

**Моделирование *in vitro* молекулярных реакций мононуклеаров крови больных с наследственными коллагенопатиями на титановые имплантаты с модифицированной поверхностью**

**Т.В. Саприна<sup>1,2</sup>, М.В. Дворниченко<sup>1</sup>, К.А. Нечаев<sup>1</sup>, К.В. Зайцев<sup>1</sup>, Е.Н. Больбасов<sup>1</sup>, Д.А. Пономарева<sup>2</sup>, Т.А. Нагаева<sup>2</sup>, И.А. Хлусов<sup>1,2</sup>**

***Modeling in vitro molecular reactions of blood mononuclear leukocytes to titanium implants with modified surface in patients with hereditary collagenopathies***

**T.V. Saprina<sup>1,2</sup>, M.V. Dvornichenko<sup>1</sup>, K.A. Nechayev<sup>1</sup>, K.V. Zaitsev<sup>1</sup>, E.N. Bolbasov<sup>1</sup>, D.A. Ponomareva<sup>2</sup>, T.A. Nagayeva<sup>2</sup>, I.A. Khlusov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Томский филиал Российского научного центра

«Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий, г. Томск;

<sup>2</sup>ГОУ высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет», г. Томск (руководитель – академик РАМН, профессор В.В. Новицкий)

---

Моделирование *in vitro* молекулярных реакций мононуклеарных клеток периферической крови на контакт с имплантатами, перспективными для совершенствования методов остеосинтеза, может, на наш взгляд, применяться для прогностической оценки приживления/отторжения искусственного материала и его перспективности для хирургического лечения пациентов с несовершенным остеогенезом и дисплазией соединительной ткани.

Ключевые слова: остеокальцин, Crosslaps, TNF $\alpha$ , кальций, фосфор, несовершенный остеогенез, дисплазия соединительной ткани.

*In vitro* modeling of molecular reactions of peripheral blood mononuclear leukocytes to contact with implants which are perspective for improvement of osteosynthesis techniques can be used, in our opinion, for prognostic estimation of acceptance/rejection of artificial materials and the prospective usage for surgical treatment of patients with osteogenesis imperfecta and connective tissue dysplasia.

Keywords: osteocalcin, Crosslaps, TNF $\alpha$ , calcium, phosphorus, osteogenesis imperfect, connective tissue dysplasia.

---

**ВВЕДЕНИЕ**

Для всех заболеваний, связанных с патологией коллагена, характерен высокий клинический полиморфизм. Большинство этих заболеваний проявляется в виде синдромов, являющихся выражением патологических процессов в отдельных компартментах соединительной ткани. Особенности клинического течения конкретного заболевания зависят от характера мутационного повреждения гена, определяющего биохимический дефект соответствующего коллагена.

В связи с этим наследственно обусловленные нарушения структуры и функции коллагена и связанные с ними многочисленные системные проявления объединяются в отечественной литературе термином «дисплазия соединительной ткани» (ДСТ). К настоящему времени описаны основные фенотипы явных диспластических синдромов (синдром Марфана, Элерса-Данло, несовершенный остеогенез).

Несовершенный остеогенез (НО) – наиболее распространенное наследственное заболевание

соединительной ткани. Его частота в популяции составляет 1:10000 новорожденных и 1:1000 среди ортопедических больных. Клиническая картина НО характеризуется повышенной ломкостью костей и патологическими изменениями ряда других тканей, богатых коллагеном I типа, таких, как кожа, связки, хрящи, фасции, склеры, зубы, ткани среднего и внутреннего уха. При НО наблюдается чрезвычайно высокий клинический полиморфизм [11].

В настоящее время мутации, лежащие в основе развития различных моногенных наследственных заболеваний соединительной ткани, описаны для 24 коллагеновых генов, участвующих в синтезе 12 различных типов коллагенов, а также в трех генах ферментов биосинтеза коллагенов – PLOD1, PLOD2 и ADAMTS2. Более 260 различных мутаций известно для гена COL1A1 и более 130 для COL1A2. Уникальный характер генетических дефектов в сочетании с большим количеством коллагеновых генов и их сложной экзон-интронной

структурой затрудняют молекулярную диагностику мутаций в каждом конкретном случае. Учитывая трудности идентификации точного молекулярного дефекта в каждом конкретном случае, рядом авторов [2] предлагается новый классификационный подход к ДСТ, который носит явно «прикладной» характер. Выделяются 3 фенотипа заболевания (марфаноподобный, элерсоподобный и MASS-фенотип). Это предложение заманчиво благодаря своей простоте и исходной идее о том, что несиндромные формы ДСТ являются «фенотипическими» копиями известных синдромов.

В предыдущей работе [6] нам удалось установить, что у больных с НО применение интрамедуллярного биоактивного остеосинтеза способствует кратковременной коррекции скелетных деформаций. С другой стороны, при использовании

медицинских изделий развивается воспалительная реакция, активность и исход которой определяет во многом судьбу приживления или отторжения имплантата. Реакция модулируется не только местными стромальными элементами, но и циркулирующими во фракции мононуклеаров крови иммунными клетками. При этом основные события протекают на границе раздела имплантат/биологическая структура [7].

В связи с этим, цель данного исследования – провести *in vitro* сравнительную оценку молекулярной реакции культуры мононуклеарных клеток периферической крови здоровых добровольцев и больных коллагенопатиями на контакт с имплантатами, перспективными для совершенствования методов остеосинтеза.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 2 нозологические формы коллагенопатий – несовершенный остеогенез (НО; 4 пациента, средний возраст 17 лет) и недифференцированная дисплазия соединительной ткани (ДСТ; 5 человек, средний возраст 18 лет). Пациентам с НО проводилась ортопедическая коррекция угловых деформаций нижних конечностей с использованием материалов с биоактивным кальцийфосфатным покрытием (регистрационное удостоверение Минздрава РФ № 29/12010200/1190-00 и сертификат соответствия ГОСТ Р № РОСС RU.АЯ 79.В55386). Все пациенты на момент забора биологического материала были соматически здоровы, после последнего хирургического вмешательства прошло от 2 месяцев до 1 года.

Диагноз «синдром ДСТ» был поставлен на основании полного физикального исследования с оценкой стигмального статуса, использования расчетных индексов и клинических тестов: тесты на наличие арахнодактилии и долихостеномелии, определение гипермобильности суставов по тесту Бейтона, плантографии. Диагностика степени тяжести ДСТ проводилась согласно критериям Милковска-Дмитровой и Каракашева в модификации Л.Н. Фоминой [5].

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из периферической крови методом центрифугирования в течение 10 минут при 500 g с использованием градиента плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ( $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ ). Взвесь клеток (жизнеспособность более 95 %) культивировали в течение 52 часов при температуре 36 °С в концентрации  $5 \times 10^6$  нуклеаров/лунку в 1 мл полной культуральной среды, способствующей остеогенной дифференцировке клеток: 80 % среды ДМЕМ/F12 (1:1), 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л L-глутамин, 50 мг/л гентамицина сульфат, 10мМ бета-глицерофосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты,  $10^{-6}$  М декса-

метазона, 10 мМ HEPES буфера.

Выделенные мононуклеары культивировались на пластике (контроль) или с добавлением стерильных титановых дисков с композитным покрытием кальцийфосфаты/полимер.

В качестве связующего компонента для изготовления композитов на титановых подложках был выбран биоинертный сополимер тетрафторэтилена с винилиденфторидом. Неорганической фазой композитных покрытий служил костный минерал биологического происхождения, полученный путем обжига свиных костей с последующим размолом, многократной промывкой, сушкой и просеиванием. Наличие гидроксилатагита в полученном материале доказано методом рентгенофазового анализа на дифрактометре Shimadzu XRD 6000. Раствор композита (соотношение компонентов 50:50) методом пневматического распыления наносили на предварительно подготовленные и нагретые до 70 °С титановые (BT-6) диски.

Супернатанты (кондиционные жидкости) получали путем забора надосадочной части клеточных культур, их центрифугирования в течение 10 минут при 500 g. В кондиционных средах методом ИФА реактивами Nordic Bioscience Diagnostics (Дания) оценивали маркеры костного ремоделирования (концентрации остеокальцина, продуктов деградации коллагена I типа (CrossLaps)), как описано ранее [6]. Кальций и неорганический фосфор измеряли колориметрическим стандартным методом, рекомендованным ААСС и IFCC [3].

Концентрацию TNF $\alpha$  в супернатантах мононуклеарных клеток определяли с помощью наборов для ИФА производства «Вектор Бест» (Новосибирск) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Учет результатов проводили по калибровочной кривой с использованием фотометра для микропланшетов («Multiscan EX», USA).

Индивидуальную реакцию мононуклеаров

различных людей на контакт с имплантатами определяли в процентном выражении от соответствующей реакции клеток на пластик. Статистическую обработку выполняли с применением программ «STATISTICA for Windows 6.0». Для описания изменчивости количественных признаков использовали общепринятые статистические процедуры, включая расчет параметров распределений (средние значения, их ошибки). Проверку на

нормальность распределений осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. В выборках наблюдалось распределение показателей, отличное от нормального. В связи с этим, для оценки статистической значимости различий выборок применяли непараметрический критерий Вилкоксона (Т-тест). Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время активно изучается *in vitro* реакция клеток на искусственные поверхности [12]. Однако до сих пор получены неоднозначные результаты, тем более в условиях патологии клеточных систем. В связи с этим проведены сравнительные исследования молекулярной реакции культуры мононуклеарных клеток периферической крови у здоровых добровольцев, больных НО и ДСТ в условиях контакта с искусственным материалом.

Согласно обзору [10], в периферической крови человека обнаружена очень малая популяция (менее 0,5 клеток на  $10^6$  мононуклеаров) мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), количество которых увеличивается при заболеваниях или методиках, вызывающих их мобилизацию из костного мозга.

Результаты наших исследований показали, что при контакте с имплантатами профиль маркеров костного метаболизма в супернатантах мононуклеаров, выделенных из крови здоровых добровольцев, свидетельствовал о некотором увеличении (табл. 1) уровней остеокальцина и CrossLaps по сравнению с культурой клеток на пластике с биоинертной поверхностью [7]. Существенный разброс полученных данных, связанный с индивидуальной нормой реакции, был отмечен нами ранее *in vivo* [4] и обусловил статистическую обработку результатов согласно Т-критерию Вилкоксона.

По-видимому, речь может идти об остеогенном созревании ММСК в культуральной среде, содержащей глицерофосфат и дексаметазон, как описано [9]. Действительно, результаты показали, что в остеогенной культуральной среде без дисков фибробластоподобная морфология отмечалась у 2,5 % мононуклеарных лейкоцитов, прилипающих к пластику. В то же время, в присутствии искусственных спутников (дисков) 18-38 % мононуклеаров из периферической крови здорового человека претерпевали фибробластидную трансформацию.

В основе негативного влияния имплантата на организм лежит каскад событий, характерных для воспаления [8], развитие которых сопровождается продукцией медиаторов, вовлечённых в патологическую резорбцию костной ткани. Показано, что эти события приводят к развитию гра-

нулематозной реакции со стороны окружающих тканей, активации мононуклеарных клеток к секреции цитокинов (в первую очередь, TNF- $\alpha$ ) и протеолитических ферментов. Они стимулируют костную резорбцию, ингибируют костное образование, что может привести к расшатыванию имплантата, развитию асептического воспаления и локального остеопороза [7].

У здоровых добровольцев в супернатантах культуры мононуклеаров крови, взаимодействующих с искусственным материалом, более чем в 10 раз возрастала концентрация TNF- $\alpha$  (табл. 1), что может быть проявлением неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем [1].

В свою очередь, в группе больных с НО и ДСТ имело место статистически значимое снижение секреторной реакции мононуклеаров крови на искусственный материал и показателей минерального обмена (табл. 1) на фоне увеличения доли фибробластоподобных клеток, прилипающих к пластику, до 4 – 14 % в сравнении с 2,5 % у здоровых добровольцев. Максимально выраженная морфологическая трансформация клеток отмечалась у пациентов с тяжелой клинической формой НО. В связи с этим, повышенный уровень остеокальцина, снижение кальция и фосфора в супернатантах клеток, полученных от больных НО, может свидетельствовать об усилении отложения минерального матрикса на имплантатах *in vitro* как отражение оперативных вмешательств в анамнезе больных.

В то же время, сниженная реактивность моноцитарно/макрофагальных клеток крови у больных коллагенопатиями, зафиксированная по незначительной секреции TNF- $\alpha$  в кондиционных средах (табл. 1), является, по-видимому, благоприятным прогностическим признаком для хирургических вмешательств с использованием имплантационных материалов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №09-04-99105-р\_офи “Создание и внедрение экспериментальной модели на основе смешанной культуры мононуклеаров периферической крови человека со стромальными стволовыми клетками для исследования механизмов, диагностики и терапии метаболических остеопатий человека”.

Таблица 1  
Молекулярные показатели активности in vitro мононуклеаров крови (% от контроля на пластике) через 52 ч после контакта с имплантатами, несущими композитное покрытие кальцийфосфаты/полимер, X±SD

Исследуемая группа	Изучаемые показатели в кондиционных средах культур клеток				
	Остеокальцин	CrossLaps	TNF-α	Фосфор	Кальций
Здоровые добровольцы, n=5	116,67±42,36	141,94±130,65	1144,92±1073,41	161,22±86,57	168,82±59,69
Дисхондроплазия, n=5, *p<0,043	78,86±10,01	104,09±29,25	134,48±51,50	114,58±27,73	117,39±18,92
Несовершенный остеогенез, n=4, *p<0,05	178,30±151,55	82,19±66,38	135,46±65,63	92,28±2,38	84,84±7,72

Примечание: \* – статистически значимые различия со здоровыми добровольцами согласно Т-критерию Вилкоксона; n – число обследованных.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование in vitro молекулярной реакции мононуклеарных клеток периферической крови на контакт с имплантатами, перспективными для совершенствования методов остеосинтеза, может,

на наш взгляд, применяться для индивидуальной оценки приживления/отторжения искусственного материала и его перспективности для хирургического лечения пациентов с НО и ДСТ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Браун А. Д., Моженок Т. П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л. : Наука, 1987. 232 с.
2. Кадурин Т. И. Наследственные коллагенопатии. СПб. : Невский диалект, 2000. 271 с.
3. Клиническое руководство по лабораторным тестам : пер. с англ. / под ред. Н. У. Тица. М. : Юнимед-Пресс, 2003. 943 с.
4. Маркеры остеогенеза в периферической крови как патогенетические факторы и предикторы системных эффектов имплантатов для остеосинтеза / Т. В. Дружинина [и др.] // Гений ортопедии. 2007. № 4. С. 83-88.
5. Мельник Ю. И., Фомина Л. Н. Особенности психологической адаптации к средней школе у детей с признаками ДСТ // Журн. прикладной психологии. 2000. № 6. С. 36-39.
6. Некоторые клинические и патофизиологические вопросы и перспективы хирургической коррекции остеопении у пациентов с несовершенным остеогенезом / А. В. Карлов [и др.] // Гений ортопедии. 2008. № 4. С. 84-88.
7. Biomaterials science : an introduction to materials in medicine / ed. by B. D. Ratner [et al.]. San Diego : Elsevier Academic Press. 2<sup>nd</sup> edition, 2004. 851 p.
8. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses / D. Granchi [et al.] // J. Bone Joint Surg. 1998. Vol. 80-B. P. 912-917.
9. Da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // J. Cell Science. 2006. Vol. 119. P. 2204-2213.
10. He Q., Wan C., Li G. Concise review : multipotent mesenchymal stromal cells in blood // Stem cells. 2007. Vol. 25. P. 69-77.
11. Silience D. O. Genetic heterogeneity in osteogenesis // J. Med. Genet. 1979. Vol. 16. P. 101-116.
12. Wiemann B. M., Bingmann D., Franzka S. Oriented growth of osteoblast-like cells on two-dimensionally structured films of functionalized calcium phosphate nanoparticles on a silicon substrate // Adv. Engin. Mater. 2007. Vol. 9, No 12. P. 1077-1081.

Рукопись поступила 29.03.10.

### Сведения об авторах:

1. Саприна Татьяна Владимировна – ТФ РНЦ «ВТО им. акад. Г.А. Илизарова», к.м.н., с.н.с. лаборатории токсикологии и культуры тканей асс. каф. эндокринологии и диабетологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, e-mail: tvsaprina@sibmail.com;
2. Нагаева Татьяна Александровна – ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, зав. каф. поликлинической педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней, д.м.н., профессор, e-mail: polped@ssmu.ru
3. Пономарева Дарья Алексеевна – ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава, асс. каф. поликлинической педиатрии с курсом пропедевтики детских болезней, к.м.н., e-mail: d-pon@mail.ru;
4. Хлусов Игорь Альбертович – Томский филиал ФГУ “РНЦ “ВТО” им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий”, зам. директора по научной работе, д.м.н., профессор, e-mail: khlusov63@mail.ru;
5. Зайцев Константин Васильевич – Томский филиал ФГУ “РНЦ “ВТО” им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий”, в.н.с. лаборатории патологической физиологии и биомеханики имплантируемых устройств, к.м.н.;
6. Дворниченко Марина Владимировна – Томский филиал ФГУ “РНЦ “ВТО” им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий”, ученый секретарь, к.м.н.;
7. Большасов Евгений Николаевич – Томский филиал ФГУ “РНЦ “ВТО” им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий”, м.н.с. лаборатории токсикологии и культуры тканей;
8. Нечаев Кирилл Андреевич – Томский филиал ФГУ “РНЦ “ВТО” им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий”, н.с. лаборатории токсикологии и культуры тканей.