

В.Н. Коваленко¹

И.В. Лысенко¹

Л.М. Панченко²

¹Национальный научный центр «Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско Украины», Киев

²Институт травматологии и ортопедии АМН Украины, Киев

Ключевые слова:

остеоартроз, культура клеток, стволовые стромальные клетки костного мозга, колониобразующие единицы фибробластов.

КУЛЬТУРА СТВОЛОВЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРЯМОГО ВЛИЯНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ

Резюме. Исследована целесообразность использования культуры стволовых стромальных клеток костного мозга человека как модели для изучения непосредственного влияния фармакологических препаратов, применяемых в терапии при остеоартрозе.

Установлена возможность изучения биологических маркеров возникновения и прогрессирования остеоартроза как в клетках колоний, так и в супернатанте.

ВВЕДЕНИЕ

Остеоартроз (ОА) — группа перекрещивающихся заболеваний, имеющих различную этиологию, но одинаковые биологические, морфологические и клинические исходы. Патологический процесс поражает не только суставной хрящ, но и распространяется на весь сустав, включая субхондральную кость, связки, капсулу, синовиальную оболочку и периартикулярные мышцы. В конечном счете происходит дегенерация суставного хряща с его разволокнением, образованием трещин, ульцерацией и полной его потерей (Коваленко В.Н., Борткевич О.П., 2003).

В настоящее время ОА является самым распространенным заболеванием суставов. Прогнозируют, что к 2020 г. выявляемость ОА в популяции может достичь 57%. Особую тревогу вызывают данные о тенденции роста заболеваемости за счет возрастной группы моложе 45 лет (Артеменко Н.А., Чвамания М.А., 2005).

Лечение ОА по-прежнему представляет серьезную проблему, несмотря на то что перечень применяемых препаратов в последнее время значительно пополнился. Прежде всего, это связано с тем, что большинство лекарственных средств, применяемых при ОА, оказывают лишь симптоматическое действие. Пока не доказана способность какого-либо препарата изменять течение этого заболевания у человека *in vivo* (Коваленко В.Н., Борткевич О.П., 2003). Во многом это связано с ограниченными возможностями биохимических и инструментальных методов доказать свойство лекарственных препаратов «модифицировать болезнь».

Прогрессирование ОА сопровождается преобладанием катаболизма над анаболизмом агрекана и других компонентов хрящевого матрикса. Хондроциты под действием цитокинов синтезируют протео-

литические ферменты, вызывающие деградацию коллагенов и протеогликанов хряща. Процессы регенерации обеспечиваются специальными типами клеток, которые называются стволовыми. Среди них ведущая роль принадлежит стволовой кроветворной клетке, ответственной за гемопоэз и иммуногенез, а также стволовой стромальной клетке, обеспечивающей остеогенез, хондрогенез и фиброгенез. В костном мозгу эти две линии находятся в тесном морфо-функциональном взаимодействии. Нормальный гемопоэз и иммуногенез можно осуществлять только на полноценном стромальном плацдарме, который строится колониобразующими единицами фибробластов (КОЕФ) костного мозга, относящимися к остеогенным клеткам — предшественникам (Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С., 1973; Mundy G.R., 1995). С другой стороны, пролиферация и дифференцировка иммунокомпетентных и соматических клеток контролируются Т-системой иммунитета.

Уже не один год в лаборатории иммунологии Института травматологии и ортопедии АМН Украины изучаются свойства стволовых стромальных клеток костного мозга человека и их роль в процессах регенерации у ортопедо-травматологических больных, получены доказательства возможности использования показателей активности клонируемых *in vitro* колониобразующих единиц фибробластов для оценки регенераторного потенциала кости и костного мозга.

В культуре КОЕФ костного мозга человека за 14 сут проходит полный курс дифференцировки, начиная от стволовых клеток и заканчивая остеобластами. *In vitro* вырастают гетерогенные колонии, образуемые КОЕФ с низким и высоким структурообразовательным потенциалом, причем

последние — многослойные с отложением солей кальция в центре.

Установлено, что эффективность клонирования КОЕФ, содержание остеогенных клеток-предшественников, костного мозга и ядросодержащих клеток в 1 см³ спонгиозы определяют регенераторный потенциал.

Цель работы — исследование возможности и целесообразности использования культуры стволовых стромальных клеток костного мозга человека как модели для изучения непосредственного влияния фармакологических препаратов, применяемых в терапии при ОА.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили в условиях *in vitro*. Всего в исследование было включено 28 пациентов в возрасте от 43 до 59 лет.

Используя метод клонирования стволовых стромальных клеток костного мозга по Фриденштейну (Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С., 1973) в модификации Астаховой (Астахова В.С., 2000) (рис. 1) выращено 36 культур стромальных фибробластов из эпиметафиза большеберцовой кости.

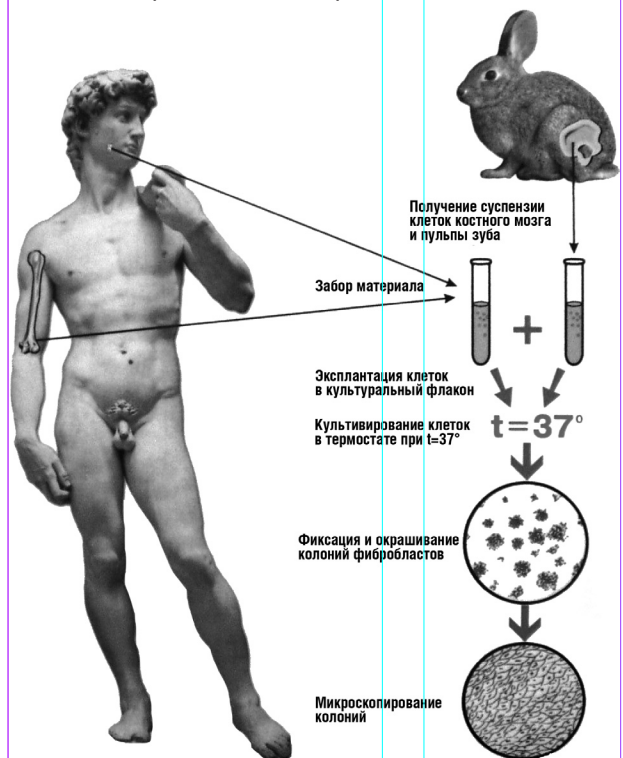


Рис. 1. Получение суспензии стволовых стромальных клеток костного мозга

В опытную группу были включены 10 больных с ОА. В качестве контроля были взяты показатели остеогенной активности спонгиозы вне участков воспаления и дегенеративно-дистрофического поражения 18 пациентов той же возрастной группы с острой травмой — внутрисуставными переломами эпиметафиза большеберцовой кости.

Для исследования спонгиозную кость брали в стерильную мерную пробирку со средой 199.

Объем спонгиозной кости измеряли по объему вытесненной жидкости. Клетки костного мозга

из спонгиозной кости вымывали в среде 199 на магнитной мешалке в течение 30 мин. Клонирование КОЕФ проводили с применением фидера кролика в стеклянных флаконах Ру и чашках Петри, используя среду 199 с 20% сыворотки крови человека. Культивирование проводили в течение 14 сут без смены питательной среды. Выросшие культуры фиксировали 96° этанолом, окрашивали по Романовскому — Гимзе. За колонию принимали скопление клеток, содержащее не менее 50 фибробластов.

Эффективность клонирования фибробластов (ЭКФ) рассчитывали по формуле:

$$ЭКФ = \frac{\text{Количество выросших колоний} \cdot 10^5}{\text{Количество посаженных клеток}}$$

Формула для определения количества КОЕФ в единице объема: количество КОЕФ в 1 см³ спонгиозной кости равно количеству объема спонгиозной кости, деленного на этот объем (V), а количество КОЕФ в исследованном объеме равно количеству выросших во флаконе или чашке Петри колоний КОЕФ (K), умноженному на количество вымытых из этого объема клеток (N), деленному на количество посаженных клеток (n), так как сажают обычно не все вымытые клетки, а только их часть.

Таким образом, данная формула имеет вид:

$$\text{Количество ЭКФ в 1 см}^3 = \frac{K \cdot N}{V \cdot n}$$

Метод клонирования дает нам также и возможность исследования биологических маркеров (БМ) возникновения и прогрессирования ОА как в клетках колоний, снятых механическим путем, так и в супернатанте с учетом того, что культивирование происходит без смены питательной среды в течение 14 сут и включает полный курс клеточной дифференцировки.

Биохимическими методами в супернатанте мы определяем кислую (КФ.3.1.3.2) и щелочную (КФ.3.1.3.1) фосфатазы (Комаров Ф.И. и др., 2001), а в культуре клеток методом аминокислотного анализа на автоматическом анализаторе ААА-339 аминокислотный состав выделенного белка (Козаренко Т.Д., 1975).

Обработку полученных данных производили с помощью пакета программ Statistica.

Средние величины представлены в виде M±m, где M — среднее значение показателя, m — стандартная ошибка среднего. При сопоставлении средних значений использовали критерий Стьюдента.

Результаты считали статистически достоверными при значениях p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели остеогенной активности в проксимальном эпиметафизе большеберцовой кости в контрольной группе и в группе больных с ОА (контрольной) представлены в табл. 1.

Учитывая, что при ОА дегенеративно-дистрофические процессы распространяются на суставной хрящ и субхондральную кость, нами изучены: количество ядросодержащих клеток в 1 см³ спонгиозы (• 10⁷), содержание КОЕФ в 1 см³ спонгиозы (• 10⁴),

а также эффективность клонирования среди 10^5 ядерных клеток.

Таблица 1

Показатели остеогенной активности КОЕф костного мозга проксимального эпиметафиза большеберцовой кости ($M \pm m$)

Группа	Количество ядродержащих клеток в 1 см^3 спонтозы $\cdot 10^7$	Количество КОЕф в 1 см^3 спонгиозы $\cdot 10^4$	Эффективность клонирования КОЕф среди 10^5 ядерных клеток
Контрольная	$0,12 \pm 0,03$	$0,054 \pm 0,0028$	$1,0 \pm 0,30$
Основная	$0,033 \pm 0,001^*$	0	0

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как видно из представленных данных, клоногенная активность стромы костного мозга эпиметафизов большеберцовой кости больных с ОА значительно отличается от контрольных величин. Так, количество ядродержащих клеток в 1 см^3 спонгиозы $\cdot 10^7$ при ОА более чем в 3,6 раза чем в контроле.

Необходимо отметить, что контрольные культуры стромальных фибробластов костного мозга были представлены различными по величине однослойными и многослойными колониями, причем последних насчитывалось от 15 до 30% (рис. 2).

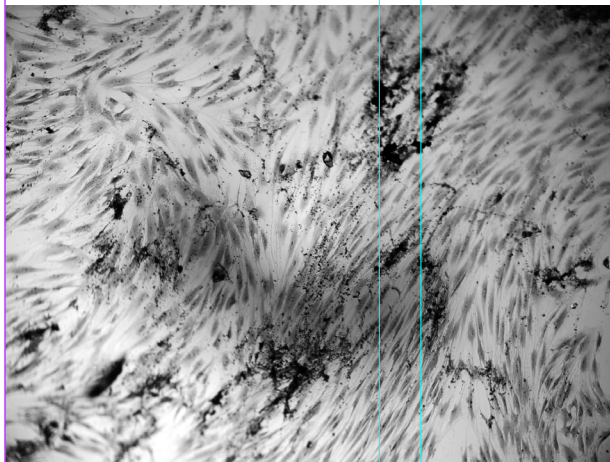


Рис. 2. Культура стволовых стромальных клеток из эпиметафиза большеберцовой кости в контроле

В опытных чашках на фоне единичных фибробластов, не образующих колонии, выявлены скопления до 30–40 клеток в виде кластеров. Эффективность клонирования при этом соответственно равнялась нулю (рис. 3).

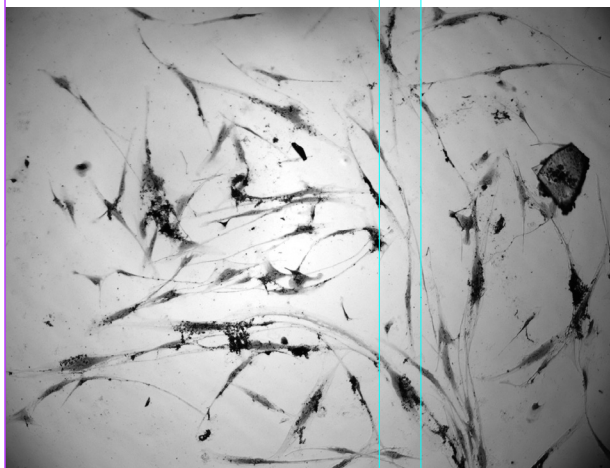


Рис. 3. Культура стволовых стромальных клеток из эпиметафиза большеберцовой кости при ОА

Проведя оценку полученных результатов, мы пришли к выводу о том, что резкое угнетение активности стромы костного мозга при ОА требует проведения исследований с двойным контролем, а именно изучение действия фармакологических препаратов на клеточных культурах пациентов как без ОА, так и у больных с ОА.

Особое внимание при изучении свойств культур КОЕф костного мозга человека уделяется изучению кислой и щелочной фосфатаз, что обусловлено их ролью в процессах остеогенеза. Щелочная фосфатаза является маркерным ферментом остеобластов и принимает участие в оссификации кости и хряща.

Исследуя супернатант через 14 сут культивирования, мы выявили щелочную и кислую фосфатазы как в контрольной группе, так и в группе больных с ОА. В то же время в опытной группе концентрация щелочной фосфатазы была почти в 2 раза ниже, чем в контроле и составляла $0,19 \pm 0,09$ мкмоль/ч \cdot л. ($p < 0,05$).

Наличие щелочной фосфатазы в супернатанте при культивировании клеток костного мозга свидетельствует об их остеогенной дифференцировке, а также позволяет судить об активности синтеза коллагена.

Синтез коллагена является еще одним важным признаком остеогенного направления дифференцировки КОЕф костного мозга.

Активность процесса синтеза коллагена определяли по остаткам оксипролина, проведя аминокислотный анализ белка, выделенного их колоний фибробластоподобных клеток. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Аминокислотный состав белка, выделенного из колоний фибробластоподобных клеток (%), ($M \pm m$)

Аминокислота	Группа	
	контрольная	основная
Лизин	$3,36 \pm 0,08$	$3,13 \pm 0,09$
Гистидин	$0,81 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,03^*$
Аргинин	$3,45 \pm 0,49$	$3,16 \pm 0,38$
Орнитин	$0,75 \pm 0,09$	$0,69 \pm 0,07$
Оксипролин	$3,09 \pm 0,33$	$1,90 \pm 0,30^*$
Аспарагиновая кислота	$8,11 \pm 1,01$	$8,09 \pm 0,97$
Треонин	$2,53 \pm 0,55$	$2,98 \pm 0,68$
Серин	$5,47 \pm 0,79$	$6,95 \pm 0,91$
Глутаминовая кислота	$9,41 \pm 0,87$	$10,07 \pm 0,95$
Пролин	$8,86 \pm 1,01$	$9,26 \pm 0,98$
Глицин	$30,07 \pm 1,13$	$28,11 \pm 1,21$
Аланин	$11,16 \pm 1,21$	$10,90 \pm 1,15$
Цистин	$2,98 \pm 0,31$	$4,25 \pm 0,29^*$
Валин	$1,80 \pm 0,05$	$1,83 \pm 0,07$
Метионин	$0,89 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,03$
Изолейцин	$1,07 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,03$
Лейцин	$3,49 \pm 0,07$	$3,48 \pm 0,07$
Тирозин	$1,13 \pm 0,02$	$1,24 \pm 0,07$
Фенилаланин	$1,57 \pm 0,03$	$1,55 \pm 0,04$

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В результате анализа полученных данных можно сделать вывод о том, что культивируемые нами клетки синтезируют белок по аминокислотному составу, соответствующий коллагену. Это в свою очередь позволяет заключить, что в культурах отме-

чали процессы пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток-предшественников.

Сравнивая синтез коллагена в контрольной и в основной группе, необходимо отметить, что для ОА характерным является угнетение синтеза коллагена в 1,6 раза.

На основании полученных результатов нами начато изучение прямого влияния лекарственных средств, применяемых в терапии ОА (нестероидных противовоспалительных препаратов, хондропротекторов и препаратов системной энзимотерапии), на стромальные клетки костного мозга.

Во второй части работы мы остановимся на количественной оценке действия фармакологических препаратов на колониобразующую активность стволовых стромальных клеток костного мозга *in vitro*, а также на БМ возникновения и прогрессирования ОА, которые мы использовали для оценки эффективности их влияния.

ВЫВОДЫ

1. Культуру стволовых стромальных клеток костного мозга человека целесообразно использовать в качестве модели для изучения непосредственно влияния лекарственных средств, применяемых в терапии ОА.

2. Доказана возможность изучения БМ возникновения и прогрессирования ОА как в клетках колоний, так и в супернатанте.

ЛИТЕРАТУРА

- Астахова В.С.** (2000) Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека. Феникс, Киев, 176 с.
- Артеменко Н.А., Чвамания М.А.** (2005) Особенности прогрессирования и лечения остеоартроза. РМЖ. Т. 13(7): 403–407.
- Коваленко В.Н., Борткевич О.П.** (2003) Остеоартроз: Практическое руководство. МОРИОН, Киев, 448 с.
- Козаренко Т.Д.** (1975) Ионообменная хроматография аминокислот. Наука, Новосибирск, 123 с.
- Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В.** (2001) Биохимические исследования в клинике. Элиста, Москва, 216 с.
- Фриденштейн А.Я., Лалыкина К.С.** (1973) Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. Медицина, Москва, 214 с.
- Mundy G.R.** (1995) Local control of bone formation by osteoblasts. Clin. Orthop. Relat. Res., Vol. 313: 19–26.

КУЛЬТУРА СТОВБУРОВИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ЛЮДИНИ ЯК МОДЕЛЬ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРЯМОГО ВПЛИВУ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗІ

В.М. Коваленко, І.В. Лисенко, О.М. Панченко

Резюме. Досліджено доцільність використання культури стовбурових стромальних клітин кісткового мозку людини як моделі для вивчення безпосереднього впливу фармакологічних препаратів, які застосовують у терапії при остеоартрозі. Установлена можливість вивчення біологічних маркерів виникнення і прогресування остеоартрозу як в клітинах колоній, так і в супернатанті.

Ключові слова: остеоартроз, культура клітин, стовбурові стромальні клітини кісткового мозку, колонієстворюючі одиниці фібробластів.

CULTURE OF STEM STROMAL MARROW CELLS AS A MODEL FOR THE STUDY OF DIRECT INFLUENCE OF PHARMACOLOGICAL MEDICINES AT OSTEOARTHRISIS

V.M. Kovalenko, I.V. Lysenko, O.M. Panchenko

Summary. There was investigated the expedience of the use of stem stromal marrow cells as a model for the study of the direct influence of the pharmacological medicines used in therapy of osteoarthritis. There was demonstrated the possibility of study of the origin of the biological markers and their osteoarthritis progressing in colony cells as well as in supernatant.

Key words: osteoarthritis, cell culture, stem stromal marrow cells, colony-forming fibroblast units.

Адрес для переписки:

Лысенко Ирина Владимировна
03680, Киев, ГСП, ул. Народного ополчения, 5
Национальный научный центр
«Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско»

РЕФЕРАТИВНА ІНФОРМАЦІЯ

Применение этарнесепта в терапии при дерматомиозите

Iannone F., Scioscia C., Falappone P.C.F., Covelli M., Lapadula G. (2006) J. Rheumatol., 33: 1802–1804.

Цель. Оценить эффективность этарнесепта, растворимого рекомбинантного человеческого протеина фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) рецептора тип II и IgG1 у взрослых пациентов с дерматомиозитом (ДМ).

Методы. 5 пациентов с активным дерматомиозитом включены в исследование. Все пациенты отмечали мышечную слабость, имели повышенный уровень мышечных ферментов — креатинин киназы

и лактат дегидрогеназы. Из-за неэффективности стероидной и цитотоксической терапии назначали этарнесепт в дозе 25 мг подкожно дважды в неделю на протяжении 3 мес.

Результаты. Все пациенты ощутили обострение заболевания с увеличением мышечной слабости и повышением уровня мышечных ферментов и сыпь. Лечение этарнесептом было прекращено. После назначения комбинации азатиоприна и метотрексата проявления заболевания улучшились у всех пациентов.

Вывод. В нашем случае ингибирование ФНО-α этарнесептом было неэффективно, предполагается, что для лечения ДМ необходимо назначение иммуносупрессивной терапии.