

УДК 616-018.2-007.17:577.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-116–125

Для цитирования: Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Саприна Т.В., Пашкова Е.Н., Щербинко М.С., Хлусов И.А., Новицкий В.В. Клеточно-молекулярный скрининг дисплазии соединительной ткани у подростков-спортсменов (пилотное исследование). *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 116–125.

## Клеточно-молекулярный скрининг дисплазии соединительной ткани у подростков-спортсменов (пилотное исследование)

Дворниченко М.В.<sup>1</sup>, Сизикова А.Е.<sup>1</sup>, Саприна Т.В.<sup>1</sup>, Пашкова Е.Н.<sup>2</sup>,  
Щербинко М.С.<sup>1</sup>, Хлусов И.А.<sup>1,3</sup>, Новицкий В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)  
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

<sup>2</sup> Врачебно-физкультурный диспансер  
Россия, 634029, г. Томск, ул. Лебедева, 5в

<sup>3</sup> Балтийский федеральный университет имени И. Канта  
Россия, 236016, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

### РЕЗЮМЕ

**Цель работы** – оценить в крови клеточные и молекулярные показатели ремоделирования костной ткани как потенциальные маркеры недифференцированных форм дисплазии соединительной ткани.

**Материал и методы.** Проведено исследование структурно-функционального статуса клеточных элементов в культуре *in vitro* мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у подростков-спортсменов и фенотипических проявлений недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ). С помощью экспресс-анализа обследовано 25 учащихся спортивных школ в возрасте 10–14 лет (основные спортивные дисциплины: фигурное катание, гимнастика, легкая атлетика). Средний возраст обследованных составил  $(12,0 \pm 1,7)$  лет. Клиническое обследование подростков позволило ранжировать признаки НДСТ в анкетной шкале 4–11,5 баллов.

**Основные результаты.** Сопоставление результатов анкетного обследования и оценки дистантных маркеров ремоделирования костной ткани позволило выявить распределение подростков-спортсменов на две группы: с минимальными признаками НДСТ (сумма менее 7 баллов – 10 человек), с выраженным фенотипом НДСТ (сумма баллов  $\geq 7$ –15 человек). Установлено статистически значимое снижение концентрации CrossLaps (на 80%) и ионизированного кальция (на 5%) в крови подростков-спортсменов с выраженными диспластическими проявлениями. При краткосрочном 72-часовом культивировании мононуклеарных лейкоцитов в присутствии 3D-матрикса, имитирующего свойства минерального вещества регенерирующей костной ткани, обнаружены морфофункциональные особенности клеточной реакции у подростков-спортсменов с клиническими проявлениями НДСТ, а также гетерогенность клеточной популяции, связанная с появлением в крови клеток с остеобластоподобным фенотипом. Результаты проведенного исследования предполагают использование клеточных и молекулярных показателей ремоделирования костной ткани при скрининге механизмов и динамики развития диспластических нарушений у подростков-спортсменов.

**Ключевые слова:** недифференцированная дисплазия соединительной ткани, подростки-спортсмены, остеокальцин, остеобластоподобные клетки, периферическая кровь, мононуклеарные лейкоциты.

✉ Дворниченко Марина Владимировна, e-mail: dochic@yandex.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема клинически недифференцированных форм дисплазии соединительной ткани (НДСТ) в педиатрии обусловлена широкой распространенностью ее проявлений в популяции, варьирующей, по данным разных авторов, от 26 до 80% [1–5]. Внимание исследователей и клиницистов привлекает факт возрастного нарастания симптомов НДСТ с критическим периодом в возрасте 10–14 лет [2, 3]. Формирование диспластического фенотипа обусловлено генетически детерминированным изменением свойств соединительной ткани, связанным с нарушением состава и структурной организации внеклеточного матрикса, включая волокнистые структуры, гликозаминогликаны и гликопротеиды [1, 6–10].

В настоящее время не существует единого мнения о классификации, терминологии и диагностических критериях НДСТ. Согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), диспластически подобные состояния соединительной ткани выделены в рубрику Q65–Q79 «Врожденные аномалии и деформации костно-мышечной системы» класса «врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения» (Q00–Q99). Существующие методы диагностики направлены, прежде всего, на выявление определенных симптомов и синдромов НДСТ, в основе которых лежат оценка фенотипических проявлений по балльной системе или результаты инструментальных методов исследования [4, 11]. Так, существует двухэтапный скрининг-алгоритм, разработанный в 2014 г. комитетом экспертов педиатрической группы «Дисплазия соединительной ткани» при Российском научном обществе терапевтов с балльной системой оценки внешних и висцеральных признаков, характерных для НДСТ [4]. Преваляирование нарушений опорно-двигательного аппарата в фенотипических проявлениях НДСТ [3, 5, 12] требует оценки необходимости использования в диагностике дистантных показателей [13], активно применяющихся при патологии ремоделирования (самообновления) костной ткани (концентрация остеокальцина, CrossLaps, кальция и фосфора; активность общих фракций кислой фосфатазы (ОКФ) и щелочной фосфатазы (ОЩФ), а также их изоформ в периферической крови).

В предыдущей работе показано, что интерпретация дистантных маркеров ремоделирования костной ткани у детей и подростков во многом обусловлена клинической ситуацией и возрастом обследуемых [13]. Для подростков 10–14 лет ин-

тенсивные физические нагрузки в период активно растущего и формирующегося скелета могут провоцировать прогрессирование и (или) клиническую манифестацию НДСТ.

Цель исследования – оценить в крови клеточные и молекулярные показатели ремоделирования костной ткани как потенциальные маркеры недифференцированных форм дисплазии соединительной ткани.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 25 детей и подростков в возрасте 10–14 лет, учащиеся спортивных школ (основные спортивные дисциплины: фигурное катание, гимнастика, легкая атлетика). Выбор в качестве объекта исследования подростков-спортсменов обусловлен спецификой данных видов спорта, в которых фенотипические проявления НДСТ являются одним из факторов выбора спортивной карьеры. Среди обследованных девочки составили 84%, мальчики – 16%, средний возраст ( $12,0 \pm 1,7$ ) лет.

Обследование подростков проводилось на базе Областного государственного автономного учреждения здравоохранения «Врачебно-физкультурный диспансер» в 2015–2016 гг. Все пациенты были проинформированы об особенностях проводимых диагностических манипуляций согласно этическим требованиям [14].

Основные критерии включения: наличие информированного согласия, обучение в спортивной школе в течение трех и более лет, отсутствие дифференцированных форм дисплазии соединительной ткани. Критерии исключения из программы исследования: период обострения хронических воспалительных заболеваний; наличие дифференцированной формы дисплазии соединительной ткани; аутоиммунные, наследственные и психические заболевания, злокачественные новообразования, алкогольная и наркотическая зависимости; отсутствие информированного согласия.

Оценка фенотипических проявлений НДСТ проводилась по балльной системе в соответствии с алгоритмом, разработанным комитетом экспертов педиатрической группы «дисплазия соединительной ткани» при Российском научном обществе терапевтов от 2014 г. [4] в авторской модификации. Например, признак долихостеномии выявлялся при измерении соотношений длин кисти или стопы к росту, размаха рук к росту и верхнего сегмента к нижнему. Так, оценивалось каждое соотношение в 1 балл при условии, если

оно выходило за рамки нормальных значений. В заключительный алгоритм было взято 18 признаков НДСТ (костно-суставные: гипермобильность суставов, долихостеномилия, арахнодактилия, деформация грудной клетки и эктодермальные: растяжимость кожи, видимая венозная сеть и др.). Максимальная сумма возможных баллов по разработанной системе составила 23 балла. По итогам скрининга наивысшая сумма баллов у обследованных подростков-спортсменов не превышала 11,5.

Периферическую кровь получали из локтевой вены, собирали в пробирки типа vacuette с гепарином (BD Diagnostics, США). Для выделения фракции мононуклеарных лейкоцитов кровь в стерильных условиях наслаивали на градиент плотности (фиколл,  $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$ , ООО «Биолот», Россия), центрифугировали в течение 10 мин при 500 g с последующим двукратным отмыванием клеточного материала фосфатно-солевым буфером.

Взвесь мононуклеаров помещали (при плотности  $1,5 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/лунку) в 1 мл культуральной среды, культивировали в 12-луночных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) в течение 72 ч при температуре  $37^\circ\text{C}$  и 100%-й влажности. Полная культуральная среда готовилась по стандартным протоколам в модификации [15]. В качестве 3D-матрикса, имитирующего свойства минерального вещества регенерирующей костной ткани, в лунки помещали экспериментальные образцы размером  $12 \times 12 \times 1 \text{ мм}^3$  из коммерчески чистого титана, несущие двустороннее покрытие из фосфатов кальция, полученное методом микродугового оксидирования в электролите. Процесс получения и свойства покрытия описаны ранее [16]. Контролем служил рост клеток на пластике.

В плазме крови и супернатантах клеточных культур методом ИФА с реактивами IDS (Великобритания) оценивали маркеры костного ремоделирования: концентрацию остеокальцина и С-концевых фрагментов молекул коллагена I типа (CrossLaps). Активность ОКФ и ОЩФ, концентрации общего кальция и неорганического фосфора определяли стандартным колориметрическим методом [17] реактивами Thermo Fisher Scientific (США). Все манипуляции проводились согласно изложенному алгоритму в инструкции производителя. Супернатанты (кондиционные жидкости) получали путем забора надосадочной части клеточных культур, их центрифугирования в течение 10 мин при 500 g.

Для иммуноцитохимических исследований планшеты сушили на воздухе в течение 24 ч.

Фиксацию и пермеабиллизацию клеток проводили в холодном этаноле ( $-20^\circ\text{C}$ ) в течение 1 мин, затем промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Дальнейшие этапы проводились при комнатной температуре ( $25^\circ\text{C}$ ) в соответствии с рекомендациями производителей антител (Epitomics®, clone Rb4507, рабочий титр 1 : 50; США). Использовались поликлональные IgG кролика к остеокальцину человека. Обнаружение DAB-позитивной реакции осуществляли с помощью поливалентной визуализирующей системы Novocastra NOVOLINK™ на основе Novolink Compact Polymer™. Негативным контролем окрашивания служила тест-система без антител.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica for Windows 6.0. Проверка выборки на нормальность проводилась с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. В связи с тем, что данные не подчинялись нормальному закону, для описания статистических различий использовался критерий Манна – Уитни (U-тест). Данные выражали как медиану (*Me*), 25%-й ( $Q_1$ ) и 75%-й ( $Q_3$ ) квартили. Оценка взаимосвязи показателей проводилась посредством рангового коэффициента корреляции (*r*) по Спирмену. Корреляционная связь оценивалась как сильная ( $r > 0,75$ ), умеренная ( $0,25 < r < 0,75$ ) и слабая ( $r < 0,25$ ). Уровень статистической значимости принимался при  $p < 0,05$  [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с неоднозначной интерпретацией клинических признаков НДСТ, высокой частотой манифестации дисплазии в виде нарушений опорно-двигательного аппарата в настоящем исследовании была проанализирована связь результатов клинического осмотра и дистантных маркеров ремоделирования костной ткани в крови. На рис. 1 представлен характер изменений общепринятых показателей формирования и резорбции костной ткани (остеокальцин, рис. 1, а; CrossLaps, рис. 1, б) в зависимости от суммы баллов клинической оценки признаков НДСТ у подростков-спортсменов.

Согласно полученным данным, реперной точкой (точкой экстремума) в диагностической шкале НДСТ у подростков-спортсменов является граница 7 баллов, при которой уровень остеокальцина и CrossLaps в плазме крови достигал минимальных значений у обследованных. Это позволило сформировать рабочую гипотезу о возможности ранжирования подростков-спортсменов на две группы: без выраженных (сумма менее 7 баллов;

10 человек) проявлений и с явными (сумма баллов  $\geq 7$ ; 15 человек) признаками НДСТ.

В табл. 1 представлена сравнительная оценка дистантных маркеров метаболизма костной ткани у подростков-спортсменов в зависимости от степени выраженности признаков дисплазии соединительной ткани. Обнаружено статистически зна-

чимое снижение в крови концентрации CrossLaps (на 80%) и ионизированного кальция (на 5%) у спортсменов с диспластическими проявлениями ( $\geq 7$  баллов) по сравнению с обследованными без признаков дисплазии (менее 7 баллов). Результаты корреляционного анализа выявили сопряженность в каждой группе спортсменов (табл. 1).

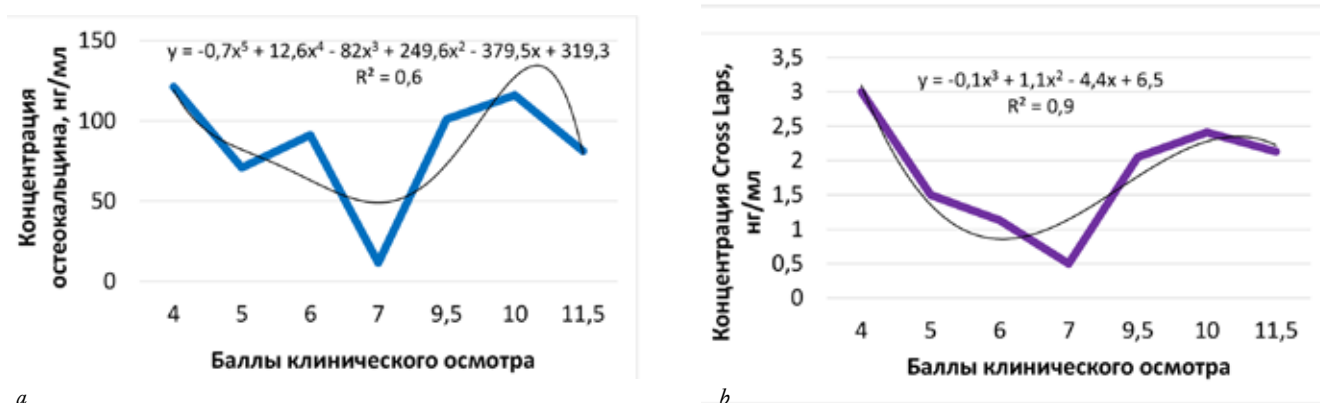


Рис. 1. Распределение и аппроксимация показателей ремоделирования костной ткани в плазме крови у подростков-спортсменов 10–14 лет в зависимости от анкетной оценки проявлений дисплазии соединительной ткани: *a* – остеокальцин; *b* – CrossLaps  
Fig. 1. Distribution and approximation of bone tissue remodeling indices in the blood among adolescent athletes aged 10–14 years, depending on the questionnaire evaluation of phenotypic manifestations of connective tissue dysplasia: *a* – osteocalcin; *b* – CrossLaps

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика дистантных маркеров ремоделирования костной ткани в крови и внутригрупповые корреляции у подростков-спортсменов в зависимости от степени выраженности признаков недифференцированной дисплазии соединительной ткани, <i>Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)</i>		
Показатель	Спортсмены без выраженных признаков НДСТ, <i>n</i> = 10 (сумма баллов <7)	Спортсмены с признаками НДСТ, <i>n</i> = 15 (сумма баллов $\geq 7$ )
Остеокальцин, нг/мл	111,7 (94,4; 114,0)	94,6 (66,6; 108)
CrossLaps, нг/мл	2,3 (1,9; 2,6)	1,3* (1,0; 2,01)
Общая фракция щелочной фосфатазы, МЕ	279 (250,5; 357,5)	265 (157; 279)
Общая фракция кислой фосфатазы, МЕ	19,7 (15,1; 23,05)	21,7 (17,5; 25,4)
Кальций общий, мМ	2,49 (2,40; 2,51)	2,39 (2,31; 2,48)
Кальций ионизированный, мМ	1,19 (1,18; 1,28)	1,13* (1,08; 1,17)
Фосфор, мМ	1,51 (1,41; 1,74)	1,4 (1,32; 1,48)
Внутригрупповые корреляционные связи по Спирмену	Остеокальцин – кальций общий ( $r = 0,90$ ; $p < 0,05$ )	CrossLaps – остеокальцин ( $r = 0,89$ ; $p < 0,01$ )
	ОЩФ – кальций ионизированный ( $r = 0,90$ ; $p < 0,05$ )	

Примечание. *n* – число обследованных пациентов.

\*статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия с соответствующими данными в группе спортсменов без выраженного диспластического фенотипа согласно U-критерию Манна – Уитни.

При минимальных проявлениях НДСТ (4–6 баллов) регистрировались сильные ассоциации метаболических показателей формирования костной ткани (остеокальцин, ОЩФ) с уровнем кальция (общего или ионизированного) в крови, что свидетельствует о высокой интенсивности синтетических процессов в паттерне ремоделирования костной ткани при высоком содержании CrossLaps,

свидетельствующем о катаболизме зрелого коллагена. Для подростков-спортсменов с выраженными диспластическими признаками (сумма баллов клинической оценки  $\geq 7$ ) низкий уровень CrossLaps был сопряжен с относительным снижением концентрации остеокальцина. Полученные данные, возможно, связаны с уменьшением активности костного ремоделирования и утратой фазового

характера процессов формирования или резорбции костной ткани, что характерно для диспластических изменений [3, 6]. Кроме этого, снижение уровня ионизированного кальция в крови у спортсменов с выраженным диспластическим фенотипом свидетельствует о дисбалансе процессов минерализации костной ткани [19].

Согласно проведенным ранее исследованиям [20, 21], наличие локальной взаимосвязанной системы регуляции структурно-функционального статуса клеток костной ткани и системы крови (особенно в процессе их дифференцировки) может стать основой для разработки методологических подходов к оценке процессов ремоделирования кости в норме и при патологии с использованием культуры *in vitro* мононуклеарных лейкоцитов периферической крови.

В связи с этим была проведена оценка структурно-функционального состояния мононукле-

арных лейкоцитов крови в культуре клеток *in vitro* при постановке сравнительного эксперимента в 2D-системе (пластиковая поверхность культуральной посуды) и 3D-системе (в присутствии 3D-матрикса, имитирующего свойства минерального вещества регенерирующей костной ткани).

В табл. 2 и 3 представлены сравнительные данные краткосрочного культивирования мононуклеаров крови в 2D- и 3D-системах в зависимости от степени клинических проявлений диспластического фенотипа. Для подростков-спортсменов с минимальными проявлениями диспластического фенотипа (сумма баллов <7), в кондиционной жидкости обнаружено статистически значимое снижение содержания общего (на 5,7 %) и ионизированного кальция (на 12%), увеличение активности ОЩФ (на 3%), обусловленное 3D-культивированием клеток (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Молекулярные показатели в супернатантах краткосрочной культуры мононуклеаров у подростков-спортсменов без выраженных клинических проявлений дисплазии соединительной ткани (сумма баллов клинической оценки 4–6), $Me (Q_1; Q_3)$		
Показатель	2D-культура клеток, $n = 10, N = 30$	3D-культура клеток, $n = 10, N = 10$
Остеокальцин, нг/мл	11,08 (10,8; 11,8)	10,96 (8,7; 11,08)
Общая фракция щелочной фосфатазы, МЕ	103 (89; 104)	106* (92; 109)
Общая фракция кислой фосфатазы, МЕ	0,2 (0,2; 0,3)	0,3 (0,3; 0,3)
Кальций общий, мМ	1,52 (1,52; 1,53)	1,44* (1,34; 1,48)
Кальций ионизированный, мМ	1,25 (1,23; 1,30)	1,1* (1,08; 1,11)
Калий, мМ	5,8 (5,6; 5,8)	5,7 (5,7; 5,8)
Фосфор, мМ	1,41 (1,38; 1,42)	1,42 (1,35; 1,46)

П р и м е ч а н и е.  $n$  – число обследованных пациентов;  $N$  – количество исследованных проб.

\*  $p < 0,05$  в сравнении с 2D-культурой клеток согласно U-критерию Манна – Уитни.

Т а б л и ц а 3

Молекулярные показатели в супернатантах краткосрочной культуры мононуклеаров у подростков-спортсменов с выраженными клиническими диспластическими изменениями (сумма баллов клинической оценки $\geq 7$ ), $Me (Q_1; Q_3)$		
Показатель	2D-культура клеток, $n = 15, N_{\text{проб}} = 45$	3D-культура клеток, $n = 15, N_{\text{проб}} = 15$
Остеокальцин, нг/мл	9,2 (7,5; 9,5)	8,3 (8,1; 11,7)
Общая фракция щелочной фосфатазы, МЕ	91 (84; 96)	90 (88; 95)
Общая фракция кислая фосфатазы, МЕ	0,3 (0,2; 0,3)	0,4* (0,3; 0,5)
Кальций общий, мМ	1,52 (1,49; 1,53)	1,43* (1,36; 1,45)
Кальций ионизированный, мМ	1,34 (1,3; 1,35)	1,07* (1,04; 1,09)
Калий, мМ	5,5 (5,5; 5,7)	5,7* (5,6; 5,7)
Фосфор, мМ	1,41 (1,37; 1,42)	1,39 (1,36; 1,46)

П р и м е ч а н и е.  $n$  – число обследованных пациентов;  $N$  – количество исследованных проб.

\*  $p < 0,05$  в сравнении с 2D-культурой клеток согласно U-критерию Манна – Уитни.

Для обследованных подростков-спортсменов с выраженным диспластическим фенотипом (сумма баллов  $\geq 7$ ) были установлены во многом аналогичные изменения (см. табл. 3) со стороны показателей минерального обмена. Зафиксировано уменьшение концентрации общего и ионизиро-

ванного кальция на 5,9 и на 20,2% от соответствующих уровней в 2D-культуре (см. табл. 3). С другой стороны, отмечено повышение активности ОКФ (на 33%), но не ОЩФ, а также содержания калия (на 3,6%) в сравнении с показателями культуры на пластике.

Снижение фракций кальция можно ассоциировать с формированием малорастворимых фосфатов кальция, выпадающих в осадок на модельных дисках и самих клетках, выступающих в качестве центров кристаллизации. Подобные метаболические процессы характерны для *in vitro* культур стромальных стволовых клеток, созревающих в остеобласты [22]. Активность ОКФ и ОЩФ обусловлена наличием в культуре не только лимфоцитов, моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов (до 10% от состава клеточной популяции мононуклеарной фракции крови), но и клеток с вектором остеобластной и (или) остеокластной дифференцировки [23].

Выход калия из клеток в межклеточную жидкость в зависимости от выраженности процесса можно рассматривать как маркер активации клеток (потенциал действия) и (или) цитолиза (повреждения плазматических мембран). Как следствие представленных выкладок, в клинической динамике НДСТ у подростков-спортсменов меняется характер клеточно-молекулярной реакции на 3D-матрикс, имитирующий минеральное вещество костной ткани: к остеобластоподобным функциональным проявлениям при сумме баллов клинической оценки  $\geq 7$  добавляются признаки остеокластоподобной активности.

С помощью специфических моноклональных антител был проведен иммуноцитохимический анализ мононуклеарной фракции лейкоцитов, прилипающих к пластику, на специфический маркер остеобластов (остеокальцин, ОК). До этапа культивирования *in vitro* ОК-позитивные клетки не обнаруживались. После краткосрочного (3 сут) культивирования мононуклеаров периферической крови как в 2D-, так и 3D-системе были зарегистрированы единичные клетки, позитивно окрашивающиеся на остеокальцин (рис. 2).



Рис. 2. Остеокальцин-позитивные клетки в 2D- и 3D-культурах мононуклеарных лейкоцитов крови. Иммуноцитохимическая окраска, увеличение 100

Fig. 2. Osteocalcin-positive cells in 2D- and 3D-cultures of mononuclear blood leukocytes. Immunocytochemical staining, increase 100

Полученные данные согласуются с мнением [24, 25] о существовании в периферической крови 0,5–1% циркулирующих клеток, имеющих фи-

бробластоподобную морфологию (ранее называемых «фиброциты») с иммунофенотипом CD44+, CD106+, CD29+, CD34-, CD45-, CD14-, способных адгезировать к поверхности лабораторного пластика, дифференцироваться в фибробластическом, остеобластическом, хондробластическом направлениях [26–28].

Таким образом, у подростков-спортсменов с НДСТ выявляются *in vitro* клетки крови, положительно окрашивающиеся на остеокальцин. При этом в случае слабо выраженных клинических проявлений НДСТ (в диапазоне 4–6 баллов), добавление 3D-матрикса к культуре мононуклеарных лейкоцитов способствует проявлению метаболических признаков остеобластоподобных клеток (рост активности щелочной фосфатазы, снижение концентрации кальция в межклеточной жидкости). Мононуклеары крови подростков-спортсменов с выраженной НДСТ (сумма баллов клинической оценки  $\geq 7$ ) реагируют на 3D-раздражитель усилением как остеобластоподобной (уменьшение уровня кальция в межклеточной жидкости), так и остеокластоподобной функции (рост активности кислой фосфатазы).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования установили возможность использования клеточных и молекулярных показателей ремоделирования костной ткани в системе скрининга механизмов и динамики развития диспластических нарушений у подростков-спортсменов. Полученные данные позволяют интерпретировать 3D-систему культивирования мононуклеарных лейкоцитов как экспериментальную *in vitro* модель системы «кровь – кость» в условиях физиологического (патологического) паттернов ремоделирования костной ткани у подростков-спортсменов. Выявление чувствительности и специфичности установленных маркеров в качестве потенциальных диагностических и прогностических критериев НДСТ требуют расширения выборки исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Дворниченко М.В. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных Сизикова А.Е. – разработка дизайна исследования, подготовка текста статьи Саприна Т.В. – анализ и интерпретация данных,

проверка критически важного интеллектуального содержания Пашкова Е.Н. – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания Щербинко М.С. – разработка дизайна исследования, подготовка текста статьи Хлусов И.А. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания Новицкий В.В. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК» (договор №10490ГУ2/2015).

## СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (заключение № 1646 от 25.10.2010).

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Баклунов В.В. Системная дисплазия соединительной ткани – один из важных факторов формирования рецидивирующего бронхита у детей // *Современная педиатрия*. 2006; 4: 193–195.
2. Baklunov V.V. Sistemnaya displaziya soedinitel'noy tkani – odin iz vazhnykh faktorov formirovaniya retsidiviruyushchego bronkhita u detey // *Sovremennaya pediatriya*. 2006; 4: 193–195 (in Russian).
3. Дедова В.О., Доценко Н.Я., Боев С.С., Шехунова И.А., Герасименко Л.В. Распространенность дисплазии соединительной ткани (обзор литературы) // *Медицина и образование в Сибири*. 2011; (2): 6–17.
4. Dedova V.O., Dotsenko N.Ya., Boev S.S., Shekhunova I.A., Gerasimenko L.V. Rasprostranennost' displazii soedinitel'noy tkani (obzor literatury) [Prevalence of connective tissue dysplasia (Review)] // *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2011; (2): 6–17 (in Russian).
5. Клеменов А.В., Суслов А.С. Наследственные нарушения соединительной ткани: современный подход к классификации и диагностике (обзор) // *Соврем. техн. мед.* 2014; 6 (2): 127–132.
6. Klemenov A.V., Suslov A.S. Nasledstvennyye narusheniya soedinitel'noy tkani: sovremennyy podkhod k klassifikatsii i diagnostike (obzor) [Hereditary Connective Tissue Disorders: a Modern Approach to Classification and Diagnosis (Review)] // *Sovrem. tekhnol. med.* 2014; 6 (2): 127–132 (in Russian).
7. Кадурина Т.И., Гнусаев С.Ф., Аббакумова Л.Н., Алимова И.А., Антонова Н.С., Апенченко Ю. С., ... Кудинова Е.Г. Наследственные и многофакторные нарушения соединительной ткани у детей алгоритмы диагностики. Тактика ведения проект российских рекомендаций разработан комитетом экспертов педиатрической группы «Дисплазия соединительной ткани» при российском обществе терапевтов // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2015; 10 (1 (37)).
8. Kadurina T.I., Gnusaev S.F., Abbakumova L.N., Alimova I.L., Antonova N.S., Apenchenko Yu.S., ... Kudinova E.G. Nasledstvennyye i mnogofaktornyye narusheniya soedinitel'noy tkani u detey algoritmy diagnostiki. Taktika vedeniya proekt rossiyskikh rekomendatsiy razrabotan komitetom ekspertov pediatricheskoy gruppy «Displaziya soedinitel'noy tkani» pri rossiyskom nauchnom obshchestve terapevtov [Hereditary And Multivariate Connective Tissue Disorders in Children Algorithm of Diagnosis. Management Tactics Draft Russian Recommendations Developed by The Expert Committee Of Pediatric Group «Connective Tissue Dysplasia» at The Russian Scientific Society of Physicians] // *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2015; 10 (1 (37)) (in Russian).
9. Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней // *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26 (3–2): 9–12.
10. Yakovlev V.M., Nechaeva G.I. Sistemnyye displazii soedinitel'noy tkani: aktual'nost' problemy v klinike vnutrennikh bolezney [Systemic Dysplasia Of Connective Tissue: The Clinical Significance Of The Problem For Internal Diseases] // *SMZb*. 2011, 26 (3–2): 9–12 (in Russian).
11. Птицына И.А. Возможные механизмы возникновения дисплазии соединительной ткани // *Научные итоги года: достижения, проекты, гипотезы*. 2015; (5): 64–69.
12. Ptitsyna I.A. Vozmozhnyye mekhanizmy vzniknoveniya displazii soedinitel'noy tkani // *Nauchnyye itogi goda: dostizheniya, proekty, gipotezy*. 2015; (5): 64–69 (in Russian).
13. Indumati V., Patil V.S. Biochemical markers of bone remodelling in osteoporosis // *J. Clinical Diagnostic Res*. 2010; (3): 2089–2097.
14. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview // *Front Biosci*. 2006; 11 (1): 1696–1701. DOI: 10.2741 / 1915.
15. Allen-Brady K., Norton P., Farnham J., Teerlink C., Cannon-Albright L. Significant linkage evidence for a predisposition gene for pelvic floor disorders on chromosome 9q21 // *The American Journal of Human Genetics*. 2009; 84 (5): 678–682. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.04.002.
16. Zweers M., Dean W., van Kuppevelt T., Bristow J., Schalkwijk J. Elastic fiber abnormalities in hypermobility type Ehlers-Danlos syndrome patients with tenascin-X mutations // *Clinical Genetics*. 2005; 67 (4): 330–334. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2005.00401.x.
17. Анастасьева В.Г., Белан Ю.Б., Бржеский В.В., Викторова И.А., Верещагина Г.Н., Высокогорский В.Е.,

- ... Громова О.А. Наследственные нарушения соединительной ткани. Российские рекомендации // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; (3): 24.
- Anastas'eva V.G., Belan Yu.B., Brzheskiy V.V., Viktorova I.A., Vereshchagina G.N., Vysokogorskiy V.E., ... Gromova O.A. Nasledstvennye narusheniya soedinitel'noy tkani. Rossiyskie rekomendatsii // *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2009; (3): 24 (in Russian).
12. Демидов Р.О., Лапшина С.А., Якупова С.П., Мухина Р.Г. Дисплазия соединительной ткани: современные подходы к клинике, диагностике и лечению // *ПМ*. 2015; 4–2: 37–40.
- Demidov R.O., Lapshina S.A., Yakupova S.P., Mukhina R.G. Displaziya soedinitel'noy tkani: sovremennye podkhody k klinike, diagnostike i lecheniyu [Connective tissue dysplasia: current approaches to the clinic, diagnosis and treatment] // *PM*. 2015; 4–2: 37–40 (in Russian).
13. Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Дмитриева Л.А., Хмель А.А., Саприна Т.В., Хлусов И.А. Характеристика маркеров нормального и патологического ремоделирования костной ткани в крови детей и подростков // *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (3): 24–32. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-24-32.
- Dvornichenko M.V., Sizikova A.E., Dmitrieva L.A., Khmel' A.A., Saprina T.V., Khlusov I.A. Kharakteristika markerov normal'nogo i patologicheskogo remodelirovaniya kostnoy tkani v krovi detey i podrostkov [Age-related features of peripheral blood markers in children and young adults with normal and pathological remodeling of bone tissue] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2016; 15 (3): 24–32 (in Russian). DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-24-32
14. World Medical Association (WMA). Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects // *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik*. 2009;14 (1). DOI: 10.1515/9783110208856.233.
15. Khlusov I.A., Ryazantseva N.V., Vengerovskii A.I., Nechaev K.A., Yakushina V.D., Dvornichenko M.V., Sharkeev Yu.P., Legostayeva E.V., Novitskii V.V. Modulating effect of matrices with calcium phosphate coating on cytotoxicity of strontium ranelate and ibandronic Acid in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014; 157 (2): 215–219. DOI: 10.1007/s10517-014-2528-7.
16. Sharkeev Y., Legostaeva E., Eroshenko Y., Khlusov I., Kashin O. The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured Titanium–Calcium-Phosphate Coating // *Composite Interfaces*. 2009; 16 (4–6): 535–546. DOI: 10.1163/156855409x447174.
17. Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.: Лабинформ, 2006: 960.
- Tits N. Klinicheskoe rukovodstvo po laboratornym testam // М.: Labinform Publ., 2006: 960 (in Russian).
18. Mukaka M.M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research // *Malawi Medical Journal*. 2012; 24: 69–71.
19. Мохан Р., Глессон М., Гринхafft П.Л. Биохимия мышечной деятельности и физической тренировки: пер. с англ. Киев: Олимпийская литература, 2001: 296.
- Mokhan R., Glesson M., Grinkhaff P.L. Biokhimiya myshechnoy deyatelnosti i fizicheskoy trenirovki: per. s angl. Kiev: Olimpiyskaya literatura Publ., 2001: 296 (in Russian).
20. Хлусов И.А., Нечаев К.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю., Дворниченко М.В., Зайцев К.В., Колокольцова Т.Д., Больбасов Е.Н., Шаркеев Ю.П., Легостаева Е.В., Сабурин И.Н. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека // *Гены и клетки*. 2010; 5 (4): 72–78.
- Khlusov I.A., Nechaev K.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Yu., Dvornichenko M.V., Zaytsev K.V., Kolokol'tsova T.D., Bol'basov E.N., Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Saburina I. N. K voprosu o fibroblastopodobnykh kletkakh v perifericheskoy krovi cheloveka [As to a problem of fibroblast-like cells in human peripheral blood] // *Geny i kletki*. 2010; 5 (4): 72–78 (in Russian).
21. Хлусов И.А., Саприна Т.В., Нечаев К.А., Дворниченко М.В., Шевцова Н. М., Зайцев К.В., Попков А.В. Морфофункциональные особенности культуры мононуклеарных клеток крови у больных несовершенным остеогенезом: клинико-диагностическое наблюдение // *Бюллетень сибирской медицины*. 2010; 9 (6): 71–79.
- Khlusov I.A., Saprina T.V., Nechaev K.A., Dvornichenko M.V., Shevtsova N.M., Zaytsev K.V., Popkov A.V. Morfofunktsional'nye osobennosti kul'tury mononuklearnykh kletok krovi u bol'nykh nesovershennym osteogenezom: kliniko-diagnosticheskoe nablyudenie [Morphofunctional features of blood mononuclear cells culture in patients with osteogenesis imperfecta: clinicodiagnostic observation] // *Byul. sib. meditsiny*. 2010; 9 (6): 71–79 (in Russian).
22. Khlusov I., Khlusova M., Zaitsev K. et al. Pilot in vitro study of the parameters of artificial niche for osteogenic differentiation of human stromal stem cell pool // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011; 150 (4): 535–542. DOI: 10.1007/s10517-011-1184-4.
23. Хлусов И.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю., Зайцев К.В., Шаркеев Ю.П., Пичугин В.Ф., Легостаева Е.В. Концепция «ниша-рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кроветворной тканей // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011; 6 (2): 55–64.
- Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Yu., Zaytsev K.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V. Kontseptsiya "nisha-rel'ef" dlya stvolovykh kletok kak osnova biomimeticheskogo podkhoda k inzhenerii kostnoy i krovotvornoy tkaney ["Niche – relief" conception for stem cells as a basis of biomimetic approach to bone and hemopoietic tissues engineering] // *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011; 6 (2): 55–64 (in Russian).
24. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. Фибробласт-специализированная клетка или функциональное



- состояние клеток мезенхимного происхождения // *Цитология*. 2010; 52 (2): 99–109.
25. Bozo I.Ya., Deev R.V., Pinaev G.P. Fibroblast–spetsializirovannaya kletka ili funktsional'noe sostoyanie kletok mezenkhimnogo proiskhozhdeniya [Is «fibroblast» a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives?] // *Tsitologiya*. 2010, 52 (2): 99–109 (in Russian).
26. Quan T., Cowper S., Wu S., Bockenstedt L., Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36 (4): 598–606. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.10.005.
27. Herzog E., Bucala R. Fibrocytes in health and disease // *Experimental Hematology*. 2010; 38 (7): 548–556. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.03.004.
28. Kuznetsov S., Mankani M., Leet A., Ziran N., Gronthos S., Robey P. Circulating Connective Tissue Precursors: Extreme Rarity in Humans and Chondrogenic Potential in Guinea Pigs // *Stem Cells*. 2007; 25 (7): 1830–1839. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0140.
29. Metz C. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing // *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2003; 60 (7): 1342–1350. DOI: 10.1007/s00018-003-2328-0.

Поступила в редакцию 18.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Дворниченко Марина Владимировна, канд. мед. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск.

Сизикова Анастасия Евгеньевна, интерн, клиническая лаборатория диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Саприна Татьяна Владимировна, д-р мед. наук, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск.

Пашкова Елена Николаевна, канд. мед. наук, гл. врач ОГАУЗ «Врачебно-физкультурный диспансер», г. Томск.

Щербинко Матвей Сергеевич, студент педиатрического факультета, СибГМУ, г. Томск.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск; профессор-исследователь, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

✉ Дворниченко Марина Владимировна, e-mail: dochic@yandex.ru.

УДК 616-018.2-007.17:577.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-116–125

For citation: Dvornichenko M.V., Sizikova A.E., Saprina T.V., Pashkova E.N., Shcherbinko M.S., Khlusov I.A., Novitsky V.V. Cellular and molecular screening of connective tissue dysplasia in adolescent athletes (pilot study). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 116–125.

## Cellular and molecular screening of connective tissue dysplasia in adolescent athletes (pilot study)

Dvornichenko M.V.<sup>1</sup>, Sizikova A.E.<sup>1</sup>, Saprina T.V.<sup>1</sup>, Pashkova E.N.<sup>2</sup>, Shcherbinko M.S.<sup>1</sup>, Khlusov I. A.<sup>1,3</sup>, Novitsky V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University (SSMU)  
2, Moskow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

<sup>2</sup> Medical Exercises Dispensar  
5V, Lebedeva Str., Tomsk, 634029, Russian Federation

<sup>3</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University  
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236041, Russian Federation

### ABSTRACT

The purpose of the study is to evaluate the cellular and molecular parameters of bone remodeling in the blood as potential markers of undifferentiated forms of connective tissue dysplasia

**Materials and methods.** The structural and functional status of cellular elements of in vitro culturing of mononuclear leukocytes of peripheral blood in adolescent athletes connected with phenotypic manifestations of undifferentiated connective tissue dysplasia (UCTD) were investigated. 25 pupils of sport schools from 10–14 years old (main disciplines: figure skating, gymnastics, athletics) were examined with the help of express analysis. The average age of the examined adolescents was  $(12,0 \pm 1,7)$  years. Clinical examination of adolescents allowed ranking the UCTD signs on a scale of 4–11,5 points.

**Results.** A comparison of questionnaire survey results and an evaluation of bone remodeling distant markers allowed the revelation of 2 groups in the distribution of adolescent athletes: those with minimal signs of UCTD (scores lesser than 7 points – 10 pupils), and those with expressed UCTD phenotype (scores are equal or more than 7 points – 15 pupils). Significant statistical decrease in the content of collagen type I degradation products (CrossLaps) (by 80%) and ionized calcium (by 5%) has been determined in the peripheral blood of adolescent athletes with expressed UCTD phenotype. In conditions of short-term 72-h cultivation of mononuclear leukocytes in the presence of a 3D matrix imitating the properties of the mineral substance of the regenerating bone tissue, morphofunctional features of cellular reaction in adolescent athletes with clinical manifestations of UCTD, as well the heterogeneity of the cell population associated with the appearance of cells with an osteoblast-like phenotype in the blood have been revealed. The results of investigation propose the use of distant cellular and molecular parameters of bone remodeling to screen the mechanisms and dynamics of dysplastic disorders in adolescent athletes.

**Key words:** undifferentiated connective tissue dysplasia, adolescent athletes, osteocalcin, osteoblast-like cells, peripheral blood, mononuclear leukocytes.

Received May 18.2017  
Accepted November 08.2017

**Dvornichenko Marina V.**, PhD, Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Sizikova Anastasiia E.**, Intern, Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Saprina Tatyana V.**, DM, Professor, Department of Endocrinology and Diabetology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Pashkova Elena N.**, PhD, Head of the Physician Medical Exercises Dispensary, Tomsk, Russian Federation.

**Shcherbinko Matvey S.**, Student, Pediatric Faculty, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

**Khlusov Igor A.**, DM, Professor, Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russian Federation; Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

**Novitsky Vyacheslav V.**, DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Department Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Dvornichenko Marina V.**, e-mail: dochic@yandex.ru.