ионизированного кальция. В основе модуляции рецепторов лежит нарушение репликации соответствующей мРНК, и это может сочетаться с эпимутацией соответствующего регулирующего гена [7, 8, 9], которая приводит к уменьшению количества и изменению качества рецепторов на поверхности клеточной мембраны и сопровождается незначительным ускорением клеточной пролиферации. Рост паращитовидной железы носит асимптотический характер и продолжается до тех пор, пока в организме не установится концентрация ионизированного кальция, которая соответствует set-point для новой генерации кальциевых рецепторов (рис. 6). По мере увеличения числа делений накапливается число клеток с измененным геномом. Накопленные мутации могут приводить как к ускорению, так и к замедлению пролиферации, так как каждая мутация по своей природе случайна. Каждая из мутировавших клеток лежит в основе образования нового клеточного клона. Клеточный клон, который растет быстрее остальных, превращается в аденому и постепенно подавляет рост остальных клонов. Таким образом, согласно предположению Parfitt [11, 12, 13, 16] поликлональная гиперплазия сменяется «моноклональной» аденомой. В центре аденомы находятся клетки более старые, чем на периферии, что объясняет более низкую, в сравнении с периферией вероятность выявления антигена Ki-67 в центре аденомы. Способность к делению уменьшается с возрастом клетки. По мере роста числа удвоений накапливается число мутаций, что на определенном этапе замедляет пролиферацию. Вполне возможно, что это [11, 12, 13, 16] наиболее рациональный подход к объяснению многочисленных наблюдений того факта, что аденома паращитовидной железы растет только до определенного предела (в среднем до 3,5 г), а далее ее рост прекращается.

Подводя итог сказанному, следует добавить, что аденома паращитовидной железы состоит из клеток, утративших способность к пролиферации в связи с накоплением некоторого критического количества

мутаций регуляторных генов. Клетки аденомы, исходя из нормальных клеток паращитовидной железы, по причинам, которые остаются неясными, в ответ на постоянный сигнал, стимулирующий увеличенную секрецию, начинают делиться чаще обычного, и в связи с этим накапливают мутации, которые в конце концов резко уменьшают вероятность каждого последующего деления. Таким образом, рост аденомы останавливается. Теоретически это состояние представляет собой «затишье перед бурей». Каждое следующее деление увеличивает вероятность освобождения мнимого циклина D₁ протоонкогена [9] или потери аллельной хромосомы либо другого способа инактивации онкосупрессорного гена, так что далее следует ожидать озлокачествления аденомы и взрывного характера клеточной пролиферации. Однако вероятность малигнизации аденомы при первичном ГПТ составляет всего 3% [12, 15], и сегодня еще не описаны случаи малигнизации аденомы паращитовидной железы при терминальной ХПН. Наиболее вероятное объяснение этому состоит в том, что при уремии аденома растет настолько медленно, что не успевает переродиться в злокачественную опухоль.

Наши данные полностью согласуются с представлением о важной роли фенотипической модуляции рецепторов к ионизированному кальцию. В то же время при прямых измерениях скорость пролиферации клеток паращитовидной железы оказалась не столь значительной, как в приведенных выше исследованиях [17]. В этой связи следует подчеркнуть, что, в отличие от указанных авторов, мы изучали скорость роста паращитовидных желез не при первичном ГПТ, а при уремии, когда ГПТ носит вторичный характер. Полученные нами данные позволяют полагать, что большая «моноклональная» аденома при вторичном ГПТ (например, весом 3,5 г и с числом клеток $\approx 5,556 \times 10^{10}$) не может вырасти из одного клона клеток (рис. 1). Проведенные нами измерения указывают на то, что за время болезни, которая нередко длится около 20 лет, клеточный клон успевает увеличиться в размерах только в 2-3 раза, а далее рост его прекращается. Более того, наши расчеты позволяют заключить, что, даже после ускорения пролиферации, время, необходимое для роста одного клеточного клона до размеров большой аденомы, превышает продолжительность жизни человека. Из результатов наших измерений можно также предположить следующий порядок формирования моноклональной аденомы паращитовидной железы: моноклональная аденома является однородной только в том смысле, что она состоит из клеток, которые прекратили делиться. Отдельные клоны таких клеток, двигаясь навстречу друг другу, сливаются и, наконец, спустя годы возникает большая аденома, которая внешне выглядит как моноклональная. Каким именно образом клеточные клоны, утратившие свою пролиферативную активность, приходят в движение и соединяются в «моноклональную» аденому, так что последняя начинает выглядеть как морфологически однородная, остается неясным.

Учитывая, что, согласно нашим вычислениям, для удвоения размеров самых маленьких из измеренных клонов необходимо 8,3 г (рис. 2), лечение, направленное на угнетение секреции ПТГ и скорости пролиферации клеток паращитовидной железы, следует начинать минимум за 8 лет до предполагаемой даты начала диализа.

Выводы

- 1) Скорость удвоения малых клонов клеток паращитовидной железы составляет 8,3 г – 30 лет, что во многих случаях не позволяет рассматривать моноклональную аденому как моноклональную в строгом смысле слова. Можно допустить, что большие аденомы происходят не из единственной клетки-прародительницы, а возникают вследствие слияния нескольких меньших клонов, которые за все время заболевания успели сделать 2-3 последовательных деления.
- 2) Результаты расчета минимального времени удвоения клона клеток паращитовидной железы позволяют рекомендовать профилактику вторичного гиперпаратиреоза кальцитриолом и фосфор-связывающими препаратами примерно за 8 лет до предполагаемого начала диализа. Соответственно, проблема лечения гиперпаратиреоза, которая обычно возникает на стадии хронического ГД, трансформируется в проблему лечения и профилактики гиперпаратиреоза на самой ранней стадии ХПН.

Литература

1. **Авандилов Г.Г.** Введение в количественную патоморфологию. Москва, «Медицина» 1980; 215.
2. **Айвазян С.А., Енюков И.С., Бухштабер В.М., Мешалкин Л.Д.** «Прикладная Статистика» Москва, Финансы и статистика, 1983-1988; 1-3.
3. **Новиков А.И.** Современный взгляд на патогенез гиперпаратиреоза при почечной недостаточности как на проблему роста отдельных клонов паращитовидной железы. Практическая нефрология 1998; 2: 27 – 36.
4. **Belezikian J.P. (ed.)** The parathyroids- Basic and Clinical concepts. Raven Press, New York 1994; 859.
5. **Bricker N.S., Orden D.A., Schreiner G.C., Wasler M.** Invited discussion. Arch. Intern. Med. 1969; 124; 3: 271 – 288.
6. **Bricker N.S.** On the pathogenesis of the uremic state. An exposition of the «Trade-off hypothesis». N.Engl. J. Med. 1972; 286; 1093 – 1099.
7. **Brown E.M.** Mechanism underlying the regulation of the parathyroid hormone secretion in vivo and in vitro. Curr. Opin. Nephrol. Hypertension. 1993; 2: 541 – 551.
8. **Hollyday R.** Mutation and epimutation in mammalian cells. Mutation Res. 1991; 250; 3: 351- 361.
9. **Hsi E.D., Zukerberg R., Yang W-I, Arnold A.** Ciclin D1/PRADD1 expression in parathyroid adenomas: an immunohistochemical study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1996; 81; 11; 1736-1739.
10. **MacCormic D., Chond H., Hobbs C., Datta C.** Detection of Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB-1. Histopathology 1993; 22; 3: 355-360.
11. **Parfitt A.M.** A theoretical model of the relationship between parathyroid cell mass and plasma calcium concentration in normal and abnormal uremic subjects: an analysis of the concept of autonomy and speculations on the mechanism of parathyroid hyperplasia. Arch. Intern. Med. 1969; 124; 3: 269-273.
12. **Parfitt A.M.** Parathyroid Growth Normal and Abnormal. in the book: The Parathyroids, ed. J. Belezikian, M.A. Livine, R. Marcus. Chapter 23; 373- 405.
13. **Parfitt M.A.** The hyperparathyroidism of chronic renal failure: A disorder of growth. Kidney International 1997; 52; 1; 3-9.
14. **Stunbury S.W., Lumb G.A.** Parathyroid function in chronic renal failure. Quart. J. Med. 1966; 35; 1: 1- 23.
15. **Tominga Y., Sato K., Tanaka Y., Numano M.** et al. Histopathology and pathophysiology of secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure. Clinical Nephrology 1995; 44; Supplement 1: S42-S47.
16. **Wang Q., Palnitkar S., and Parfitt A.M.** The basal rate of cell proliferation in normal human parathyroid tissue: implication for the pathogenesis of hyperparathyroidism. Clinical Endocrinology. 1997; 46; 3: 343- 349.
17. **Weibel E.R.** Stereological Methods. Vol.1, Academic Press, NY 1979; 413; 2; Academic Press, NY 1980; 340.