

DOI: 10.1134/S0041377118120052

## ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ ЭЛЕКТРЕТА НА ОСНОВЕ АНОДНОГО ОКСИДА ТАНТАЛА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЕ СВОЙСТВА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНОГО ОСТЕОАРТРОЗОМ

© С. А. Александрова,<sup>1,\*</sup> О. И. Александрова,<sup>1</sup> В. П. Хомутов,<sup>2</sup>  
М. С. Моргунов,<sup>2</sup> М. И. Блинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

<sup>2</sup>ООО «Медэл», Санкт-Петербург, 194044;

\* электронный адрес: [alekssvet2205@gmail.com](mailto:alekssvet2205@gmail.com)

В работе исследовали способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга больного остеоартрозом дифференцироваться в остеогенном и хондрогенном направлениях под воздействием электрического поля электрета, созданного на основе анодного оксида тантала. Показано, что в присутствии образцов с анодным оксидом в электретном состоянии в ММСК костного мозга интенсифицируются процессы синтеза белков-маркеров дифференцировки. Проведено сравнение воздействия электретов с равномерным и линейным распределением заряда по поверхности. В процессе остеогенной дифференцировки ММСК значительно усиливали экспрессию остеокальцина и коллагена I типа. В процессе хондрогенной дифференцировки обнаружено усиление экспрессии аггрекана и коллагена II типа. Наиболее ярко эти признаки были выражены при воздействии на клетки образцов электрета с распределением заряда по поверхности, близким к линейному.

Ключевые слова: электрет, остеоартроз, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга, остеогенная дифференцировка, хондрогенная дифференцировка

Принятые сокращения: ММСК — мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, ОА — остеоартроз.

Остеоартроз (ОА) — дегенеративное заболевание суставов, объединяющее группу заболеваний различной этиологии, но со сходными последствиями, при которых в патологический процесс вовлекается не только суставной хрящ, но и весь сустав, включая субхондральную кость, связки, капсулу, синовиальную оболочку и периапартулярные мышцы. Ранее основой дегенеративных дистрофических изменений при артрозе считали первичное повреждение хряща с последующей воспалительной реакцией и последующей деформацией костной ткани (Игнатъев и др., 2003). Однако современные патофизиологические концепции рассматривают весь сустав как цельный функциональный блок, образованный суставным хрящом и субхондральной костью (Logies, Luyten, 2011). Как хрящ, так и кость получают и распределяют общее напряжение, связанное с движением и нагрузкой. Кроме того, между хрящом и костью происходит взаимодействие посредством различных молекул в зоне гипертрофии (кальцификации) хряща, которое усиливается при развитии ОА с помощью прорастающих со стороны костной ткани дополнительных кровеносных сосудов и микротрещин, возникающих в процессе аномального ремоделирования кости (Yuan et al., 2014). Поэтому разрабатываются подходы, влияющие именно на механизмы формирования патологии. Например, предложено использовать пре-

параты, снижающие обмен молекулярными факторами между хрящом и субхондральной костью, приводящие к ингибированию избыточного ангиогенеза и нейрогенеза, а также антирезорбтивные агенты, помогающие восстановить структуру субхондральной кости (бифосфонаты, кальцитонин, паратиреоидный гормон и др.) (Yuan et al., 2014).

В конце прошлого века началось формирование нового направления медицины, основанного на использовании близкодествующих статических электрических полей, которые создаются функционирующими автономно электретами. Электретами называют диэлектрики, содержащие квазипостоянный заряд, который может длительное время создавать в окружающем пространстве электрическое поле (Макаревич и др., 1998). В экспериментах на животных обнаружили, что электреты стимулируют позитивные биологические процессы в организме (Ручкий и др., 1988; Артемьев и др., 1990; Hua, En-tan, 1996; Хомутов и др., 2005). Явление «запоминания» заряда и поляризации, характерное для электретов, показано к настоящему времени для многих веществ и живых организмов. В фундаментальных отечественных и зарубежных работах показана важная роль электрических процессов в жизнедеятельности биологических тканей (Сесслер, 1983; Губкин, 1987; Копышев, 2006; Levin, Martyniuk,

2018). С начала 1980-х годов в Санкт-Петербурге в Военно-медицинской академии и Центре стабильно-функционального остеосинтеза Елизаветинской больницы начались исследования влияния электрического поля электретов на основе политетрафторэтилена, его сополимеров и анодного оксида тантала, изготовленных в НИИ ГИРИ-КОНД (Санкт-Петербург), на остеорепарацию при лечении травм и заболеваний опорно-двигательного аппарата человека и животных. Были проведены доклинические (на животных) и клинические исследования лечения переломов, ложных суставов и артроза суставов с использованием стимуляции остеорепарации электрическим полем электретов (Руцкий и др., 1988; Артемьев и др., 1990; Хомутов и др., 2005; Линник, Хомутов, 2017). В 2013 г. для лечения артроза суставов I—III степени был предложен и запатентован метод с использованием электретного стимулятора остеорепарации (ЭСО), получивший название ИМПЛЭСО® (Моргунов, Хомутов, 2013). ЭСО представляет собой стержень из тантала, на поверхности которого создан анодный оксид с отрицательным зарядом поверхности, создающий электрическое поле, близкое к физиологическому. ЭСО имплантируется в эпифиз большого сустава. В клинических испытаниях было показано, что ИМПЛЭСО® останавливает дегенерацию сустава, воздействуя непрерывно на субхондральную кость. Наблюдается существенное уменьшение болевого синдрома, начинается постепенное восстановление функции сустава (Линник, Хомутов, 2017).

Положительный эффект применения электретов к пациентам с ОА стимулировал проведение фундаментальных исследований по поиску механизмов влияния электрического поля электрета на репаративные процессы в поврежденной ткани кости и хряща. Можно предположить, что благоприятный эффект использования ЭСО при лечении артрозов может быть связан с его воздействием на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) костного мозга, так как он вводится непосредственно в субхондральную кость и контактирует с большим количеством клеток стромы.

Ранее нами в экспериментах *in vitro* было выявлено действие отрицательно заряженных танталовых электретов, стимулирующее пролиферативную, миграционную и метаболическую активность ММСК костного мозга, а также клеток скелетной ткани (остеоцитов и хондроцитов) больных коксартрозом (Александрова и др., 2018). Эти данные позволили сделать вывод о том, что изделия из тантала обладают высокой биосовместимостью, а заряд на поверхности оксида тантала изделий усиливает исследованные характеристики клеток.

Одним из механизмов участия ММСК в репаративных процессах является возможность их дифференцировки в клетки, недостаток которых возникает в процессе развития патологии. В процессе ОА в костном мозге развиваются различные дегенеративные процессы — ремоделирование костной ткани, разрастание остеоцитов, формирование кист (полостей), жировой некроз и фиброз (Loeser, 2012). Кроме того, остается непонятным, насколько ММСК костного мозга сохраняют способность к дифференцировке под влиянием патологии.

Задача настоящей работы состояла в исследовании *in vitro* влияния электрического поля электрета на способность к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях ММСК костного мозга от больного ОА. Кроме того, сравнивали воздействия электретов с равномерным и линейным распределением заряда по по-

верхности. Различные способы формирования заряда электрета могут создавать электрическое поле разной направленности и тем самым по-разному влиять на ход процессов. Эти исследования необходимы для дальнейшего совершенствования методов лечения ОА.

## Материал и методика

Танталовые электреты. Для проведения экспериментов были изготовлены модели танталовых ортопедических имплантатов, применяемых при внутреннем остеосинтезе. Они были выполнены в форме дисков диаметром 15,4 мм и толщиной 0,5 мм из проката тантала высокой чистоты (99,92 %), обезжиренного и отожженно в вакууме при давлении  $10^{-5}$  мм рт. ст. и температуре 1900 °С. Технология изготовления разработана Моргуновым с сотрудниками (2012). Для придания танталовым дискам электретных свойств на их поверхности получали пленку оксида тантала ( $Ta_2O_5$ ) толщиной 300 нм, анодно окисляя их в водном растворе ортофосфорной кислоты. До электризации пленки образцы отжигали на воздухе при температуре 200 °С, электризовали с использованием водного контакта и подвергали дополнительному отжигу для термостабилизации электретного состояния. Стерилизовали образцы плазменным методом. Образцы тантала, на поверхности которых был сформирован слой анодного оксида с последующей его электризацией, получили название «электреты». В работе исследовали два варианта электретов — с равномерным распределением заряда по поверхности и с распределением заряда по поверхности, близким к линейному. В первом случае оксидная пленка на поверхности металла содержала приповерхностный отрицательный электронный заряд плотностью 0,048—0,056 Кл/м<sup>2</sup>, закрепленный на глубоких потенциальных ловушках. Электретная разность потенциалов между поверхностью оксида и танталом основы ( $U_z$ ) составляла 60—70 В. Во втором случае (распределение заряда по поверхности, близкое к линейному)  $U_z$  менялось от 0 до максимальных значений. Контролем служили диски тантала без электретного покрытия. Следует отметить, что на поверхности контрольного образца всегда существует спонтанно сформировавшийся на воздухе естественный слой оксида толщиной 2—3 нм.

Выделение и культивирование ММСК костного мозга. ММСК получали из кусочков головки бедренной кости взрослых пациентов с ОА ( $n = 4$ ), проходивших оперативное лечение в Елизаветинской больнице Санкт-Петербурга, после подписания пациентом информированного согласия. Выделение клеток проводили по методике, описанной ранее (Koller et al., 2001), в собственной модификации.

Спонгиозную часть кости размельчали скальпелем и ножницами, помещали в фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и пропускали через фильтр (Corning® cell strainer, 70 мкм; Sigma, США). Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 900 г 10 мин, осадок ресуспендировали в PBS, взвесь клеток наносили на раствор гистобака (плотность  $\sim 1,077$  г/мл; Sigma, США) и центрифугировали 30 мин при 1200 г. Клетки, находящиеся в интерфазном слое (моноклеарная фракция клеток костного мозга), собирали пипеткой, переносили в другую пробирку, добавляли два объема PBS и осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 900 г при комнатной температуре. Клеточный осадок ресуспендирова-

ли в полной питательной среде  $\alpha$ MEM (Lonzo, Бельгия), содержащей 20 % сыворотки эмбрионов коров (HyClone, США), 1 % раствора антибиотиков PenStrep (Gibco, США) и 1 % глутамина (GlutaMax, США). Клетки считали с помощью гемоцитометра и высевали с плотностью  $2.5 \cdot 10^5$  кл./см<sup>2</sup> на пластиковые сосуды для адгезивных культур. Первую смену среды проводили через 7 сут после посева клеток, когда костномозговые ММСК адгезировали, приобретали фибробластоподобную морфологию и формировали клеточные колонии. Через 14 сут проводили первый пересев клеток, используя смесь растворов 0.25%-ного трипсина и 0.02%-ного ЭДТА (Invitrogen, Великобритания). Клетки культивировали в полной питательной среде  $\alpha$ MEM, содержащей 15 % сыворотки, при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>.

Поверхностный фенотип полученной культуры определяли методом проточной цитофлуориметрии, используя панель конъюгатов моноклональных антител, меченных флуорохромами, против CD73, CD90, CD105, CD29, CD44, CD45 и CD34 (Beckman Coulter, США). Количественный анализ поверхностных маркеров выявил соответствие полученных клеток диплоидным ММСК костного мозга человека.

Индукция дифференцировки ММСК костного мозга. Большинство исследователей используют методы трехмерного культивирования для создания условий дифференцировки ММСК в хондрогенном направлении, в результате которых формируются многоклеточные агрегаты в форме сфероидов (сфероиды). Это объясняется тем, что в онтогенезе терминальная дифференцировка в хондроциты происходит при плотном взаимодействии клеток-предшественников между собой в условиях нарастания количества протеогликанов, тормозящих адгезию клеток. В практике работы с ММСК и хондроцитами больше всего распространена методика культивирования в «микромассах» (Anderer, Libera, 2002), однако в некоторых случаях индукция дифференцировки проводится на плоских подложках, что позволяет изучать некоторые особенности морфологии клеток, хотя дифференцировка на плоскости более замедлена по сравнению с дифференцировкой в трехмерном пространстве.

Клетки на 3–4-м пассажах высевали на покровные стекла, размещенные в лунках 12-луночных планшетов ( $20 \cdot 10^3$  кл./лунка). Через 1 сут на адгезированные клетки сверху помещали танталовые диски с электретным покрытием и без него (контроль), а питательную среду заменяли на индукционную. Дополнительным контролем служили клетки, культивируемые в индукционной среде без танталовых дисков. Для дифференцировки в остеогенном и хондрогенном направлениях использовали соответствующую среду (StemPro(r) osteogenesis differentiation kit или StemPro(r) chondrogenesis differentiation kit; Life Technologies, США). Индукцию дифференцировки проводили при росте клеток на плоскости. В лунки помещали круглые покровные стекла, покрывающие всю поверхность лунки (площадь 3.466 см<sup>2</sup>), на которые высевали клетки (20 тыс./лунка) в ростовую среду. На следующие сутки на прикрепившиеся клетки сверху помещали образцы тантала (площадь 1.864 см<sup>2</sup>) и ростовую среду заменяли на дифференцировочную. Образцы тантала покрывал монослой, располагающийся по центру лунки, при этом остальные клетки (занимающие 1.602 см<sup>2</sup> площади лунки) культивировали рядом с образцами. Культивирование проводили в течение 14 или 28 сут со сменой среды 2 раза за 1 нед, после чего образцы извлекали из

лунок, клетки на стеклах фиксировали 4%-ным формалином и окрашивали против соответствующих антител или гистохимическими красителями.

Способность к дифференцировке в остеогенном направлении ММСК костного мозга человека в условиях роста в присутствии танталовых электретов оценивали разными методами. Щелочную фосфатазу (ЩФ) выявляли в клетках по окраске в темно-синий или черно-фиолетовый цвет на 14-е сут культивирования в остеогенной среде после окраски реактивом BCIP-NBT (Sigma, США). Соли кальция выявляли через 28 сут культивирования с помощью 2%-ного раствора ализаринового красного (Sigma, США). В случае положительного окрашивания формировались ярко-оранжевые кристаллы солей кальция. Экспрессию остеокальцина и коллагена I типа выявляли с помощью флуоресцентномеченных антител: в качестве первых антител использовали кроличьи поликлональные антитела (разведение 1 : 150) против остеокальцина и коллагена I типа (Bioss, США). В качестве вторых антител использовали антитела к кролику, меченные Alexa Fluor® 488 (Bioss, США; разведение 1 : 200). Для заключения препаратов под покровное стекло использовали среду VectaShield (Vector Laboratories, США), содержащую ядерный краситель DAPI. Для визуализации результатов использовали световой инвертированный микроскоп Nikon Eclipse TS100 (Япония), оснащенный фотокамерой, и флуоресцентный микроскоп LSM 5 Pascal (Германия).

Способность к дифференцировке в хондрогенном направлении ММСК в условиях роста в присутствии образцов тантала оценивали по формированию сфероидов и методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии — по связыванию с поликлональными кроличьими антителами против коллагена II типа и агрекана (Bioss, США; разведение 1 : 150). Окрашивание вторыми антителами и визуализацию окрашивания проводили, как сказано выше.

## Результаты

Способность к остеогенной дифференцировке ММСК костного мозга человека. После культивирования ММСК костного мозга в течение 14 сут в остеогенной дифференцировочной среде в присутствии танталовых дисков клетки окрашивали на наличие в них ЩФ, которая играет большую роль в процессе остеогенеза. ЩФ вырабатывают делящиеся остеобласты на начальных стадиях образования основного органического вещества кости и его минерализации. Одним из механизмов действия фермента является локальное увеличение концентрации ионов фосфора до точки насыщения, за которым следуют процессы фиксации кальций-фосфорных солей на органической матрице кости. Наличие характерной окраски клеток на ЩФ выявлено во всех вариантах, но без значительной разницы между экспериментом и контролем (рис. 1, I).

Через 28 сут культивирования в дифференцировочной среде выявляли соли двухвалентных металлов (в данном случае кальция) (рис. 1, II). Во всех вариантах наблюдали формирование крупных кристаллов ярко-оранжевого цвета в скоплениях клеток. В лунках с образцами тантала, несущими заряд (рис. 1, II, в, з), выявлена более интенсивная характерная окраска, чем в контрольных

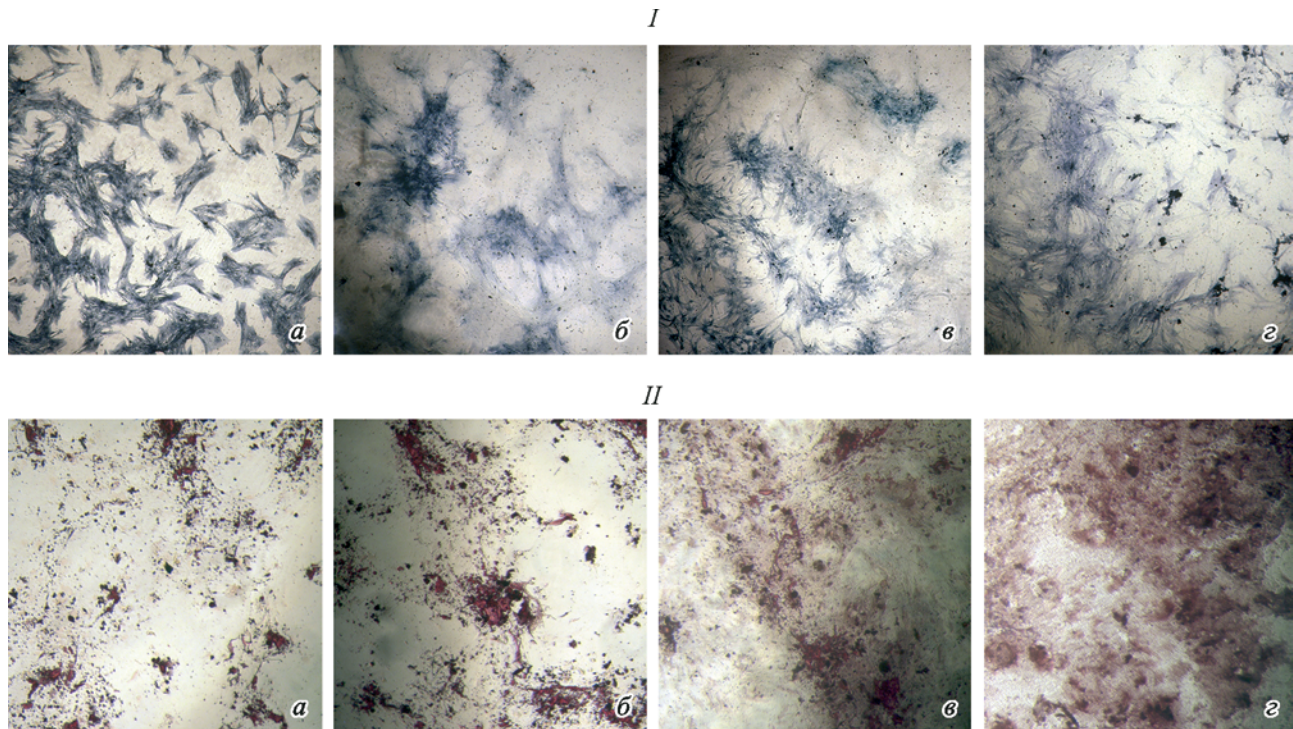


Рис. 1. Выявление активности щелочной фосфатазы (I) и солей кальция (II) в ММСК костного мозга человека при их культивировании в остеогенной дифференцировочной среде в отсутствие (контроль, *a*) и в присутствии танталового диска без электретоного покрытия (*б*), с электретом с равномерным распределением заряда (*в*) и с электретом с линейным распределением заряда (*г*).

Окраска реактивом BCIP-NBT через 14 сут (I) и ализариновым красным через 28 сут (II). Световая микроскопия. Об. 10×.

интенсивная характерная окраска, чем в контрольных лунках (рис. 1, II, *a*, *б*). Больше всего окрашенных областей выявлено в лунках с образцами тантала с линейным распределением заряда (рис. 1, II, *г*).

Через 28 сут культивирования ММСК в остеогенной среде выявляли экспрессию остеокальцина с помощью иммунофлуоресценции. Остеокальцин — это небольшой (49 аминокислотных остатков) неколлагеновый белок внеклеточного матрикса (ВКМ) кости, синтезируемый остеобластами и составляющий 25 % всей неколлагеновой части органического матрикса кости. Остеокальцин принадлежит к группе так называемых матриксных Gla-белков (matrix gla protein), являющихся инициаторами минерализации и создающих ядра кристаллизации. За счет посттрансляционных модификаций  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты остеокальцин прочно связывается кальцием и гидроксиапатитом. Именно остатки  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты притягивают на себя три иона кальция и укладывают их в структуру кристаллов гидроксиапатита — основной составляющей костной ткани, обеспечивающей ее минеральную плотность. Остеокальцин экспрессируется в остеобластах и экстернализуется из клеток в составе так называемых матриксных пузырьков на поздних стадиях остеогенеза (во время кальцинации остеоида). В этот период происходят быстрое отложение минеральных солей кальция в виде кристаллов (7—20 мкм) в костную ткань и их склеивание с коллагеновыми волокнами (Hauschka et al., 1989). Анализ препаратов ММСК с помощью антител к остеокальцину (рис. 2) показал наличие флуоресцентной окраски во всех вариантах эксперимента. На всех препаратах кроме диффузной окраски в цитоплазме наблюдали также матриксные пузырьки, содержащие остеокальцин. В контроль-

ных образцах (в присутствии танталовых дисков без покрытия) встречались одиночные пузырьки (рис. 2, *e*), тогда как на образцах с электретным покрытием, имеющих заряд, можно было наблюдать гораздо большее их количество (рис. 2, *ж*, *з*). Кроме того, можно отметить, что размер матриксных пузырьков был больше всего на препаратах с линейным распределением заряда (рис. 2, *з*). Это может говорить о слиянии матриксных пузырьков и соответственно более интенсивном прохождении процессов синтеза остеокальцина под воздействием составляющей электрического поля электрета, направленной параллельно его поверхности.

В процессе образования кости клетки мезенхимного происхождения — фибробласты и остеобласты — синтезируют и выделяют в окружающую среду сначала протеогликаны и гликозаминогликаны, а затем фибриллы коллагена, которые проникают в матрикс и распределяются в нем. Коллаген запускает образование кристаллов минерального остова кости. Формирование кристаллической решетки из минералов начинается в зонах, находящихся в регулярных промежутках, возникающих между волокнами коллагеновых фибрилл при их сдвиге на 1/4 длины. Затем первые кристаллы становятся центрами нуклеации для отложения гидроксиапатита между коллагеновыми волокнами. 90 % органического матрикса кости составляет коллаген I типа. Слабая экспрессия коллагена I обнаруживается уже на 3-и сут культивирования ММСК (Denu et al., 2016). В процессе остеогенной дифференцировки, когда ММСК превращаются в остеобласты, количество белка значительно возрастает и он накапливается в межклеточном пространстве. Во всех вариантах эксперимента нами выявлено интенсивное окрашивание ММСК на коллаген I типа флуоресцентно мечеными антителами

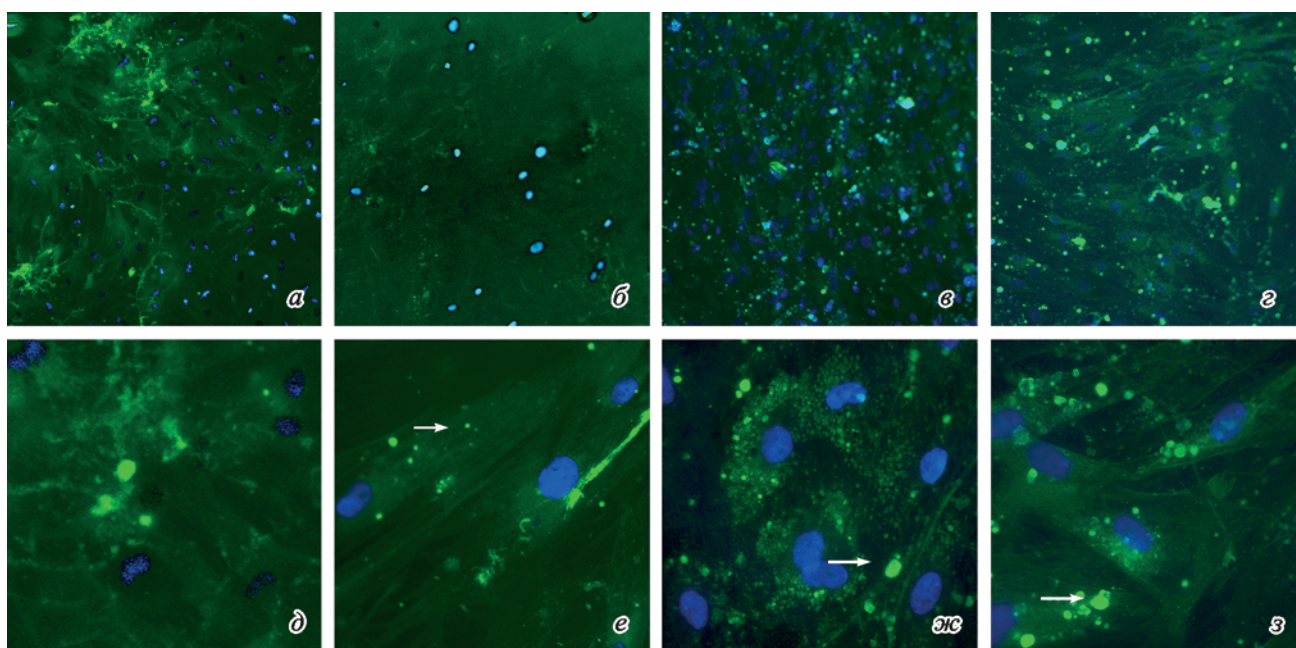


Рис. 2. Выявление остеокальцина в клетках ММСК через 28 сут культивирования в остеогенной дифференцировочной среде в отсутствие (а, д) и в присутствии (б—з) танталового диска.

б, е — танталовый диск без электретенного покрытия; в, ж — электрет с равномерным распределением заряда; г, з — электрет с линейным распределением заряда. Иммунофлуоресценция. Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Верхний ряд — об. 10×; нижний ряд — об. 40×. Стрелками обозначены матричные пузырьки.

после индукции дифференцировки клеток, особенно в местах их скопления (так называемых остеогенных узелках, возникающих в процессе дифференцировки) (не показано).

Способность к хондрогенной дифференцировке ММСК костного мозга человека. Формирование хряща в онтогенезе начинается с уплотнения мезенхимы: сетевидно расположенные клетки, усиленно размножаясь и увеличиваясь в размерах, сближаются друг с другом. Между ними возникают плотные контакты, что приводит к появлению хондрогенных узелков. Хондробласты начинают синтезировать компоненты для хрящевого матрикса, которые выделяются из клеток в составе матричных пузырьков. Основной протеогликан хряща — это агрекан; он образует агрегаты с гиалуроновой кислотой. Межклеточное вещество отодвигает группы клеток друг от друга. Вслед за синтезом хондробластами протеогликанов начинается синтез коллагена. Вна-

чале прехондрогенные клетки синтезируют коллагены I и III типов. Далее в процессе хондрогенеза происходит смена компонентов ВКМ, экспрессируется коллаген II типа. Коллаген II и протеогликан являются основными компонентами ВКМ хрящевой ткани, поэтому именно их используют в качестве маркеров хондрогенной дифференцировки.

Через 14 сут культивирования ММСК в дифференцировочной среде были обнаружены следующие картины: во всех случаях в центре лунки (непосредственно под образцами) происходило сближение клеток в группы, а на периферии (вне прямого контакта с образцами) формировались сфероиды. В контрольных лунках встречались небольшие прикрепленные сфероиды (рис. 3, а, б); в лунке с равномерно заряженным образцом — один крупный сфероид (рис. 3, в), в лунке с линейно заряженным образцом — два крупных сфероида (рис. 3, г). При этом в присутствии заряженных образцов формировались сфероиды

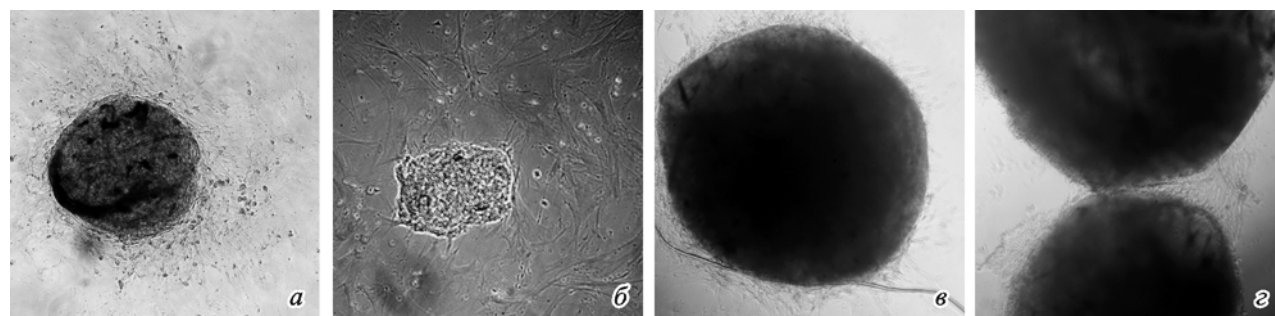


Рис. 3. Формирование сфероидов из ММСК через 14 сут культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде без танталовых дисков (а) и в присутствии танталового диска без электретенного покрытия (б) и с электретом с равномерным (в) и линейным (г) распределением заряда.

Прижизненное наблюдение, фазовый контраст, об. 4×.

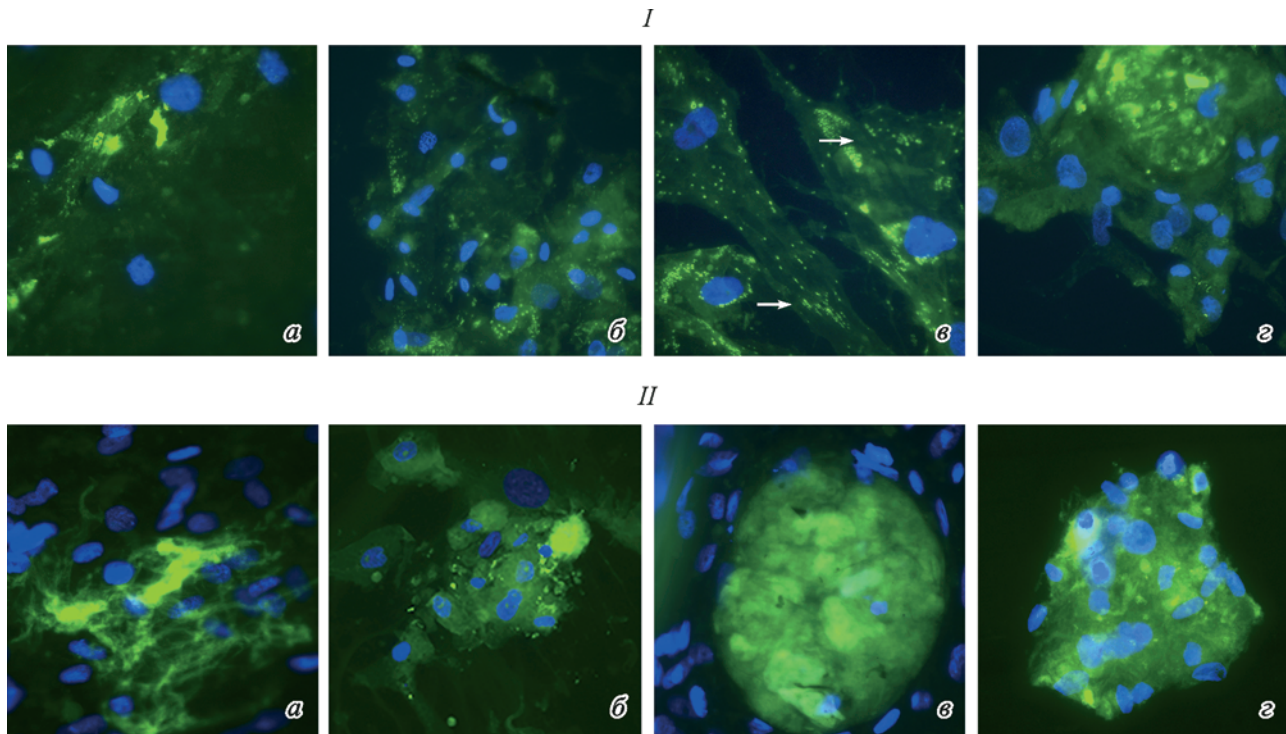


Рис. 4. Выявление экспрессии агрекана (I) и коллагена II типа (II) в клетках ММСК после культивирования в течение 28 сут в хондрогенной дифференцировочной среде.

Рост клеток в разных условиях. I: а — в присутствии танталового диска; б, в — электрет с равномерным распределением заряда; г — электрета с линейным распределением заряда. II: а — без танталовых дисков; б — в присутствии танталового диска; в — электрета с равномерным распределением заряда; г — электрета с линейным распределением заряда. Иммунофлуоресцентная микроскопия. Об. 40×, кроме I, в — об. 63×. Зеленое свечение — экспрессия белка, меченного флуоресцентным красителем FITC. Синим цветом выявляются ядра клеток, помеченные DAPI. Стрелками обозначены матричные пузырьки.

электретного покрытия и контроле. Это может свидетельствовать о более активной выработке хондробластами ВКМ и протеогликанов.

Окрашивание ММСК после культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде антителами против агрекана продемонстрировало накопление белка в межклеточном пространстве хондрогенных узелков во всех вариантах эксперимента (рис. 4, I). Встречались отдельные клетки, экспрессирующие матричные пузырьки, содержащие протеогликан (рис. 4, I, в). В лунках, в которых находились электреты с разными типами заряда, были выявлены интенсивно окрашенные скопления клеток (хондрогенные узелки), в которых происходила экспрессия агрекана (рис. 4, I, б, г). Окрашивание ММСК в процессе хондрогенной дифференцировки антителами к коллагену II показало накопление белка в межклеточном пространстве и в хондрогенных узелках (рис. 4, II). При сравнении лунок с разными образцами можно сделать заключение о том, что более интенсивное свечение отмечено в присутствии дисков тантала, несущих заряд независимо от его распределения по поверхности (рис. 4, II, в, г).

### Обсуждение

Ряд исследований влияния электрической стимуляции на процессы остеорепарации показал эффективность этого метода для лечения костной и хрящевой патологии, однако исследования применения его в случае ОА только начинаются. Влияние электрической стимуляции на про-

цессы остеорепарации исследовали в ряде работ (Руцкий и др., 1988; Артемьев и др., 1990), в которых авторы моделировали систему накостного или интрамедуллярного остеосинтеза после костных переломов. Во всех экспериментах использовали электреты с линейным зарядом. В этих работах были прослежены морфологические изменения в процессе восстановления поврежденных тканей под воздействием электрического поля электретов. На 48 беспородных собаках изучали особенности остеорепарации после накостного остеосинтеза с помощью титановой пластинки в комплексе с электретом, в качестве которого была использована политетрафторэтиленовая пленка марки Ф-4 (Руцкий и др., 1988). Величина градиента электретной разности потенциалов пленки после электризации достигала  $12\,500 \pm 800$  В/м. Выполняли поперечную остеотомию большеберцовой кости в средней трети и сопоставленные отломки фиксировали накостной пластинкой с 6 винтами. Электрет в опытной серии размещали между пластинкой и отломками кости. В контрольной серии применяли аналогичные, но незаряженные пленки. Под воздействием электретов активизировалась остеорепарация, атрофия костных отломков была менее выраженной, раньше восстанавливалась механическая прочность сросшейся большеберцовой кости и быстрее завершалась перестройка костной мозоли. Интрамедуллярная фиксация танталовыми штифтами с анодным оксидом в электретном состоянии (наибольшая разность электрических потенциалов составляла  $105 \pm 5$  В) отломков лучевой кости кроликов после поперечной остеотомии лучевой кости способствовала акти-

визации периостального остеогенеза, раннему формированию и перестройке костной мозоли (Артемьев и др., 1990).

В работах Руцкого и его учеников исследовали распределение статических электрических потенциалов длинных трубчатых костей в норме и его изменение при различных травмах (Ткаченко, Руцкий, 1989). Авторы выявили, что при травме или введении имплантатов происходит изменение статических электрических потенциалов кости. В эксперименте на животных показано, что потенциал на участке остеотомии или перелома кости всегда становится более электроотрицательным по сравнению с неповрежденной костью, причем чем серьезнее травма (например, при огнестрельном переломе), тем больше по абсолютной величине отрицательный потенциал. По-видимому, такой тип распределения потенциала имеет важный биологический смысл и является реакцией организма на травму, способствующей регенерации кости. Дополнительная стимуляция внешним электрическим полем от отрицательного электрода (катода) зоны травмы усиливает репаративные возможности организма. Однако использование стимуляции с помощью электродов может вызвать инфицирование в месте ввода электродов или механическую травму пациентов, вызывает неудобство (дисконфорт) из-за постоянного соединения пациента с источником электропитания, к тому же у анода происходит резорбция тканей и возможен металлоз из-за растворения металла в тканях. Этих недостатков лишено использование электретов, на поверхности которых можно создать необходимое распределение заряда с максимумом оптимальной конфигурации в зоне травмы. Было выявлено, что в области регенерации костной ткани статический потенциал всегда более электроотрицателен по сравнению с неповрежденными областями, соответственно формирование новообразующихся костных структур происходит в области отрицательных зарядов, а в области положительных зарядов — резорбция костной ткани. Это может быть связано с тем, что отрицательный заряд накапливает ионы кальция и в этих участках процессы минерализации протекают более интенсивно (Хомутов, Ласка, 1997).

Исследование электрической стимуляции на процессы хондрогенеза менее изучено. Влияние электрического поля на восстановление хрящевой ткани изучали на модели экспериментального удаления грудино-реберных сочленений у кроликов (Хомутов и др., 2005). В работе авторы использовали отрицательно заряженный электрет на основе фторопластовой пленки и обнаружили увеличение плотности хрящевых участков и прилежащих к суставам участков костной ткани по сравнению с контролем, что говорило об ускоренной минерализации хрящевой ткани под воздействием электрета. На модели патологического процесса у кролика, возникающего при ОА тазобедренного сустава, было показано, что электрическое поле электрета активизирует репаративные процессы в хрящевой ткани при асептическом некрозе головки бедренной кости (Нелин и др., 2017).

В настоящей работе впервые изучали влияние электрета с равномерным распределением заряда по поверхности на способность ММСК костного мозга больного ОА к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях, при этом сравнивали с влиянием электрета с линейным распределением заряда. Предполагалось, что различные способы формирования заряда на поверхности электрета могут создавать электрическое поле с разными

свойствами, тем самым по-разному влияя на ход изучаемых процессов. Кроме того, необходимо принимать во внимание характер патологии — ОА и то, что использовали клетки больных пациентов. В процессе ОА происходят дегенеративные изменения как в костной, так и хрящевой тканях, поэтому было важно исследовать потенциал стволовых клеток дифференцироваться в обоих направлениях.

Было выявлено, что популяция ММСК, полученная из костного мозга пациентов с ОА и размноженная *in vitro*, проявляет способность к дифференцировке. В присутствии образцов с анодным оксидом в электретном состоянии интенсифицируются процессы синтеза белков-маркеров как остеогенной, так и хондрогенной дифференцировки. При этом более выраженная дифференцировка в хондрогенном направлении выявлялась в случае образцов с распределением заряда по поверхности, близким к линейному, т. е. имеющих составляющую электрического поля, параллельную поверхности электрета. Можно предполагать, что если под влиянием электрического поля электрета ММСК активно вступают в хондрогенную дифференцировку, то этот процесс будет способствовать восстановлению хряща, а если в остеогенную — восстановлению кости. Возможно, электрическое поле электрета вызывает активацию миграции ММСК из субхондральных участков костного мозга к местам повреждения кости и хряща, в которых ММСК пролиферируют и дифференцируются, участвуя в формировании новой ткани. Также эффект воздействия поля электрета может выражаться в способствовании правильной организации белков хрящевого матрикса. Все эти утверждения (предположения) требуют дополнительных исследований. Можно заключить, что воздействие электрического поля помогает процессам нормального хондрогенеза и остеогенеза и приводит к более активной дифференцировке, чем в контроле. Наиболее ярко эти признаки были выражены при воздействии на клетки линейно заряженного образца.

Авторы выражают глубокую благодарность В. В. Зенину (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) за помощь в получении данных проточной цитофлуориметрии.

#### Список литературы

- Александрова О. И., Александрова С. А., Хомутов В. П., Моргунов М. С., Блинова М. И. 2018. Жизнеспособность клеток различных типов, культивируемых на поверхности медицинского электрета. Журн. техн. физики. 88 : 1348—1354. (Aleksandrova O. I., Aleksandrova S. A., Khomutov V. P., Morgunov M. S., Blinova M. I. 2018. Viability of different types of cells cultivated on the surface of medical electret. Zhurn. Tekhn. Fiziki. 88 : 1348—1354.)
- Артемьев А. А., Руцкий В. В., Артемьев Ал. Ал. 1990. Влияние электретов на остеорепарацию при интрамедуллярном остеосинтезе. Ортопедия, травматология и протезирование. 7 : 26—29. (Artemiev A. A., Rutskiy V. V., Artemiev Al. Al. 1990. The influence of electrets on osteoreparation in intramedullary osteosynthesis. Orthopedics, traumatology and prosthetics. 7 : 26—29.)
- Богданович И. П. 2010. Лечение хондральных и остеохондральных дефектов коленного сустава. Журн. ГрГМУ. 2 : 72—76. (Bogdanovich I. P. 2010. Treatment of chondral and osteochondral knee joint defects. J. Grodno State Med. Univ. 2 : 72—76.)

- Губкин А. Н. 1987. Электреты. М.: Наука. 192 с. (*Gubkin A. N. 1987. Electrets. Moscow: Nauka. 192 p.*)
- Игнатъев В. К., Марусенко И. М., Везикова Н. Н., Варга О. Ю. 2003. Остеоартроз. Петрозаводск: ПетрГУ. 88 с. (*Ignatiev V. K., Marusenko I. M., Vezikova N. N., Varga O. Ju. 2003. Osteoarthritis. Petrozavodsk: Petrozavodsk State Univ. 88 p.*)
- Копышев М. А. 2006. Применение электретов в медицине. СПб.: Научно-производственная фирма ЭЛИМЕТ. 121 с. (*Kopyshchev M. A. 2006. The use of electrets in medicine. St. Petersburg: Research and production company ELMET. 121 p.*)
- Линник С. А., Хомутов В. П. 2017. Исследование эффективности электростатического поля в лечении остеоартроза. РМЖ Мед. обзор. 1 : 2—5. (*Linnik S. A., Khomutov V. P. 2017. Study of the effectiveness of the electrostatic field in the treatment of osteoarthritis. Medreview RMJ. 1 : 2—5.*)
- Макаревич А. В., Пинчук Л. С., Гольдаде В. А. 1998. Электрические поля и электроактивные материалы в биологии и медицине. Гомель: ИММС НАНБ. 106 с. (*Makarevich A. V., Pinchuk L. S., Goldade V. A. 1998. Electric fields and electroactive materials in biology and medicine. Gomel: Institute of Mechanics of Metal-Polymer Systems of the NAS of Belarus. 106 p.*)
- Моргунов М. С., Нетупский И. В., Орлов В. М., Хомутов В. П. 2012. Имплантаты с электретным покрытием из анодного оксида тантала и полимера. Материаловедение. 7 : 26—30. (*Morgunov M. S., Netupskiy I. V., Orlov V. M., Khomutov V. P. 2012. Implants with electret coating from anodic tantalum oxide and polymer. Material Science. 7 : 26—30.*)
- Моргунов М. С., Хомутов В. П. 2013. Способ лечения артрозов, остеонекрозов и других видов артропатий и устройства для его осуществления. Патент РФ № 2563107, дата приоритета 21.11.2013, патентообладатель ООО «Медэл». (*Morgunov M. S., Khomutov V. P. 2013. Method for treatment of arthrosis, osteonecrosis and other forms of arthropathy and device for its implementation. RF patent RU 2563107, priority date is 21.11.2013; LLC Medel is a right holder.*)
- Нелин Н. И., Хомутов В. П., Моргунов М. С. 2017. Особенности электрогенеза при асептическом некрозе головки бедренной кости в эксперименте. В кн.: Актуальные вопросы травматологии-ортопедии Сибири и Дальнего Востока. М.: Эко-Пресс 111—117. (*Nelin N. I., Khomutov V. P., Morgunov M. S. 2017. Features of electrogenesis in aseptic necrosis of the femur head in the experiment. In: Topical issues of traumatology and orthopedics in Siberia and the Far East. Moscow: Eco-Press. 111—117.*)
- Руцкий В. В., Хомутов В. П., Моргунов М. С. 1988. Особенности остеорепарации при накостном остеосинтезе с использованием электретов. Ортопедия. Травматология и протезирование. 12 : 1—6. (*Rutskiy V. V., Khomutov V. P., Morgunov M. S. 1988. Features of osteoreparation in external fixation using electrets. Orthopedics. Traumatol. Prosth. 12 : 1—6.*)
- Сесслер Г. (Ред.). 1983. Электреты. М.: Мир. 487 с. (*Sessler G. (Ed.). 1983. Electrets. Moscow: Mir. 487 p.*)
- Ткаченко С. С., Руцкий В. В. 1989. Электростимуляция остеорепарации. Л.: Медицина. 207 с. (*Tkachenko S. S., Rutskiy V. V. 1989. Electrostimulation of osteoreparation. Leningrad: Medicine. 207 p.*)
- Хомутов В. П., Быстров Ю. А., Василевич С. В., Корецкий В. Н. 2005. Применение электретов в медицине. В кн.: Эволюция остеосинтеза. СПб.: МОРСАР АВ. 135—151. (*Khomutov V. P., Bystrov Yu. A., Vasilevich S. V., Koretskiy V. N. 2005. The use of electrets in medicine. In: Evolution of osteosynthesis. St. Petersburg: MORSAR AV. 135—151.*)
- Хомутов В. П., Ласка В. Л. 1997. Технология ВПК в хирургии костей. Петербургский журнал электроники. 2 (15) : 3—9. (*Khomutov V. P., Laska V. L. 1997. Defense industry technology in bone surgery. St. Petersburg Journal of Electronics. 2 (15) : 3—9.*)
- Дену Р. А., Немчек С., Блум Д. Д., Гудрич А. Д., Ким Дж., Мосер Д. Ф., Хематти П. 2016. Fibroblasts and mesenchymal stromal/stem cells are phenotypically indistinguishable. *Acta Haematol.* 136 : 85—97.
- Хаусчка П. В., Лиан Дж. В., Коул Д. Е., Гундберг С. М. 1989. Osteocalcin and matrix-Gla-protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol. Rev.* 69 : 990—1047.
- Хуа Дж., Эн-тан Г. 1996. Effect of postoperative treatment with a combination of chuangxiang and electret on functional recovery of muscle grafts: an experimental study in the dog. *Plast Reconstr. Surg.* 98 : 851—855.
- Левин М., Мартынюк С. Дж. 2018. The bioelectric code: an ancient computational medium for dynamic control of growth and form. *BioSystems.* 164 : 76—93.
- Лоесер Р. Ф., Голдринг С. Р., Сканзелло С. Р., Голдринг М. В. 2012. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64 : 1697—1707.
- Лорис Р. Дж., Луйтен Ф. П. 2011. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7 : 43—49. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.197.
- Питтенгер М. Ф., Мбалавие Г., Блэк М., Моска Дж. Д., Маршак Д. Р. 2001. Mesenchymal stem cells. In: *Koller M. R., Pals-son B. O., Masters J. R. W. (Eds.). 2001. Human cell culture. The Netherlands Kluwer: Acad. Publ.* 5 : 189—207.
- Юан Х. Л., Мэнг Х. Я., Ванг Я. С., Пенг Дж., Гуо Ц. Я., Ванг А. Я., Лу С. В. 2014. Bonecartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarth. Cartilage.* 22 : 1077e1089. Doi: 10.1016/j.joca.2014.05.023.

Поступила 10 V 2018

INFLUENCE OF THE ANODE TANTAL OXIDE ELECTRET ELECTRIC FIELD  
ON THE BONE MARROW STROMAL CELLS DIFFERENTIAL PROPERTIES  
FROM A PATIENT WITH OSTEOARTHROSIS

S. A. Aleksandrova,<sup>1,\*</sup> O. I. Aleksandrova,<sup>1</sup> V. P. Khomutov,<sup>2</sup>  
M. S. Morgunov,<sup>2</sup> M. I. Blinova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

<sup>2</sup> LLC «Medel», St. Petersburg, 194044;

\* e-mail: alekssvet2205@gmail.com

The ability of the bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) of a patient with osteoarthritis to differentiate in the osteogenic and chondrogenic directions under the influence of an electric field of an electret created on the surface of an anodic tantalum oxide was investigated. It is shown that in the presence of samples with anodic oxide in the electret state in the MMSCs the processes of synthesis of protein-differentiation markers are intensified. In the process of osteogenic differentiation of MMSCs, osteocalcin expression



---

was significantly enhanced. In the process of chondrogenic differentiation — formation of spheroids, amplification of aggrecan and type II collagen expression was observed. These signs were most pronounced when exposed to cells of electret specimens with a charge distribution on the surface close to linear.

Key words: electrets, osteoarthritis, multipotent mesenchymal stromal cells, chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation

---