

ВЛИЯНИЕ БИОИНЕРТНЫХ И БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ИМПЛАНТАТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК

Плехова Н.Г.¹, Ляпун И.Н.², Калининченко С.Г.¹, Матвеева Н.Ю.¹, Костив Р.Е.¹, Гнеденков С.В.³, Синебрюхов С.Л.³, Пузь А.В.³

¹ГОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России», Владивосток, Россия, e-mail: pl_nat@hotmail.com;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», Владивосток, Россия, e-mail: niem_vl@mail.ru;

³ФГБНУ «Институт химии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия, e-mail: chemi@ich.dvo.ru

При внедрении в организм биоинертные (титановые) и биорезорбируемые (магниевые) имплантаты инициируют иммунную реакцию, опосредованную антигенпредставляющими клетками, к которым относятся дендритные. В статье приводятся результаты исследования иммуномодулирующих свойств имплантатов при их воздействии на рецепторный фенотип дендритных клеток (ДК). Показано, что под влиянием магния в популяции гемопоэтических клеток обнаруживается повышение экспрессии маркеров дифференцировки ДК CD80/CD86, активационного антигена CD38, и рецептора адгезии CD34, тогда как экспрессия лейкоцитарного маркера CD14 снижается. Таким образом, магний, по сравнению с титаном, оказывает более выраженное влияние на процесс дифференцировки и созревания гемопоэтических клеток в направлении дендритных.

Ключевые слова: имплантаты, остеопатология, иммунитет, дендритные клетки, рецепторы.

THE EFFECTS OF BIOINERTNESS AND RESORBABLE METAL IMPLANTS ON THE EXPRESSION OF MEMBRANE RECEPTORS DENDRITIC CELLS

Plekhova N.G.¹, Lyapun I.N.², Kalinichenko S.G.¹, Matveeva N.Y.¹, Costiv R.E.¹, Gnedenkov S.V.³, Sinebryukhov S.L.³, Puz A.V.³

Pacific State Medical University, pr. Ostryakova 2, Vladivostok 690002, Russia, e-mail: pl_nat@hotmail.com;

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Somov Institute of Epidemiology and Microbiology», Vladivostok, Russia, e-mail: niem_vl@mail.ru;

Institute of Chemistry, Far-Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia, e-mail: chemi@ich.dvo.ru

The implants when introducing in the body initiate an immune response mediated by antigen presenting cells, which include dendritic. The article presents the results of a study of immunomodulatory properties implants under their effects on receptor phenotype of dendritic cells (DC). It is shown that under the influence of magnesium in a population of hematopoietic cells have an increased expression of markers differentiation DC CD80 / CD86, an activation antigen CD38, and adhesion receptor CD34, whereas leukocyte marker CD14 expression decreases. Thus, magnesium, compared with titanium, has a more pronounced effect on the process of differentiation and maturation of hematopoietic cells into dendritic direction.

Keywords: implants, bone reparation, immunity, dendritic cells, receptors.

Одним из ключевых элементов врожденного иммунитета являются дендритные клетки (ДК), которые при созревании во время миграции приобретают свойства профессиональных антигенпрезентирующих клеток с характерным набором поверхностных рецепторов [3, 12, 13]. Роль ДК как ключевых компонентов защитной реакции организма при патологии костной ткани была показана в области исследований остеоиммунологии. Указывается, что в норме локализация ДК в надлежащей или прилежащей к костной ткани строма встречается редко, и они не принимают участия в восстановлении ее дефектов [8]. С

другой стороны, документально подтверждено наличие ДК у больных в синовиальной жидкости пародонта при периодонтите и суставов при ревматоидном артрите [5, 7, 8, 10]. При этих заболеваниях локализованные в строме ДК могут образовывать агрегаты с Т-клетками, формируя воспалительные очаги, где осуществляется взаимодействие клеток через рецепторы хемотаксиса и адгезии RANK-RANKL. Показано, что при воспалении костных тканей экспрессия этих рецепторов на поверхности ДК индуцирует опосредованно через регуляцию активности Т-клеток и процесса дифференцировки и выживаемости остеокластов деградацию костной ткани [9, 10, 11, 14]. В целом эти данные указывают на критическое влияние ДК на процесс остеокластогенеза при воспалительных заболеваниях костей, где они действуют не только как мощные антигенпрезентирующие клетки, которые активируют и регулируют иммунную систему, но и оказывают прямой вклад в деструкцию костной ткани.

На настоящий момент в области эндопротезирования отмечается тенденция в исследованиях, направленных на создание биоматериалов, способных заменить поврежденные участки тканей человеческого организма [1, 2, 4]. Наиболее успешно эти исследования проводятся при лечении патологии костно-мышечной системы, в том числе при эндопротезировании крупных суставов. На данный момент нержавеющая сталь и титановые сплавы являются основными материалами, которые используются для изготовления погружных имплантатов. Тем не менее применение фиксаторов из биоинертных металлов при остеосинтезе требует повторных оперативных вмешательств, направленных на удаление выполнивших свою роль металлических имплантатов, и нередко это является не менее травматичным процессом, чем сам остеосинтез. Поэтому остается актуальным вопрос о поиске биорезорбируемых материалов, пригодных для создания имплантатов, применяемых в остеосинтезе, которые могли бы полностью метаболизироваться организмом, не оказывая при этом патологического воздействия на окружающие ткани и организм в целом [2]. К подобным материалам относятся магниевые сплавы, которые благодаря прочностным характеристикам являются пригодными для изготовления различных типов имплантатов. Как биоинертные, так и биорезорбируемые материалы при их внедрении в организм контактируют с антигенпрезентирующими клетками и их свойства, такие как топография поверхности, химический состав, играют важную роль в инициации про- или противовоспалительного иммунного ответа.

Исходя из вышеизложенного, цель работы – выявить иммуномодулирующие свойства биоинертных (титановых) и биорезорбируемых (магниевых) металлических имплантатов по степени их влияния на экспрессию рецепторов на плазматической мембране ДК.

Материалы и методы

В работе использовался технически чистый титан коммерческой марки ВТ1-0 и сплав магния МА8 (1.5–2.5 wt. % Mn; 0.15–0.35 wt. % Ce; Mg – основа). Полученные образцы перед использованием стерилизовали в сухожаровом шкафу (Термо Фишер Сайнтифик, Финляндия) при 180 °С в течение 15 мин, что соответствовало правилам стерилизации медицинских изделий, при этом проводили контроль поверхностных свойств образцов.

Первичную культуру недифференцированных клеток миелоидного пула получали по методу М.В. Lutz с соавторами [7] из костного мозга бедренной кости морских свинок путем промывания костномозгового канала средой RPMI-1640 (Sigma, США). Костный мозг гомогенизировали на диссоциаторе (MilteniBiotec, Германия), трижды промывали средой с центрифугированием и переносили в обогащенную среду культивирования. Конечная концентрация клеток составила 8×10^6 в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей 0,1 мг/мл гентамицина-К (БиолоТ, Россия) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биоло Т, Россия). Клеточную суспензию разносили во флаконы с лектиновым покрытием (контроль) и с образцами имплантатов, инкубировали в течение 3 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С, после чего удаляли неадгезированные клетки. Затем для индукции созревания ДК в среду добавляли 80 нг/мл гранулоцит-моноцитарного колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) и 20 нг/мл интерлейкина-4 (ИЛ-4, Sigma, США). На третьи сутки проводили повторную цитокиновую стимуляцию и продолжали инкубировать, проводя смену среды каждые трое суток. Качество культуры оценивалось методом прижизненного наблюдения клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Непрямой метод флюоресцирующих антител (нМФА). Монослой клеток выдерживали во влажной камере в течение 30 мин в термостате при 37 °С, затем промывали рабочим буферным раствором с твином в течение 10 мин. Демаскировка неспецифического антигена проводилась путем инкубирования образцов в течение 1 ч в растворе 3 % сывороточного альбумина (Sigma, США) на основе рабочего буфера в объеме 5–10 мкл. Препараты выдерживали во влажной камере в течение 30 мин в термостате при 37 °С, потом промывали рабочим буферным раствором с твином в течение 10 мин. Затем на монослой клеток наносили моноклональные антитела против CD34,CD38, конъюгированные с фикоэритрином (PE), и против CD14,CD80, CD83, CD86, конъюгированные с флуоресцеином (FITC, Sigma, США). Препараты исследовали с помощью лазерной конфокальной микроскопии в системе LSM510META (CarlZeiss, Германия), при возбуждении 546 нм для PE и 486 нм для FITC подсчитывали 100 клеток, и выражали в проценте количество антигенположительных, а также определяли интенсивность свечения.

Результаты

О степени дифференцировки и зрелости ДК можно судить по изменению уровня экспрессии их дифференцировочных молекулярных кластеров CD34, CD38. Известно, что рецептор CD34 клеток гемопоэтического пула относится к лигандам межклеточной адгезии и играет важную роль на ранних этапах кроветворения. Так, появление CD34 на мембранах клеток опосредует их адгезию на внеклеточном матриксе путем связывания со специфичными гликанами, а через эти молекулы с лектинами. Клетки CD34⁺ фенотипа в нормальном костном мозге являются предшественниками как ДК, так и макрофагов с гранулоцитами, и такие клетки «промежуточного» типа на 6-е сутки культивирования под влиянием индуктора способны дифференцироваться в ДК либо лейкоциты. Для того чтобы изучить роль имплантатов в качестве индукторов созревания, проводили анализ рецепторного фенотипа ДК. Первичную культуру недифференцированных клеток миелоидного пула из костного мозга помещали во флаконы с образцами и культивировали в присутствии ГМКСФ и ИЛ-4. В качестве контроля использовали клетки, адгезированные к поверхности специализированного пластика, покрытого лектином, а для получения популяции зрелых ДК вносили липополисахарид *Escherichiacoli* (ЛПС). Известно, что культивирование ДК в присутствии ГМ-КСФ и ИЛ-4 с добавлением 2,5 нг/мл ЛПС стимулирует созревание ДК и снижает в культуре содержание макрофагов [6]. Определено, что максимальная экспрессия CD34 на поверхности ДК наблюдалась на 1-е сутки совместного инкубирования с ЛПС, и содержание клеток составило $72 \pm 5,8$ %. В дальнейшем, их количество снижалось, достигая минимальных цифр к концу срока наблюдения ($1,6 \pm 0,08$ %). Под влиянием имплантатов количество CD34 положительных клеток, по сравнению с контролем, было ниже. Так, для образцов с титаном через 1 сутки показатель составил $56 \pm 4,8$ %, а и для образцов с магнием $48 \pm 4,6$ %. Минимальное количество указанных клеток отмечалось в конце срока наблюдения (21 с) и составило $1,8 \pm 0,2$ % и $2,4 \pm 0,6$ % соответственно. Таким образом, полученные нами данные указывают на одинаковое относительно друг друга влияние имплантатов на экспрессию рецептора адгезии, а сниженный, относительно контроля, процент содержания этих клеток на выраженное их действие как индукторов созревания клеток.

В качестве показателя, отражающего направление дифференцировки клеток гемопоэтического пула под влиянием имплантатов, определяли степень экспрессии мембранного гликозилфосфатидилинозитол-связанного белка CD14. Этот компонент является элементом рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2, распознающего липополисахарид, и экспрессируется на поверхности клеток миелоидного ряда, особенно на макрофагах. Нами обнаружено, что в контрольном образце при указанных выше условиях, минимальное количество клеток с высокой степенью экспрессии CD14 определялось на 9-е

сутки (рис. 1а), тогда как содержание клеток, положительных по выявлению маркера терминальной дифференцировки ДК – CD83, в эти сроки наблюдения было максимальным. Показатели составили $14\pm 1,8\%$ и $67\pm 5,8\%$ соответственно. Эти данные указывают на то, что внесение ЛПС оказывает выраженное влияние на созревание именно популяции ДК. При изучении степени экспрессии указанных рецепторов в клеточных популяциях, контактировавших с имплантатами, выявлено, что наибольшим активирующим воздействием на дифференцировку в направлении ДК обладал магний (рис. 1б). Так, на 9-е сутки совместной инкубации с магнием содержание CD14⁺ клеток составило $26\pm 2,8\%$ и CD83⁺ $58\pm 4,6\%$, тогда как при контакте с титаном $32\pm 3,1\%$ и $48\pm 3,6\%$. В последующие сроки наблюдения количество CD14⁺ клеток находилось на указанном уровне, а при контакте с имплантатами незначительно снижалось. Приведенные данные указывают на выраженное влияние магниевое имплантата на направленность дифференцировки клеток гемопоэтического пула преимущественно в сторону ДК.

Интерес представляют полученные нами данные о степени экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 на поверхности ДК при их взаимодействии с имплантатами в зависимости от времени инкубирования. Эти рецепторы межклеточной адгезии взаимодействуют с соответствующим им лигандам с высокой avidностью, при условии их экспрессии на мембранах клеток кластерами. Несмотря на то, что в начальные сроки наблюдения ЛПС активировал созревание ДК в большей степени, чем имплантаты, с течением времени уровень экспрессии костимулирующих молекул на поверхности клеток под влиянием титана и магния повышался. Причем, при относительно невысоких показателях количества CD80 и CD86 положительных ДК, интенсивность их свечения возрастала (рис. 1) и экспрессия CD80 молекулы на ДК, инкубированных с имплантатами оставалась повышенной ($23,8\pm 2,6\%$ и $21,2\pm 3,4\%$, соответственно) по сравнению с ДК, обработанными ЛПС ($0,6\pm 0,2\%$) до конца срока наблюдения.

Лейкоцитарный антиген CD38 является бифункциональным ферментом, сочетающим АДФ-рибозилциклазную и цАДФ-рибозил гидролазную активность, экспрессируется на кроветворных клетках, соответственно их степени дифференцировки или пролиферации. Продукт ферментативной активности CD38 – циклическая АДФ-рибоза является универсальным катализатором кальция из внутреннего депо. Причем, основная функция рецептора CD38 состоит в регуляции активности клеток костного мозга, лимфоидной ткани и периферической крови, стимулируя их продукцию цитокинов, а также принимает участие в процессе миграции ДК (). Повышенная регуляция CD38 служит маркером активации клеток, в частности процесса дифференцировки В-лимфоцитов в плазмочиты. При изучении количества CD38⁺ фенотипа в пуле недифференцированных клеток миелоидного ряда перед

контактом с образцами и ЛПС определено их содержание $19,29 \pm 1,74$ %. В динамике взаимодействия данных клеток с ЛПС количество $CD38^+$ возросло, при максимальном значении через 3 с инкубации, показатель составил $98,2 \pm 9,7$ %. Тогда как, в образцах, инкубированных с магнием, выявлено повышение количества $CD38^+$ клеток на 2 сутки ($91 \pm 8,92$ %) при последующем понижении до конца срока наблюдения ($28 \pm 2,4$ %). При контакте с титаном максимальное содержание $CD38^+$ клеток наблюдалось только на 9 с инкубации, и их показатель составил $82 \pm 7,8$ %. Приведенные выше данные свидетельствуют о наличии индуцирующего действия имплантатов на созревание ДК, в зависимости от времени контакта, причем в большей степени магния, чем титана.

Заключение

В процессе созревания ДК отмечается снижение эндоцитарного потенциала, степени экспрессии антигенраспознающих рецепторов, и, напротив, увеличивается экспрессия молекул адгезии, которые связаны с плазматической мембраной. Толерантные свойства высокодифференцированных ДК в запуске иммунного ответа проявляются не только их способностью презентировать антигены лимфоцитам, но и уникальными миграционными свойствами, которые позволяют им присоединять антигены в различных тканях организма и транспортировать их в региональные лимфоидные органы. Помимо того, что у этих клеток изменяется морфология клеточных органелл, повышается активность лизосомальных ферментов и иммунопротеасом, осуществляющих процессинг синтезируемых внутриклеточно белковых антигенов, усиливается производство провоспалительных цитокинов и различных факторов роста, посредством которых активируются Т-лимфоциты и клетки соединительнотканного происхождения [3, 12, 13]. Указанные уникальные свойства позволяют ДК быть важными участниками процесса регенерации костной ткани в качестве инициаторов остеолизиса, активируя дифференцировку и созревание остеокластов.

Представленные данные указывают на одинаковое относительно друг друга влияние имплантатов на экспрессию рецептора адгезии $CD34$ гемопоэтических клеток, а сниженный, относительно контроля, процент содержания этих клеток – на их действие в качестве индукторов созревания. Обозначено более выраженное, по сравнению с титаном, влияние магния на направленность дифференцировки клеток гемопоэтического пула преимущественно в сторону дендритных. С этой позиции выявленная в нашем исследовании свойство биорезорбируемого магниевого имплантата оказывать более выраженное влияние, по сравнению с биоинертным титановым, на процесс направленной дифференцировки и созревания ДК представляет особенный интерес. В этом случае, когда по истечении определенного временного промежутка после внедрения в место повреждения магний резорбируется остеокластами и другими профессиональными фагоцитами, большое значение

имеют уже присутствующие в месте асептического воспаления высокодифференцированные ДК. Эти клетки в силу того, что они уже приобрели свойства высокоспециализированных антигенпредставляющих участников процесса элиминации нежелательных компонентов воспаления, также могут оказывать опосредованный эффект на процесс остеосинтеза путем продукции разнообразных факторов, в том числе цитокинов, в межтканевое пространство для привлечения соединительнотканых клеточных элементов. Выявленная нами относительно невысокая степень активирующего воздействия титанового имплантата на ДК подтверждает его свойство биоинертности в отношении иммунной системы, что указывает на его положительные качества, как материала, который длительно находится в организме.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (гос. контракт № 14-33-00009) и Федерального агентства научных организаций.

Список литературы

1. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // Успехи химии. – 2010. – Т. 79, № 1. – С. 15-32.
2. Попков А.В. Биосовместимые имплантаты в травматологии и ортопедии // Гений Ортопедии. – 2014. – № 3. – С. 94-99.
3. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity // Nature. – 1998. – V. 392. – P. 245-252.
4. Bellucci D. A new hydroxyapatite-based biocomposite for bone replacement / D. Bellucci, A. Sola, M. Gazzarri, F. Chiellini, V. Cannillo // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. – 2013. – 33(3). – P. 1091-101.
5. Gravallesse E.M. Bone destruction in arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – Vol. 61(S. 2). – P. ii84–86. Janelins B.M., Lu M., Datta S.K. Altered inactivation of commensal LPS due to acyloxyacyl hydrolase deficiency in colonic dendritic cells impairs mucosal Th17 immunity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014 – Vol. 111(1). – P. 373-8.
6. Lutz M.B. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow / M.B. Lutz, N. Kukutsch, A.L. Ogilvie, S. Rössner, F. Koch, N. Romani, G. Schuler // J. Immunol. Methods. – 1999. – Vol. 223(1). – P. 77-92.
7. Mori G. The Interplay between the bone and the immune system /G. Mori, P. D'Amelio, R. Faccio, Brunetti G. // Clin. Dev. Immunol. – 2013. – 720504.
8. Rivollier A., Mazzorana M., Tebib J. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment // Blood. – 2004. – Vol. 104, N 13. – P. 4029–4037.

9. Page G., Miossec P. RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-t cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes // *Arthritis. Rheum.* – 2005. – Vol. 52. – P. 2307–2312.
10. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S. E. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatorytype responses // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167, N 3. – P. 1758–1768.
11. Shortman K., Naik S.H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – V. 7. – P.19-30.
12. Steinman R.M., Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine // *Nature.* – 2007. – Vol. 449. – P. 419–426.
13. Thomas R., MacDonald K., Pettit A., Cavanagh L., Padmanabha J., Zehntner S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis // *J. Leukoc. Biol.* – 1999. – Vol. 66. – P. 286–292.

Рецензенты:

Палагина М.В., д.б.н., профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Дальневосточный федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Владивосток;

Тимченко Н.Ф., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», г. Владивосток.