

## ЭФФЕКТЫ СТРОНЦИЯ РАНЕЛАТА В КУЛЬТУРЕ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

И. А. Хлусов<sup>1,2</sup>, А. И. Венгеровский<sup>1</sup>, К. А. Нечаев<sup>1</sup>,  
М. В. Дворниченко<sup>1</sup>, И. В. Кулагина<sup>1</sup>, Т. В. Саприна<sup>1</sup>

Изучено влияние стронция ранелата (СР) на функциональные показатели культуры мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови человека. СР в концентрациях 2,9; 29 и 290 мкг/мл дозозависимо снижает активность щелочной фосфатазы, содержание ионов кальция и калия в межклеточной жидкости. При воздействии в концентрациях 2,9 и 29 мкг/мл СР уменьшает, в концентрации 290 мкг/мл — повышает внеклеточное содержание ионов фосфата. Клеточными мишенями СР в культуре мононуклеарных лейкоцитов являются фибробластоподобные и остеобластоподобные клетки, способные регулировать минеральный состав межклеточной жидкости.

**Ключевые слова:** стронция ранелат; культура мононуклеарных лейкоцитов человека

### ВВЕДЕНИЕ

Стронция ранелат (СР) — новое лекарственное средство для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата [11]. После назначения СР больным остеопорозом и дегенеративными заболеваниями костной ткани риск переломов позвоночника уменьшается на 41 %, переломов шейки бедра — на 36 % [8]. Лечебное действие СР при остеопорозе зависит от дозы и не связано с факторами риска переломов [13]. Доказана большая эффективность СР по сравнению с влиянием бисфосфонатов — алендроновой и этидроновой кислот [14]. При применении СР увеличиваются толщина кортикальной кости на 5,3 %, ее площадь — на 4,9 %, площадь трабекулярной кости — на 2,1 %. Алендроновая и этидроновая кислоты эти показатели не изменяют [17].

Ионы стронция активируют кальцийчувствительный рецептор остеобластов, остеокластов и преостеокластов с последующим включением митоген-активируемого протеинкиназного, фосфатидил-инозитол-3-киназного путей и фосфолипазы С [10]. СР стимулирует также экспрессию остеопротегерина — цитокина, необходимого для жизненного цикла остеобластов, но подавляет экспрессию стимуляторов остеокластогенеза [6]. В результате этих биохимических механизмов усиливаются апоптоз остеокластов [12], пролиферация и дифференцировка остеобластов, синтез коллагенового матрикса в костной ткани [10]. СР уменьшает в крови содержание маркеров деструкции костной ткани — аминотерминальных пропептидов и карбокситерминальных телопептидов коллагена I типа [16].

В процессах образования костной ткани участвуют лейкоциты периферической крови [15]. В циркули-

рующей крови человека обнаружена популяция лейкоцитов (1 – 2 %) с фенотипическими характеристиками мезенхимных стромальных стволовых клеток [7, 18]. Их количество возрастает при усилении костеобразования [9]. При несовершенном остеогенезе в крови появляются лейкоциты с морфофункциональными признаками остеобластического и остеокластического дифферонов. Соотношение таких клеток рассматривают как маркер динамики реабилитации пациентов, страдающих дегенеративным заболеванием костной ткани [4]. Культура лейкоцитов крови может служить моделью для изучения клеточно-молекулярных аспектов действия лекарственных средств, регулирующих процессы остеогенеза.

В связи с этим для уточнения механизмов терапевтического эффекта СР представляет интерес изучение его влияние на функциональное состояние мононуклеарных клеток крови.

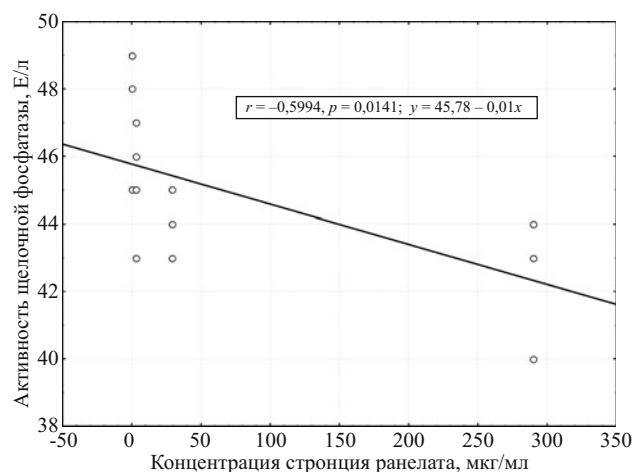
### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполняли с согласия локального этического комитета Сибирского государственного медицинского университета (закключение № 1646 от 25.10.2010).

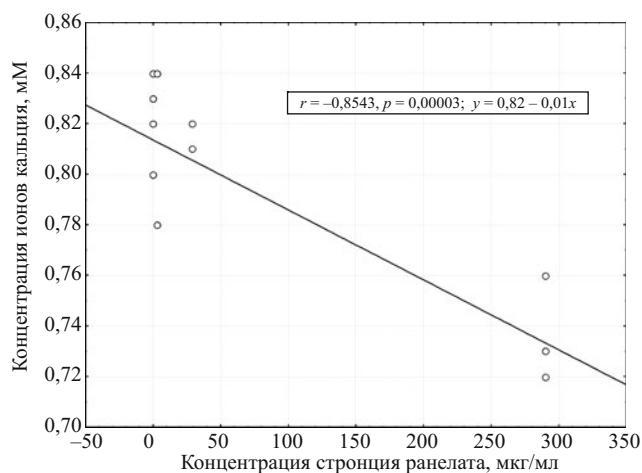
Использовали фракцию мононуклеарных лейкоцитов 6 здоровых доноров в возрасте 28 – 30 лет. Периферическую кровь из локтевой вены в стерильных условиях собирали в пробирки типа “Vacuette” (BD Diagnostics, США), центрифугировали в течение 10 мин при градиенте плотности 1,077 г/см<sup>3</sup> (Histo-raque, “Sigma”, USA) с последующим двукратным отмыванием клеточного материала от реактива средней МЕМ (Биолот, Россия). Жизнеспособность выделенных мононуклеарных лейкоцитов составляла 95 % в тесте ISO 10993-5 с 0,4 % раствором трипанового синего. Взвесь клеток помещали в 24-луночные планшеты (Orange Scientific, Бельгия) и культивировали в атмосфере 5 % углекислого газа в течение 72 ч при температуре 37 °С и 100 % влажности. Концентрация в

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2.

<sup>2</sup> НОЦ “Биосовместимые материалы и биоинженерия” при НИ Томском политехническом университете и Сибирском государственном медицинском университете, 634050, Томск, пр. Ленина, 43.



**Рис. 1.** Регрессионная зависимость активности щелочной фосфатазы от концентрации стронция ранелата в супернатанте культуры мононуклеарных клеток крови человека.



**Рис. 2.** Регрессионная зависимость концентрации ионов кальция от дозы стронция ранелата в супернатанте культуры мононуклеарных клеток крови человека.

лунках составляла  $10^6$  ядросодержащих клеток в 1 мл полной культуральной среды, содержащей 80 % среды DMEM/F12 (GIBCO, Великобритания), 20 % сыворотки крови эмбрионов коров (Sigma, США) с добавлением 280 мг/л L-глутамин (Биолот, Россия), 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты (Дальхимфарм, Россия), 40 нМ дексаметазона (КРКА, Словения).

В культуральную среду без клеток и в клеточную взвесь добавляли свежеприготовленный стерильный раствор СР (Servier, Франция) в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Основная концентрация СР в культуре лейкоцитов составляла 29 мкг/мл, что соответствует расчетной концентрации, создаваемой в организме человека массой 70 кг при однократном приеме препарата в терапевтической дозе 2 г при биодоступности 25 %. СР применяли также в концентрациях 2,9 и 290 мкг/мл. В контрольные лунки помещали эквивалентный объем растворителя.

Функциональное состояние мононуклеарных лейкоцитов после культивирования оценивали по активности общей фракции щелочной фосфатазы (ЩФ), концентрации ионов калия, кальция и неорганического

фосфата в супернатантах (наборы Thermo Fisher Scientific Inc., биохимический анализатор Konelab60i, США).

Результаты обрабатывали с применением программы STATISTICA for Windows 6.0. Рассчитывали параметры распределений: медиану (Me), 25 % квартиль ( $Q_1$ ) и 75 % квартиль ( $Q_3$ ). Для оценки статистической значимости различий применяли непараметрические критерии Вилкоксона (Т-тест,  $P_T$ ) и Манна-Уитни (U-тест,  $P_U$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Связь между исследуемыми показателями устанавливали методом регрессионного анализа [1].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование мононуклеарных лейкоцитов крови не вызвало значительных отклонений в молекулярном составе супернатантов: лишь на 7% снижалось количество ионов неорганического фосфата и на 10% возрастал уровень ионов калия (таблица). Это свидетельствует в пользу малой активности клеток крови в модельных условиях культивирования.

### Влияние стронция ранелата (СР) на функциональное состояние культивируемых мононуклеарных лейкоцитов Me( $Q_1 - Q_3$ ), $n = 6$

Показатель	Экспериментальные группы							
	Среда для культивирования	Культура лейкоцитов	Среда + СР, 2,9 мкг/мл	Лейкоциты + СР, 2,9 мкг/мл	Среда + СР, 29 мкг/мл	Лейкоциты + СР, 29 мкг/мл	Среда + СР, 290 мкг/мл	Лейкоциты + СР, 290 мкг/мл
pH	8,66 (8,65 – 8,67)	8,61 (8,60 – 8,61)	8,64 (8,63 – 8,64)	8,60 (8,59 – 8,71)	8,72 (8,62 – 8,81)	8,58 (8,57 – 8,60)	8,62 (8,61 – 8,63)	8,59 (8,57 – 8,60)
ЩФ, общая фракция, Е/л	47,00 (43,00 – 51,00)	49,00 (48,00 – 49,00)	52,00 (52,00 – 52,00)	45,50* (44,00 – 46,50)	48,50 (48,00 – 49,00)	43,50* (43,00 – 44,50)	47,00 (47,00 – 47,00)	43,00* (41,50 – 43,50)
Кальций ионизированный, мМ	0,82 (0,78 – 0,86)	0,83 (0,82 – 0,84)	0,78 (0,77 – 0,78)	0,75* (0,73 – 0,76)	0,83 (0,81 – 0,84)	0,78* (0,77 – 0,80)	0,75 (0,75 – 0,75)	0,73* (0,72 – 0,75)
Калий внеклеточный, мМ	5,00 (4,50 – 5,50)	5,50 (5,51 – 5,55)	5,45 (5,40 – 5,50)	5,15* (5,10 – 5,30)	5,00 (5,00 – 5,00)	5,05* (5,00 – 5,10)	5,00 (5,00 – 5,00)	5,10* (4,90 – 5,10)
Неорганический фосфат, мМ	0,98 (0,95 – 1,00)	0,91 (0,90 – 0,94)	0,93 (0,90 – 0,96)	0,82* (0,80 – 0,86)	0,74 (0,69 – 0,79)	0,79* (0,69 – 0,85)	1,06 (1,05 – 1,06)	1,05* (1,04 – 1,06)

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$  по сравнению с показателями культуры лейкоцитов без добавления СР согласно U-критерию Манна-Уитни.

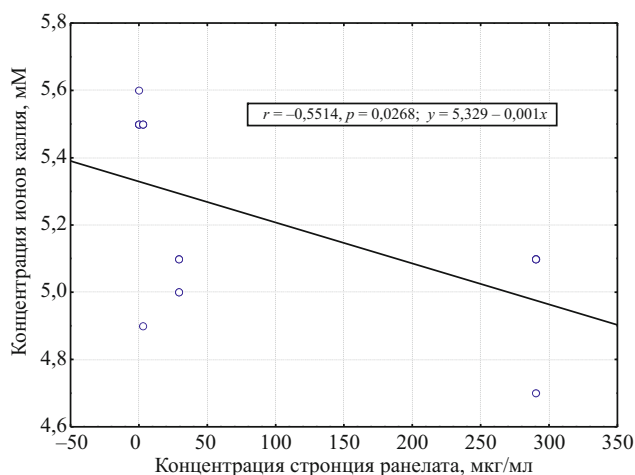


Рис. 3. Регрессионная зависимость концентрации ионов калия от дозы стронция ранелата в супернатанте культуры мононуклеарных клеток крови человека.

После добавления СР рН межклеточной жидкости оставался постоянным, так как препарат оказывает сбалансированное влияние на ионный гомеостаз. Во всех концентрациях СР снижал активность общей фракции ЩФ на 7,2 – 12,3 %, содержание ионов кальция — на 6 – 12 %, содержание ионов калия — на 6,4 – 8,2 % ( $P_T < 0,043$ ) по сравнению с показателями в контроле (клеточная культура без добавления препарата), таблица. При этом линейная регрессия концентрации СР и содержания ионов кальция является высокой (коэффициент ассоциации  $> 0,75$ ), количества ионов калия и активности ЩФ — достаточной (от 0,5 до 0,75), рис. 1 – 3. В среде, не содержащей мононуклеарных лейкоцитов, не выявлена статистически значимая зависимость активности ЩФ ( $y = 49,26 - 0,23x$ ;  $p > 0,42$ ), содержания ионов калия ( $y = 5,16 - 0,02x$ ;  $p > 0,59$ ) и кальция ( $y = 0,81 - 0,01x$ ;  $p > 0,1$ ).

СР в терапевтической концентрации и концентрации, уменьшенной в 10 раз, статистически значимо, на 10 % и 13,2 % соответственно, снижал в супернатанте культивируемых мононуклеарных лейкоцитов концентрацию ионов неорганического фосфата. При повышении концентрации СР до 290 мкг/мл содержание ионов фосфата возрастало на 15,4 % ( $P_u < 0,0005$ ). В этой концентрации СР несколько повышал (на 8 %) содержание ионов фосфата также в среде без клеток (таблица). Судя по этим данным, источником ионов неорганического фосфата в межклеточной жидкости являются не только клетки, но и сложная по составу культуральная среда, в которой происходят биохимические процессы.

Изменение концентрации ионов кальция и фосфора в культуральной среде характерно для жизнедеятельности фибробластоподобных стромальных клеток [5] и остеобластов [3]. Фибробластоподобные и остеобластоподобные клетки, присутствующие в мононуклеарной фракции периферической крови [7, 9], являются клеточными мишенями для СР.

СР препятствует выходу из мононуклеарных лейкоцитов ЩФ и внутриклеточных ионов калия. Как известно, ЩФ представляет собой белок, фиксированный на мембране с помощью фосфоинозитола, выход фермента в межклеточную жидкость увеличивается при апоптозе и воспалении [2]. Сохранение в клетках ЩФ и ионов калия свидетельствует о цитопротекторном действии СР в культуре клеток, дозозависимой защите мононуклеарных лейкоцитов от лизиса.

## ВЫВОДЫ

1. Стронция ранелат в концентрациях 2,9; 29 и 290 мкг/мл снижает активность щелочной фосфатазы, содержание ионов кальция и калия в межклеточной жидкости культуры мононуклеарных лейкоцитов крови человека. Препарат в концентрациях 2,9 и 29 мкг/кг уменьшает, в концентрации 290 мкг/кг — повышает внеклеточное содержание ионов фосфата.

2. Клеточными мишенями стронция ранелата в культуре мононуклеарных лейкоцитов являются фибробластоподобные и остеобластоподобные клетки.

Исследование выполнено при поддержке федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы” (государственный контракт № 16.512.11.2087).

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Боровиков, *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов*, Питер, Санкт-Петербург (2003).
2. В. М. Лифшиц, В. И. Сидельникова, *Биохимические анализы в клинике*, МИА, Москва (1998).
3. Б. Риггз, Дж. Мелтон, *Остеопороз*, БИНОМ, Невский диалект, Санкт-Петербург (2000).
4. И. А. Хлусов, Т. В. Саприна, К. А. Нечаев и др., *Бюл. сиб. мед.*, **9**(6), 71 – 79 (2010).
5. И. А. Хлусов, М. Ю. Хлусова, К. В. Зайцев и др., *Клеточные технологии в биологии и медицине*, № 4, 216 – 224 (2010).
6. T. C. Brennan, M. S. Rybchyn, W. Green, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **157**(7), 1291 – 1300 (2009).
7. R. Bucala, L. A. Spiegel, J. Chesney, et al., *Mol. Med.*, **1**(1), 71 – 81 (1994).
8. V. Cortet, *Rheumatology*, **48**(1), 1 – 6 (2009).
9. G. Z. Eghbali-Fatourehchi, J. Lamsam, D. Fraser, et al., *N. Engl. J. Med.*, **353**(6), 737 – 738 (2005).
10. O. Fromigué, E. Haÿ, A. Barbara, et al., *J. Biol. Chem.*, **285**, 25251 – 25258 (2010).
11. A.-S. Hurtel-Lemaire, R. Mentaverri, A. Caudrillier, et al., *J. Biol. Chem.*, **284**(3), 575 – 584 (2009).
12. R. Mentaverri, S. Yano, N. Chattopadhyay, et al., *FASEB J.*, **20**(12), 2562 – 2564 (2006).
13. P. Meunier, D. Slosman, P. Delmas, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **87**(11), 2060 – 2066 (2002).
14. H. Raef, M. Al-Bugami, S. Balharith, et al., *Ann. Saudi Med.*, **31**(1), 111 – 128 (2011).
15. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, et al., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Elsevier Academic Press, San Diego (2004).

16. R. R. Recker, F. Marin, S. Ish-Shalom, et al., *J. Bone Miner. Res.*, **24**(7), 1358 – 1368 (2009).
17. R. Rizzoli, M. Laroche, M.-A. Krieg, et al., *Rheumatology Int.*, **30**(7), 1341 – 1348 (2010).
18. N. J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, et al., *Arthritis Res.*, **2**(2), 477 – 488 (2000).

Поступила 01.06.12

## EFFECTS OF STRONTIUM RANELATE IN MONONUCLEAR LEUKOCYTE CULTURE

I. A. Khlusov<sup>1,2</sup>, A. I. Vengerovskii<sup>1</sup>, K. A. Nechaev<sup>1</sup>, M. V. Dvornichenko<sup>1</sup>, I. V. Kulagina<sup>1</sup>, and T. V. Saprina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Moskovskii tract 2, Tomsk, 634050, Russia

<sup>2</sup> Scientific Educational Center “Biocompatible Materials and Bioengineering”, prosp. Lenina 43, Tomsk, 634050, Russia

Strontium ranelate (SR) effect on the functional parameters of human blood mononuclear leukocytes culture has been investigated. SR in concentrations of 2.9, 29, and 290 mg/ml produces a dose-dependent decrease in the activity of alkaline phosphatase and the content of calcium and potassium ions in supernatants. In concentrations of 2.9 and 29 mg/ml, SR decreases, while in a concentration of 290 mg/ml it increases the intercellular phosphate ion content. Fibroblast- and osteoblast-like cells, which are capable of regulating mineral compound of intercellular liquid, are SR cellular targets in human blood mononuclear leukocytes culture.

**Keywords:** strontium ranelate; cultivated human mononuclear leukocytes