

## Морфофункциональные особенности культуры мононуклеарных клеток крови у больных несовершенным остеогенезом: клинικο-диагностическое наблюдение

Хлусов И.А.<sup>1,2</sup>, Саприна Т.В.<sup>1</sup>, Нечаев К.А.<sup>1</sup>, Дворниченко М.В.<sup>1</sup>, Шевцова Н.М.<sup>1</sup>, Зайцев К.В.<sup>3</sup>, Попков А.В.<sup>2</sup>

## Morphofunctional features of blood mononuclear cells culture in patients with osteogenesis imperfecta: clinicodiagnostic observation

*Khlusov I.A., Saprina T.V., Nechayev K.A., Dvornichenko M.V., Shevtsova N.M., Zaytsev K.V., Popkov A.V.*

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> Томский филиал Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий, г. Томск

<sup>3</sup> Томский НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России, г. Томск

© Хлусов И.А., Саприна Т.В., Нечаев К.А. и др.

Применение интрамедуллярного биоактивного остеосинтеза и аппарата Илизарова способствует коррекции скелетных деформаций, позволяет поставить на ноги больных с несовершенным остеогенезом. Морфофункциональные показатели культуры мононуклеарных клеток периферической крови могут рассматриваться как вероятные маркеры и предикторы течения несовершенного остеогенеза и продолжительности реабилитации пациентов.

**Ключевые слова:** остеосинтез, кальцийфосфатное покрытие, маркеры остеогенеза, морфология и функция клеток.

The use of intramedullary bioactive osteosynthesis combined with Ilizarov's apparatus is promoting to correction of skeletal deformations and is allowing putting patients with osteogenesis imperfecta on their legs. Morphofunctional parameters of blood mononuclear cells can be considered as probable markers and predictors of osteogenesis imperfecta course and duration of patients rehabilitation.

**Key words:** osteosynthesis, calcium phosphate coating, osteogenesis markers, cells morphology and function.

УДК 616.71-007.235:616-008.853.3-091.8]-07

### Введение

Согласно литературным данным [11, 23], в периферической крови человека обнаружены прилипающие к пластику клетки, названные фиброцитами, несущие морфологические и фенотипические характеристики мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). По мнению D. Pilling и соавт., в культуре клеток *in vitro* CD14<sup>+</sup>-моноциты периферической крови могут трансформироваться в фибробластоподобные клетки [19]. Фиброциты проявляют промежуточный между гемопоэтическими и стромальными стволовыми клетками иммунофенотип, экспрессируют антигены коллагенов I и III типов [9,

13], способны дифференцироваться, в том числе, в производные мезенхимы [15]. Количество подобных клеток увеличивается при иммуноселекции, хронических заболеваниях (в частности, при астме и фиброзе легких) или манипуляциях, способствующих их выходу в кровь из костного мозга [10, 16, 17, 20, 21].

В настоящее время активно изучается синдром несовершенного остеогенеза (НО), составляющий значительную долю среди всей наследственной патологии костной ткани, обладающий широкой степенью гетерогенности. Классификация D.O. Sillence, основанная на тяжести клинических проявлений заболевания, включала четыре типа (I—IV) НО [22]. В настоящее время номенклатура заболевания включает во-

семь типов, но все так же базируется в основном на его клинической картине. Из инструментальных методов в диагностике НО применяют рентгенологическое исследование костной ткани, определение ряда биохимических показателей. Однако при некоторых типах несовершенного остеогенеза плотность костной ткани может оставаться в пределах нормы [18].

Ранее было установлено, что у больных с НО применение интрамедуллярного биоактивного остеосинтеза способствует кратковременной коррекции скелетных деформаций [2]. В то же время после демонтажа аппарата Илизарова при тяжелой форме заболевания снова появлялись небольшие угловые деформации в местах костной мозоли, что свидетельствует о снижении механических свойств костной ткани.

С точки зрения клеточных технологий, в основе патологии ремоделирования костной ткани лежит дисбаланс взаимоотношений остеобластов и остеокластов. В связи с этим представляются весьма обоснованными попытки коррекции НО посредством трансплантации стромальных стволовых клеток [5]. Согласно идеологии, заложенной в основу таких методов, дефектные механоциты (пре- и остеобласты, хондробласты и др.) должны быть удалены из организма больного и заменены донорскими клетками [12]. В то же время вопросом, предваряющим проведение лечения, является поиск главного звена патогенеза, клеток-мишеней, ответственных за развитие клинической патологии.

Для фундаментальной и практической травматологии и ортопедии представляет несомненный интерес создание подходов, позволяющих моделировать *in vitro* молекулярные механизмы жизнедеятельности, диагностировать и прогнозировать вектор дифференцировки стволовых клеток при НО, оценивать функциональную активность как остеобластического, так и остеокластического клеточного дифферона.

Циркуляция в крови взрослых людей фракции остеобластоподобных клеток, составляющей при длительном культивировании в остеогенной среде 1—2% популяции мононуклеарных лейкоцитов и возрастающей при усилении ремоделирования костной ткани, показана в работе G.Z. Eghbali-Fatourech и соавт. [14].

В связи с вышеизложенным цель данного пилотного исследования — оценить *in vitro* возможную связь морфофункциональных параметров культуры

мононуклеарных клеток периферической крови с клиническими вариантами несовершенного остеогенеза и сроками реабилитационного периода (клиническим эффектом терапии).

## Материал и методы

Проведена серия последовательных операций пациентам с НО с целью исправления углообразных деформаций различных сегментов нижних конечностей — двойная остеотомия бедренных, большеберцовых костей с фиксацией аппаратом Илизарова, а также напряженное полисегментарное интрамедуллярное армирование спицами с кальций-фосфатным (КФ) покрытием.

Для интрамедуллярного остеосинтеза использовались спицы с биоактивным (КФ) покрытием, выполненным анодно-искровым способом. Имплантаты имеют регистрационное удостоверение Минздрава РФ № 29/12010200/1190-00 и сертификат соответствия ГОСТ Р № РОСС RU.АЯ 79.В55386.

Венозную кровь собирали, избегая гемолиза, выделяли плазму крови и замораживали образцы при температуре  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Перед проведением исследования все компоненты набора и исследуемая плазма крови выдерживались при комнатной температуре до достижения ими температуры  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Все образцы анализировались в дублях в соответствии с требованиями проведения анализа.

Мононуклеарные лейкоциты выделяли в стерильных условиях из периферической крови методом центрифугирования в течение 10 мин при 500g с использованием градиента плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ( $\rho = 1,077\text{ г/см}^3$ ). Взвесь клеток (жизнеспособность более 95%) культивировали в течение 72 ч при температуре  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$  в концентрации  $5 \cdot 10^6$  нуклеаров на 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-глутамина, 50 мг/л гентамицина сульфата, 10 ммоль бета-глицерофосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты,  $10^{-6}$  моль дексаметазона, 10 ммоль HEPES-буфера [1].

В качестве модельной культуры стромальных стволовых клеток применяли фибробластоидные клетки легкого человека (ООО «Банк стволовых клеток» (г. Томск)), которые клонировали в концентрации  $5 \cdot 10^4$  клеток на  $1\text{ см}^2$  в аналогичной культуральной

ной среде. Препараты после четырех-пяти пассажей представляют собой морфологически и функционально однородную популяцию клеток с ограниченным сроком жизни, сохраняющую при пассажах стабильный кариотип и онкогенно безопасную. Клетки свободны от посторонних вирусных (ВИЧ, гепатит, герпес и др.) и бактериальных (сифилис, микоплазмы, хламидии и др.) агентов. Жизнеспособность клеток, определяемая согласно ISO 10993-5 по исключению окрашивания в тесте с 0,4%-м трипановым синим, составила 91—93%. Супернатанты (кондиционные жидкости) получали путем забора надосадочной части клеточных культур, их центрифугирования в течение 10 мин при 500g.

В плазме крови и кондиционных средах клеточных культур оценивали маркеры костного ремоделирования (концентрации кальция, фосфора, остеокальцина, продуктов деградации коллагена I типа (CrossLaps), активность щелочной фосфатазы (ЩФ) и ее костной изоформы), как описано ранее [2]. Концентрацию свободного кальция и неорганического фосфора измеряли колориметрическим стандартным методом [6].

По окончании культивирования 24-луночные планшеты сушили на воздухе, клеточный материал фиксировали 30 с в парах формалина, окрашивали на неспецифическую эстеразу (НЭ) по способу Леффлера, щелочную фосфатазу методом азосочетания по G. Gomoi в модификации А.Г. Михеева или кислую фосфатазу (КФ-аза) методом азосочетания по А. Goldberg, Т. Varka [8]. Кроме того, для исследования морфологии прилипающих и неприлипающих клеток применяли окраску азуром II-эозином в течение 10 мин.

Клеточно-молекулярные показатели в крови и клеточных культурах разбивали на две группы: 1) маркеры метаболической активности клеток и деградации костного матрикса (концентрации кальция, фосфора, CrossLaps и процент фибробластоподобных клеток в культуре); 2) маркеры остеобластов и синтеза костного матрикса (концентрация остеокальцина и активность костной фракции ЩФ).

Статистическую обработку проводили с применением программы Statistica 6.0 for Windows. Для описания изменчивости количественных признаков использовали общепринятые статистические процедуры, включая расчет параметров распределений (средние значения, их ошибки). Проверку на нормальность рас-

пределений 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), регрессионный и корреляционный анализ по Спирмену. Различия считались достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Результаты представлены в виде  $X \pm m$ , где  $X$  — среднее арифметическое,  $m$  — ошибка среднего.

## Результаты

Была изучена клиническая картина четырех пациентов с различной выраженностью патологического процесса. Анализ клинических проявлений заболевания включал: оценку сроков манифестации заболевания; количество переломов; наличие признаков поражения соединительной ткани (голубые склеры, дефекты зубной эмали), степень выраженности скелетных деформаций, возможность передвижения и опороспособность конечностей, время, за которое удалось достигнуть промежуточного клинического эффекта — добиться опороспособности конечности, возможность стоять и ходить с помощью специальных приспособлений (ходунков).

**Пациент Ч.** 16 лет, с НО умеренной степени выраженности патологического процесса. Переломы развиваются после 2-го года жизни. Перенес более 25 переломов костей различной локализации. Перестал ходить, передвижение только на носилках или кресле, конечности неопороспособны. Развился постиммобилизационный остеопороз, отмечается избыточная масса тела, проявления гипоталамического синдрома (стрии, эпизоды артериальной гипертензии и т.д.). Белые склеры, эмаль зубов интактна. Деформации нижних конечностей умеренные. Диагноз: несовершенный остеогенез (по классификации Sillence IVA тип НО). Наружноротационная отводящая контрактура правого тазобедренного сустава. Разгибательная контрактура обоих тазобедренных суставов. Разгибательная контрактура обоих коленных суставов. Комбинированная контрактура обоих голеностопных суставов. В 2006 г. оперирован в Екатеринбурге, введены интрамедуллярно штифты в обе бедренные кости. Лечение: интрамедуллярное армирование обеих большеберцовых костей спицами с биоактивным покрытием, удален один из интрамедуллярных штифтов в левой бедренной кости.

Сроки промежуточного хирургического эффекта — 3,5 мес.

**Пациент В.** 8 лет, с тяжелой формой заболевания, переломы появились после 1-го года жизни, переломы длинных трубчатых костей 3—4 раза в год. Клинически: отстает в росте от сверстников на 4,1 стандартного отклонения не только за счет деформаций скелета, но и в результате выявленной в 2007 г. соматотропной недостаточности (стимулированная секреция соматотропного гормона в двух пробах менее 7,5 нг/мл). Получал терапию рекомбинантным гормоном роста (нордитропин). Имеются голубые склеры, *dentinogenesis imperfecta*, гиперметропия слабой степени, анемия 1-й степени смешанной этиологии нормохромная. По классификации Sillence III тип НО. Специфический семейный анамнез: отец и мать здоровы, неблизкородственный брак, по отцовской линии — накопление случаев патологии соединительной и костной ткани (у племянников голубые склеры, повышенная потливость, бочкообразная деформация грудной клетки, у сибсов деда отца — болезнь Бехтерева, остеосаркома).

Мальчик передвигается с помощью коляски, конечности до операций неопороспособны. Проведена серия корригирующих остеотомий: корригирующая резекция правой бедренной кости, чрескостный дистракционный остеосинтез (ЧКДО) правой бедренной кости. Напряженное интрамедуллярное армирование обеих большеберцовых костей спицами с КФ-покрытием. Коррекция деформаций в течение 38 дней, фиксация в течение 14 дней, затем через 2,5 мес после первой

операции — закрытый остеосинтез правой бедренной кости аппаратом Илизарова. Еще через 1 мес — корригирующая резекция левой бедренной кости, ЧКДО левой бедренной кости. Напряженное интрамедуллярное армирование левой бедренной кости с КФ-покрытием.

После серии оперативных вмешательств пациент способен передвигаться в специальных ходунках, конечности опороспособны, исправлены грубые деформа-

ции нижних конечностей. Проходит реабилитацию с применением медикаментозной коррекции (препараты кальция, активные метаболиты витамина D), массажа, методов лечебной физкультуры (ЛФК). Временной интервал, за который удалось корригировать деформации нижних конечностей и поставить больного на ноги, — 8 мес.

**Пациент С.** 28 лет с тяжелой формой заболевания, количество переломов — 6—7 в год. Множественные деформации конечностей, ребер, голубые склеры, *dentinogenesis imperfecta*. По классификации Sillence III тип НО. Операция: корригирующая остеотомия левой бедренной и большеберцовой костей. Напряженное интрамедуллярное армирование левого бедра. Коррекция деформации проводилась на голени в течение 56 дней, 8 дней фиксации, затем вновь коррекция в течение 87 дней, фиксация в течение 35 дней. Коррекция деформации на бедре проводилась в течение 56 дней, 12 дней фиксации, затем вновь коррекция в течение 56 дней, фиксация в течение 63 дней. Полная консолидация зон остеотомий не наступила.

После снятия аппарата Илизарова имел место рецидив деформации (умеренные осевые деформации), была наложена циркулярная гипсовая повязка. Конечность неопороспособна.

Через 1 мес после хирургической коррекции с использованием интрамедуллярного армирования спицами с КФ-покрытием биохимический профиль маркеров костеобразования также неблагоприятный: концентрация CrossLaps превышает нормативные значения на 70%, активность костной фракции щелочной фосфатазы выше нормы в 4 раза. Соотношение остеокальцина и CrossLaps составляет 13,3. Отсутствует реакция со стороны парацистовидных желез на гипокальциемию. В дальнейшем пациент находился дома, через год поступил для повторной серии корригирующих операций (всего восемь). Достигнуты следующие результаты: пациент впервые встал на ноги, конечности опороспособны (рис. 1).



Рис. 1. Состояние конечностей у пациента С. 28 лет до и после оперативного вмешательства. Выраженные угловые деформации нижних конечностей до операции (а), через 18 мес конечности опороспособны, пациент проходит курс физической реабилитации (б)

Проводится комплекс медикаментозной и физической реабилитации больного (массаж, ЛФК с индивидуальным инструктором). Срок промежуточного хирургического успеха — 18 мес.

**Пациентка Г.** 18 лет, после 1-го года жизни 2—3 раза в год возникали переломы большеберцовых, бедренных костей, ребер. Течение заболевания самое мягкое в сравнении с другими наблюдаемыми больными. По классификации Sillence IV тип НО. Передвигается с помощью костылей. Операция: двойная корригирующая остеотомия левой бедренной кости, левой малоберцовой кости, интрамедуллярное армирование обеих бедренных и большеберцовых костей. Проводилась коррекция деформации в течение 30 дней, срок фиксации составил 4,5 мес. Наступила консолидация зон остеотомий. Конечности опороспособны.

В контрольные сроки также регистрировалась гипокальциемия, маркеры остеогенеза ниже возрастной нормы, маркеры костной резорбции в норме. Соотношение остеокальцина и CrossLaps составляет 14,1. Темпы костного обмена по биохимическим маркерам ниже, чем у других наблюдаемых пациентов, что ассоциировано с более благоприятным клиническим течением заболевания, а также более гладким постоперационным периодом. Гипокальциемия в сочетании со сниженным уровнем паратгормона может указывать на вероятный гипопаратиреоз.

Временной интервал, за который удалось реабилитировать пациентку, — 4,5 мес. В связи с гормональными сдвигами девушка была исключена из дальнейшего исследования *in vitro*.

В качестве модельной культуры стромальных стволовых клеток применяли клетки легкого человека с фибробластоподобной морфологией (рис. 2). Согласно активности костной фракции ЩФ в общем пу-

ле активности секретируемой ЩФ чистота культуры составляла в среднем 88%. Костная ЩФ считается маркером остеобластов [3], дифференцирующихся в процессе культивирования из стромальных стволовых клеток. Другими клетками в культуре, судя по морфологии, были нейтрофилы и моноциты (макрофаги), производные кроветворной стволовой клетки.

Результаты показали (табл. 1), что в процессе культивирования стромальных стволовых клеток на пластике происходит снижение в культуральной среде средних значений концентрации кальция и фосфора, увеличение активности костной ЩФ и содержания остеокальцина. Согласно корреляционному анализу, в динамике культивирования клеток (4—8 сут) в кондиционной жидкости статистически значимо увеличивается активность ЩФ ( $r = 0,85; p < 0,007$ ), уменьшается содержание кальция ( $r = -0,85; p < 0,008$ ) и остеокальцина ( $r = -0,85; p < 0,008$ ). При этом обнаружено прямое снижение концентрации фосфора в среде с повышением активности ЩФ (рис. 3).

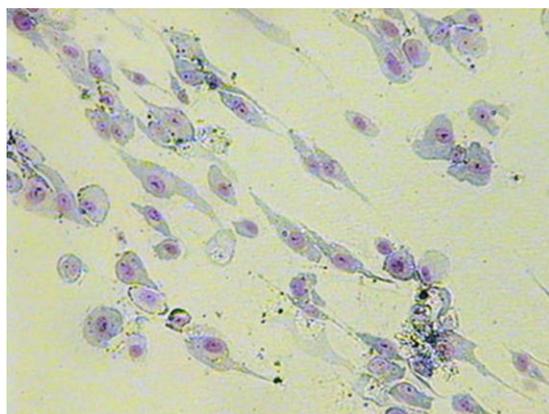


Рис. 2. Культура фибробластоподобных клеток легкого человека. Окраска азуром II-эозином. Ув. 400

Таблица 1

Изменение состава культуральной среды (% от исходного уровня) при культивировании фибробластоподобных клеток человека ( $X \pm m$ )

Показатель	Кальций, ммоль	Фосфор, ммоль	Остеокальцин, нг/мл	Костный изофермент щелочной фосфатазы, Ед/л
Культура клеток	92,48 ± 6,64 (n = 8)	97,68 ± 2,07 (n = 8)	202,54 ± 39,64 (n = 8)	110,18 ± 2,65 (n = 8)

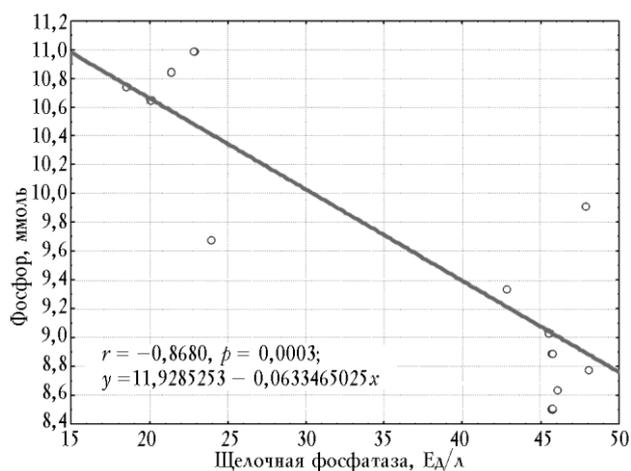


Рис. 3. Регрессионная зависимость концентрации фосфора в межклеточной среде от активности щелочной фосфатазы, секреторируемой в модельной культуре стромальных стволовых клеток человека

Интерпретация полученных результатов в соответствии с представлениями Б.Л. Риггз и соавт. [3] говорит о том, что в процессе краткосрочного культивирования стромальных стволовых клеток накапливаются поздние маркеры (ЩФ) их дифференцировки и созревания в остеобласты. ЩФ, по-видимому, способствует отложению фосфатов кальция, что не противоречит литературным данным [3]. При этом возрастающая в 1,5 раза концентрация CrossLaps (концевые фрагменты молекул коллагена) в супернатанте может свидетельствовать о начале формирования и ремоделирования коллагенового матрикса.

Вероятно, использованный состав культуральной среды, содержащей глицерофосфат и дексаметазон, действительно способствует формированию остеогенной клеточной культуры.

Согласно обзору Q. Не и соавт. [16], в периферической крови человека обнаружена очень малая популяция (менее 0,5 клетки на  $10^6$  мононуклеаров) ММСК, количество которых увеличивается при забо-

леваниях или манипуляциях, вызывающих мобилизацию клеток из костного мозга. Необходимо подчеркнуть, что циркуляция в крови колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф), считающихся аналогами ММСК [16], была установлена ранее [7].

Существует проблема нарушения структурно-функционального состояния костной ткани у пациентов с НО. Ранее в периферической крови больных НО были зафиксированы высокие уровни маркеров ремоделирования костной ткани [2]. По-видимому, многочисленные переломы и оперативные вмешательства приводят к тому, что в крови у больных НО обнаруживаются мононуклеарные клетки, которые при краткосрочном (2—4 сут) культивировании в остеогенной культуральной среде способны подвергаться бласттрансформации и принимать фибробластоподобную морфологию (рис. 4). Доля фибробластоподобных клеток варьировала от 4 (пациент Ч.) до 14% (пациент С.). Максимально выраженная фенотипическая трансформация клеток отмечалась у пациента с наиболее тяжелой клинической формой НО.

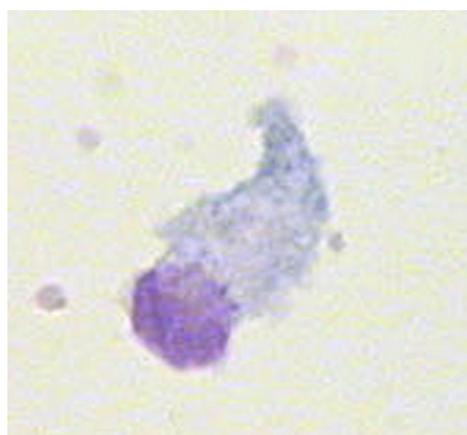
Фибробластоподобные клетки демонстрировали положительную окраску на КФ-азу (рис. 5) и НЭ (рис. 6), слабую (в виде отдельных гранул) — на ЩФ, что соответствует цитохимическому профилю КОЕ-Ф периферической крови человека [16].

Более того, секреторный статус мононуклеаров свидетельствовал об их остеогенном созревании (табл. 2). Также имела место реципрокная динамика содержания фосфора в среде и активности костной ЩФ (табл. 2), как и в модельной культуре стромальных стволовых клеток человека (см. рис. 3).

Тем не менее активность мононуклеаров у больных НО, связанная с формированием костного матрикса, оказалась менее выраженной, что было зафиксировано по малому усвоению фосфора и слабой секреции остеокальцина в сравнении с культурой стромальных стволовых клеток (табл. 1, 2). С другой стороны, концентрация CrossLaps (концевых фрагментов коллагена I типа) увеличивалась в 14—34 раза в зависимости от клинической тяжести НО (табл. 2), что могло быть связано с повышенной активностью лизосомальных ферментов клеток.



*а*



*б*

Рис. 4. Морфология бластных (*а*) и фибробластоидных (*б*) клеток, выросших в краткосрочной культуре мононуклеаров крови у больных несовершенным остеогенезом. Окраска азуром II-эозином. Ув. 750

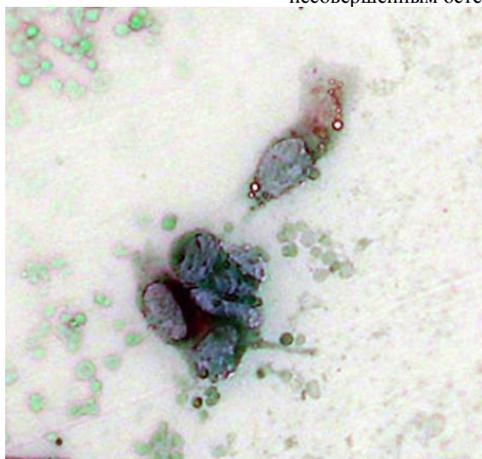


Рис. 5. Морфофункциональное состояние мононуклеарных лейкоцитов крови, окрашивающихся на кислую фосфатазу, у больных несовершенным остеогенезом. Ув. 400

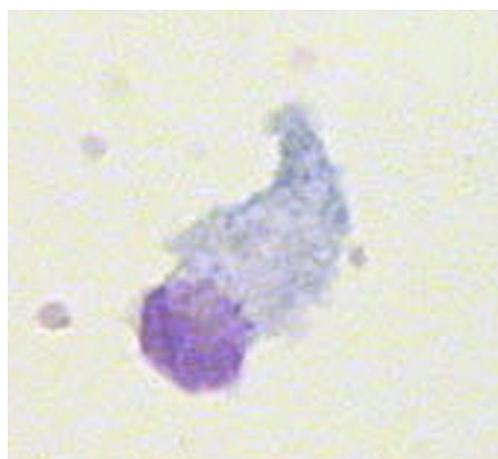


Рис. 6. Морфофункциональное состояние мононуклеарных лейкоцитов крови, окрашивающихся на неспецифическую эстеразу, у больных несовершенным остеогенезом. Ув. 400

Таблица 2

Динамика маркеров костного ремоделирования при культивировании мононуклеаров периферической крови пациентов с несовершенным остеогенезом, абс. (%)

Срок культивирования клеток, сут	Кальций, ммоль	Фосфор, ммоль	Остеокальцин, нг/мл	CrossLaps, нг/мл	Костный изофермент щелочной фосфатазы, Ед/л
	<i>Пациент Ч.</i>				
2	1,58 (114)	4,57 (123)	6,66 (128)	0,001 (100)	46,35 (123)
4	1,0 (72)	3,92 (105)	2,66 (51)	0,001 (100)	49,64 (132)
	<i>Пациент В.</i>				
2	1,48 (107)	4,18 (112)	5,05 (97)	0,014 (1400)	46,74 (124)
4	0,95 (68)	4,00 (107)	3,62 (70)	0,001 (100)	47,61 (126)
	<i>Пациент С.</i>				
2	1,54 (111)	4,41 (118)	5,70 (109)	0,030 (3000)	38,33 (102)
4	1,39 (100)	4,30 (115)	2,58 (50)	0,034 (3400)	45,75 (121)

Примечание. Представлены данные трех измерений; в скобках указан процент от уровня показателей в культуральной среде без клеток.

В связи с этим была составлена матрица признаков для выяснения связи клинической тяжести заболевания у больных НО, времени хирургического клинического успеха, индексов плазмы крови и культуры клеток (табл. 3) для проведения корреляционного и регрессионного анализов. Показатели были разбиты на две группы: 1) маркеры деградации костного матрикса; 2) маркеры остеобластов и синтеза костного матрикса. Фибробластоидные клетки были включены в первую группу, так как они окрашивались преимущественно на кислую фосфатазу, считающуюся маркером фиброкластов [4] и остеокластов [3], ремоделирующих межклеточный матрикс соединительной ткани и ее производных.

T-критерий Вилкоксона показал, что у пациента С., состояние которого характеризуется наиболее тяжелой степенью клинических проявлений заболевания и

длительным периодом достижения хирургического успеха, индексы первой группы статистически значимо превышали таковые у пациентов Ч. и В. ( $p < 0,04$ ). Однако на данном этапе исследований у больных НО не удалось выявить корреляционные и регрессионные зависимости клинических и лабораторных показателей снижения функции остеобластов и усиления деградации костного матрикса.

В то же время, согласно регрессионному анализу (рис. 7), активность костного изофермента ЩФ в супернатантах клеточных культур убывает по мере нарастания клинической картины НО. Если сравнивать результаты с поведением модельной культуры стромальных стволовых клеток (см. выше), описанные изменения активности фермента могут лежать в основе накопления в культуральной среде фосфора (табл. 3) как маркера нарушения минерализации костного матрикса.

Таблица 3

**Клинические показатели и маркеры костного ремоделирования в плазме крови и 4-суточной культуре мононуклеаров периферической крови у пациентов с несовершенным остеогенезом**

Показатель	Пациент Ч.	Пациент В.	Пациент С.
Клинические показатели:			
тяжесть заболевания, балл	1	2	3
время промежуточного хирургического успеха*, мес	3,5	8	18
Маркеры метаболической активности клеток и деградации костного матрикса:			
концентрация кальция в супернатанте культуры мононуклеаров крови, ммоль	1,0	0,95	1,39
концентрация фосфора в супернатанте культуры мононуклеаров крови, ммоль	3,92	4	4,3
уровень CrossLaps в плазме крови, нг/мл	0,509	0,468	2,324
уровень CrossLaps в супернатанте культуры мононуклеаров крови, нг/мл	0,001	0,001	0,034
фибробластоподобные клетки в культуре мононуклеаров крови, %	7	4	16
Маркеры остеобластов и синтеза костного матрикса:			
активность костного изофермента ЩФ в плазме крови, Ед/л	9,216	0,798	0,414
активность костного изофермента ЩФ в супернатанте культуры мононуклеаров крови, Ед/л	49,64	47,61	45,75
уровень остеокальцина в супернатанте культуры мононуклеаров крови, нг/мл	2,66	3,62	2,58

\* Время постановки больных на ноги в аппарате Илизарова.

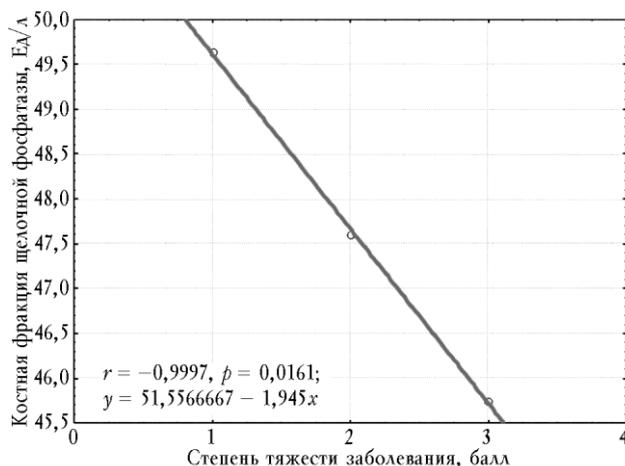


Рис. 7. Регрессионная зависимость активности костного изофермента щелочной фосфатазы в супернатантах культур мононуклеаров крови от степени тяжести несовершенного остеогенеза

## Заключение

Моделирование *in vitro* молекулярных механизмов жизнедеятельности стволовых клеток позволяет говорить о дисбалансе остеобластического и остеокластического дифферонов при НО.

В периферической крови больных НО циркулирует значительное количество клеток, проявляющих при культивировании *in vitro* в остеогенной среде фибробластоидную морфологию, окраску на кислую фосфатазу и неспецифическую эстеразу, выраженную активность в отношении секреции CrossLaps по мере нарастания клинической тяжести заболевания. В то же время созревание мононуклеаров крови в направлении остеобластов, зафиксированное по активности костного изофермента ЩФ, убывает в прямой зависимости от увеличения тяжести НО.

Описанные изменения морфофункциональных показателей культуры мононуклеарных клеток крови могут рассматриваться как вероятные маркеры и предикторы течения несовершенного остеогенеза и сроков реабилитации пациентов.

*Исследование выполнено при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2012 гг.» (государственный контракт № 02.512.11.2285 от 10.03.2009), грантов РФФИ № 09-04-99105-р\_офи и № 09-04-00287а.*

## Литература

1. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова. Томск: СТТ, 2004. 386 с.
2. Карлов А.В., Саприна Т.В., Кириллова Н.А. и др. Некоторые клинические и патофизиологические вопросы и перспективы хирургической коррекции остеопении у пациентов с несовершенным остеогенезом // Гений ортопедии. 2008. № 4. С. 84—88.
3. Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж. Остеопороз: пер. с англ. СПб.: БИНОМ; Невский диалект, 2000. 560 с.
4. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина, 1981. 312 с.
5. Сухих Г.Т., Малайцев В.Д., Богданова И.М., Дубровина И.В. Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. № 2. С. 124—131.
6. Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам: пер. с англ. / под ред. В.В. Меньшикова. М.: Юни-мед-Пресс, 2003. 943 с.
7. Фриденштейн А.Я., Лурия Е.А. Клеточные основы кровяного микроокружения. М.: Медицина, 1980. 216 с.
8. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.
9. Abe R., Donnelly S.C., Peng T. et al. Peripheral Blood Fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites // J. Immunol. 2001. V. 166. P. 7556—7562.
10. Aerts F., Wagemaker G. Mesenchymal stem cell engineering and transplantation // Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells / J.A. Nolte (ed.). Springer, 2006. P. 1—44.
11. Bucala R., Spiegel L.A., Chesney J. et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair // Molecular Medicine. 1994. V. 1, № 1. P. 71—81.
12. Chamberlain J.R., Schwarze U., Wang P.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta // Science. 2004. V. 303. P. 1198—1201.
13. Chesney J., Bacher M., Bender A., Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is potent antigen-presenting cell capable of priming native T cell in situ // PNAS. 1997. V. 94. P. 6307—6312.
14. Eghbali-Fatourehchi G.Z., Lamsam J., Fraser D. et al. Circulating osteoblast—lineage cells in humans // N. Engl. J. Med. 2005. V. 353. P. 737—738.
15. Gomperts B.N., Strieter R.M. Fibrocytes in lung disease // J. Leuk. Biol. Biol. 2007. V. 82. P. 449—456.
16. He Q., Wan C., Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood // Stem cells. 2007. V. 25. P. 69—77.
17. Moore B.B. Fibrocytes as potential biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis // Am. J. Resp. Crit. Care Med. 2009. V. 179. P. 524—525.
18. Paterson C.R., Mole P.A. Bone density in osteogenesis imperfecta may well be normal // Postgrad Med. J. 1994. V. 70. P. 104—107.
19. Pilling D., Vakil V., Gomer R.H. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes // J. Immunol. Methods. 2009. V. 351, № 1—2. P. 62—70.
20. Schmidt M., Sun G., Stacey M.A. et al. Identification of

**Хлусов И.А., Саприна Т.В., Нечаев К.А. и др. Морфофункциональные особенности культуры мононуклеарных клеток крови...**

- circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma // *J. Immunol.* 2003. V. 171. P. 380—389.
21. Shimizu N., Asai T., Hashimoto S. et al. Mobilization factors of peripheral blood stem cells in healthy donors // *Ther. Apher.* 2002. V. 6, № 6. P. 413—418.
22. Silience D.O., Senn A., Danks D.M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta // *J. Med. Genet.* 1979. V. 16. P. 101—116.
23. Zvaifler N.J., Marinova-Mutafchieva L., Adams G. et al. Mesenchymal precursors in the blood of normal individuals // *Arthritis Res.* 2000. V. 2. P. 477—488.

Поступила в редакцию 04.08.2010 г.

Утверждена к печати 28.09.2010 г.

#### **Сведения об авторах**

**И.А. Хлусов** — д-р мед. наук, профессор кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ, зам. директора Томского филиала РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий (г. Томск).

**Т.В. Саприна** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**К.А. Нечаев** — аспирант кафедры фармакологии СибГМУ (г. Томск).

**М.В. Дворниченко** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Н.М. Шевцова** — д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

**К.В. Зайцев** — канд. мед. наук, зав. лабораторией изучения механизмов действия физических факторов Томского НИИ курортологии и физиотерапии ФМБА России (г. Томск).

**А.В. Попков** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, врач Томского филиала РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий (г. Томск).

#### **Для корреспонденции**

**Хлусов Игорь Альбертович**, тел./факс (3822) 53-14-75, e-mail: khlusov63@mail.ru