ИЗВЕСТИЯ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ
Т. 56, № 12/3 ФИЗИКА 2013

УДК 577.29-575.155 576.7 616-092.18 669-49 616-003.96

М.В. ДВОРНИЧЕНКО,**, К.А. НЕЧАЕВ*, А.Е. СИЗИКОВА*, Е.В. ЛЕГОСТАЕВА***,*
*Ю.П. ШАРКЕЕВ**,***, И.А. ХЛУСОВ*,***

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ КЛЕТОК НА БИОСОВМЕСТИМЫЕ ИМПЛАНТАТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ[1]

Проведена оценка молекулярно-генетических реакций клеток на биосовместимые материалы, применяемые в травматологии и ортопедии. У пациентов с дисплазией соединительной ткани (ДСТ) изучены хромосомные аберрации в культуре лимфоцитов и молекулярные реакции мононуклеарных лейкоцитов (секреция остеокальцина и CrossLaps в кондиционные жидкости) при их краткосрочном контакте с искусственными материалами (наноструктурированные титановые образцы имплантатов, несущие двустороннее кальцийфосфатное покрытие). Установлен повышенный мутагенез при ДСТ, связанный с образованием одиночных и парных фрагментов хромосом. При добавлении модельных биосовместимых композитов в культуры клеток, выделенных из крови больных ДСТ, выявлено снижение доли аберрантных мононуклеарных лейкоцитов, несущих одиночные и/или парные разрывы хромосом (в сравнении со спонтанным тестом), а также секреции остеокальцина по сравнению с результатами здоровых добровольцев. Оценка молекулярно-генетических реакций клеток на биосовместимые имплантаты может рассматриваться как методологическая платформа для персонализированного доклинического тестирования эффективности биоматериалов, применяемых в терапии осложнений патологии опорно-двигательного аппарата при наследственных коллагенопатиях.

Ключевые слова: *дисплазия соединительной ткани, нанокомнозитные материалы, остеокальцин, Cross-laps, хромосомные абберации.*

Введение

Травматизм и заболевания опорно-двигательного аппарата, по сравнению с другими областями биологии и медицины, являются одними из ведущих как в структуре инвалидности и смертности населения, так и по внедрению искусственных материалов с биоактивными свойствами [1, 2]. В связи с этим, актуальным является поиск новых способов замены утраченных структур и функций при одновременном ускорении репарации и обеспечении безопасности регенеративных процессов. Наноматериалы находят применение и в качестве покрытий на конструкции для металлоостеосинтеза. В экспериментальных исследованиях показано, что покрытия из наноразмерных частиц фосфата кальция способствуют лучшей остеоинтеграции в сравнении с обычными кальцийфосфатными покрытиями [3]. Кроме того, модификация покрытий позволяет создавать пористые наноструктурные компоненты имплантатов, имеющие большую площадь поверхности для взаимодействия с клетками, белками и молекулами лекарственных препаратов [4]. Однако вопросы взаимодействия биологических структур и искусственных наноразмерных и ультрамелкодисперсных (0-100-1000 нм) систем на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях практически не изучены, методики трудно воспроизводимы [5].

Одним из перспективных направлений применения материалов является разработка терапевтических решений в области детской патологии костно-мышечной системы и соединительной ткани, частота которой достигает 31,5 %, а среди всех детей с ограниченными функциональными возможностями указанная патология встречается с частотой 5,3 % [6, 7].

Одними из наиболее проблематичных в плане терапевтических решений являются диспластические состояния соединительной ткани: ДСТ и несовершенный остеогенез. Они характеризуются нарушением гистогенеза в эмбриональный и постнатальный периоды как следствие генетически измененного фибриллогенеза внеклеточного матрикса, который затрагивает все виды соединительной ткани [7, 8].

Возможными исходами при использовании имплантируемых материалов являются их способности вызывать как негативные (в виде гиперчувствительности), так и позитивные реакции в виде стимуляции репаративных процессов в костной ткани [9, 10]. Актуальной, на наш взгляд,

[1] Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (соглашение № 8036 от 12.07.2012 г.), программы Президиума РАН «Фундаментальные науки– медицине» № 5 ФНМ-45, проекта РФФИ № 12 03-00903-а.

представляется попытка моделирования *in vitro* (до клинического применения) остеолитических/остеоиндуктивных механизмов и выявления предикторов эффективности имплантатов для лечения сочетанной или генетически обусловленной патологии опорно-двигательного аппарата.

В данной работе была проведена оценка цитогенетического эффекта нанокомпозитных материалов, активно применяемых в травматологии и ортопедии при травмах и дисплазиях соединительной ткани.

Материалы и методы исследования

Учитывая, что нарушение структуры хромосом отражает мутагенные процессы при воздействии факторов как эндогенной, так и экзогенной природы, была проведена оценка цитогенетического эффекта нанокомпозитных материалов, применяемых в травматологии и ортопедии при травмах и дисплазиях соединительной ткани. Для проведения исследования выбран алгоритм, основанный на анализе вариабельности уровня хромосомных аберраций в культуре лимфоцитов при краткосрочном контакте с искусственными материалами.

Забор венозной крови для цитогенетического анализа производился в вакуумные контейнеры типа «Vacuette» объёмом 10 мл с антикоагулянтом (гепарином). Кровь культивировали при +37 ^{o}C в питательной среде, содержащей 85 % среды RPMI-1640 («Sigma», США) и 15 % эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США). Среду для культивирования стерильно добавляли во флаконы с кровью из расчёта 5 мл среды на 1 мл крови. Вторую часть крови пациентов и здоровых добровольцев культивировали в присутствии потенциального индуктора мутагенеза (тестируемые образцы материалов см. ниже) из расчета 1 диск на 1 флакон. В каждый флакон вносили по 0,2 мл фитогемагглютинина, используемого для стимуляции деления лимфоцитов. Фиксацию культур проводили через 72 ч культивирования, так как в этот период отмечается наибольшее число клеток первого митоза [11]. При более поздних сроках фиксации культур происходит изменение состава клеточной популяции, так как появляются клетки во втором и третьем митозах, и, вследствие элиминации части поврежденных хромосом, изменяются частота и спектр хромосомных аберраций [11]. Для накопления клеток в стадии метафазы в культуры клеток за 1 ч 45 мин до окончания культивирования вводили 180 мкл колхицина в конечной концентрации 0,06 мкг/мл. Через 1 ч 45 мин содержимое флаконов взбалтывали, переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при скорости 300 g. Супернатанты (надосадочные жидкости) удаляли и добавляли гипотонический раствор (0,55 %-й раствор хлорида калия) в количестве 8 мл. Гипотоническая обработка осуществлялась при +37 ^{o}C в течение 45 мин. После центрифугирования (5 мин при скорости 300 g) надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 8 мл фиксатора (этаноллед яная уксусная кислота в соотношении 3:1). Пробирки встряхивали и оставляли в холодильнике при 4 °C на 30 мин. Смену фиксатора проводили 2 раза. Из полученной суспензии приготавливали препараты [11]. Хромосомный анализ проводили на препаратах с помощью микроскопа марки Nicon при малом (10×10) и большом (10×100) увеличении. Отбор метафазных пластинок осуществляли с учётом следующих требований: цельность метафазной пластинки, чёткость окраски, отсутствие или небольшое число (1–4) поперечных наложений хромосом, средняя степень их конденсации, обособленность метафазных пластинок друг от друга. У каждого индивида было обследовано не менее 300 метафаз. Цитогенетические эффекты мутагенного воздействия оценивали по следующим параметрам: доля аберрантных клеток (отношение числа аберрантных метафаз к общему числу проанализированных метафаз), число аберраций (на 100 клеток), число одиночных и парных разрывов нитей ДНК на 100 клеток.

Для оценки молекулярных реакций на модельные имплантаты мононуклеарные лейкоциты выделяли из периферической крови в стерильных условиях методом центрифугирования в течение 10 мин при 500 g с использованием градиента плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) (ρ = = 1,077 г/см^3). Взвесь клеток (жизнеспособность более 95 %) культивировали в течение 72 ч при температуре 36 °C в концентрации $5 \cdot 10^6$ мононуклеаров на лунку в 1 мл полной культуральной среды, способствующей остеогенной дифференцировке клеток: 80 % среды ДМЕМ/F12 (1 : 1), 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, 280 мг/л L-глутамина, 50 мг/л гентамицина сульфата, 10 ммоль бета-глицерофосфата, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 10^{-6} моль дексаметазона, 10 ммоль HEPES-буфера [12]. Супернатанты (кондиционные жидкости) получали путем забора надосадочной части клеточных культур, их центрифугирования в течение 10 мин при 500 g. В кондиционных средах иммуноферментным методом реактивами Nordic Bioscience Diagnostics

(Дания) оценивали маркеры костного ремоделирования (концентрации остеокальцина, продуктов деградации коллагена I типа (CrossLaps)), как описано ранее [13].

В качестве потенциальных индукторов мутагенеза применяли изготовленные в ИФПМ СО РАН подложки из наноструктурированного титана ВТ1.0 (диаметр 12 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние кальцийфосфатные покрытия. Наноструктурные покрытия наносили на титановую подложку с помощью модификации способа микродугового оксидирования в электролите, как описано ранее [14].

Шероховатость поверхности (R_a) искусственных покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5–120 (разрешающая способность 10 нм). Определяли R_a (мкм) как средний результат шероховатости в пределах нескольких длин участков измерений согласно ГОСТ 2789-73. Измеренный индекс R_a фиксировали для всех модельных матриксов в одном диапазоне (1,33–1,44 мкм), чтобы нивелировать известный эффект шероховатости на поведение клеток [15].

В основную группу включено 6 пациентов (5 мужчин и 1 женщина) с синдромом дисплазии соединительной ткани (ДСТ). Для постановки диагноза была изучена клиническая картина с оценкой диспластических изменений в соединительной ткани по классификации D.O. Sillence [16, 17]. Синдром ДСТ был поставлен на основании полного физикального исследования с оценкой стигмального статуса, использования расчетных индексов и клинических тестов: тесты на наличие арахнодактилии и долихостеномелии, определение гипермобильности суставов по тесту Бейтона, плантографии. Определение степени тяжести ДСТ по критериям Т. Милковска-Димитровой, А. Каркашеву [18] в модификации Л.Н. Фоминой [19], согласно которым у всех пациентов основной группы синдром ДСТ оценен как «тяжелый». Причиной синдрома ДСТ у всех пациентов основной группы явилась врожденная патология – несовершенный остеогенез (по 3 пациента с IVA и III типом заболевания по классификации Sillence). В контрольную группу включено 4 здоровых донора, сопоставимых по возрасту с пациентами с синдромом ДСТ. От всех обследованных было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Полученные результаты выражали как выборочное среднее (X) и ошибка среднего (SD). При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). В выборках наблюдалось распределение показателей, отличное от нормального. В связи с этим, для оценки статистической значимости различий выборок применяли непараметрические U-тест Манна-Уитни (для независимых выборок) и Т-критерий Вилкоксона (для зависимых выборок). Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение

При оценке активности индуцированного мутагенеза у здоровых доноров в присутствии модельных биосовместимых имплантатов статистически значимых изменений хромосомных аберраций в лимфоцитах не выявлено (табл. 1). ДСТ сопровождается повышенным фоном спонтанного мутагенеза в клетках крови (табл. 1). При этом в культуре мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови пациентов с ДСТ, после введения искусственных матриксов, имитирующих поверхность регенерирующей кости, установлено значительное (более чем в 2 раза) снижение доли аберрантных клеток, а также числа аберраций в клетках (в 2,3 раза) (табл. 1). Репарация двойных повреждений хромосом затруднена из-за отсутствия комплементарного участка ДНК [20], что предполагает потерю части генетического аппарата при делении клетки, способного привести к клеточной гибели. Поскольку в наших исследованиях полностью элиминируются мутантные клетки, несущие двойные разрывы хромосом, можно предполагать, что это связано с их гибелью после контакта с тестируемыми изделиями.

При изучении маркеров костного метаболизма в супернатантах мононуклеаров, выделенных из крови здоровых добровольцев и контактировавших с имплантатами, не выявлено достоверных изменений уровней остеокальцина и CrossLaps по сравнению с культурой клеток на пластике (табл. 2). В свою очередь, в группе больных с ДСТ имело место статистически значимое снижение (более чем на 21 %) концентрации молекул остеокальцина как проявление негативной функциональной реакции лейкоцитов на искусственный материал (табл. 2).

Таблица 1

Сравнительный анализ спонтанного и индуцированного мутагенеза (при контакте с образцами имплантатов) в лимфоцитах крови у здоровых доноров и пациентов с дисплазией соединительной ткани в условиях краткосрочного контакта с тестируемыми материалами, X±SD

Показатель	Здоровые доноры, $n = 4$		Дисплазия соединительной ткани, $n = 6$	
	Спонтанный мутагенез	Индуцированный мутагенез	Спонтанный мутагенез	Индуцированный мутагенез
% аберрантных клеток (число аберрантных метафаз к общему числу метафаз)	0,50±0,12	0,79±0,04	2,9±0,14*	1,42±0,08*,**
Число аберраций на 100 клеток	0,58±0,28	0,79±0,10	3,59±0,12*	1,56±0,11*,**
В том числе: - одиночные фрагменты	0,42±0,11	0,69±0,04	2,40±0,09*	1,56±0,10*
- парные фрагменты	0,16±0,10	0,10±0,03	1,19±0,05*	0,00±0,00**

Примечание. * – статистические различия ($p < 0,05$) показателей пациентов и здоровых доноров; ** – статистические различия показателей пациентов с дисплазией соединительной ткани в тестах спонтанного и индуцированного мутагенеза согласно U-критерия Манна – Уитни; n – число обследованных добровольцев.

Согласно обзору [21], в периферической крови человека обнаружена небольшая популяция клеток, несущих маркеры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), количество которых увеличивается при заболеваниях или методиках, вызывающих их мобилизацию из костного мозга. В частности, подразумевается циркуляция подобных клеток в крови при несовершенном остеогенезе и ДСТ [17]. Остеокальцин является молекулярным маркером остеобластов, потомков ММСК, синтезирующих коллаген I типа [22].

Таблица 2

Показатели секреторной активности *in vitro* мононуклеаров крови (% от контроля на пластиковой поверхности лунок планшета) через 52 ч после контакта с тестируемыми образцами, X±SD

Группа наблюдений	Изучаемые показатели в кондиционных средах культур клеток	
	Остеокальцин	CrossLaps
Здоровые добровольцы, $n = 4$	116,67±42,36	141,94±130,65
Дисплазия соединительной ткани, $n = 6$	78,86±10,01*	104,09±29,25

Примечание. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с культурой клеток на пластике согласно Т-критерию Вилкоксона; n – число обследованных добровольцев.

В связи с этим, описанные молекулярные изменения секреторного статуса мононуклеарных лейкоцитов крови при ДСТ отражают активность костных клеток в модельной ситуации, имитирующей их контакт с регенерирующим костным матриксом. Отрицательный эффект синтезируемой мутантной цепи коллагена I типа [23], присутствующей в одной молекуле белка с нормальной цепочкой, реализуется при формировании дефектного трехмерного внеклеточного матрикса соединительной ткани и ее производных. Нарушение трехмерной структуры волокнистого вещества при ДСТ способно нарушать, по механизму обратной связи, структурно-функциональное состояние клеток. Как следствие, восстановление нормального паттерна экстрацеллюлярного матрикса за счет введения в культуру клеток имплантатов, имитирующих минеральную (кальцийфосфатную) часть кости, способно, по-видимому, нормализовать и регулировать трансмембранные сигнальные процессы и структурное состояние внутриклеточных органелл.

Выявленный феномен улучшения состояния хромосомного аппарата в лимфоцитоподобных клетках крови с функциональной активностью остеобластов у пациентов с патологией соединительной ткани требует дальнейшего изучения для понимания механизмов эффективной биоинтеграции и терапевтического эффекта биоактивных (с кальцийфосфатным покрытием) имплантатов, выявленного ранее [17] при остеосинтезе переломов у пациентов с ДСТ различной степени тяжести.

Заключение

Краткосрочный контакт модельных матриксов с культурой лимфоцитов, выделенной из крови пациентов с дисплазией соединительной ткани, но не здоровых доноров, сопровождался снижением выхода хромосомных аберраций (одиночных и парных разрывов ДНК) и секреции остеокальцина мононуклеарными лейкоцитами. Возможно, это связано с эпигенетическим влиянием кальцийфосфатных материалов, имитирующих природный минеральный матрикс кости, на хромосомный аппарат клеток мезенхимального происхождения. Описанный антимутагенный эффект в условиях патологии заболеваний соединительной ткани интересен как потенциальный прогностический критерий и предиктор успешности применения имплантатов в хирургическом лечении осложнений патологии опорно-двигательного аппарата при наследственных коллагенопатиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лунев В.П. // Медико-соц. экспертиза и реабилитация. – 2007. – № 2. – С. 25–27.
2. Миронов С.П. Ортопедия. Национальное руководство. – М.: Гэотар-Медиа, 2008.
3. Баринов С.М. Биокерамика на основе фосфатов кальция. – М.: Наука, 2005. – 204 с
4. Гречников Ф.В., Соснина Т.Н. // Известия Самарского научного центра РАН. – 2007. – Т. 9. – № 3. – С. 562–569.
5. Проданчук Н.Г., Балан Г.М. // Современные проблемы токсикологии. – 2009. – № 3–4. – С. 4–20.
6. Dorozhkin S.V. // J. Mater. Sci. – 2007. – V. 42. – P. 1061–1095.
7. Горбунова В.Н., Кадурина Т.И., Белоног О.Л. и др. // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2011. – № 1. – С. 110–113.
8. Чурилина А.В., Москалюк О.Н. // Здоровье ребенка. – 2006. – Т. 1. – № 1. – http://www.mif-ua.com/archive/article/240
9. Севастьянов В.И. Биосовместимость. – М.: ИЦ ВНИИГС, 1999. – 367 с.
10. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / ed. by B.D. Ratner [et al.]. – San Diego: Elsevier Academic Press. 2nd edition, 2004. – 851 p.
11. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. – Бином. Лаборатория знаний. – 2010. – 706 с.
12. Введение в методы культуры клеток, биоинженерии органов и тканей / под ред. В.В. Новицкого, В.П. Шахова, И.А. Хлусова. – Томск: STT, 2004. – 386 с.
13. Карлов А.В., Саприна Т.В., Кириллова Н.А. и др. // Гений ортопедии. – 2008. – № 4. – С. 84–88.
14. Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu., et al. // Composite Interfaces. – 2009. – V. 16. – P. 535–546.
15. Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Гостищев Э.А. и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10. – № 3. – С. 72–81.
16. Sillence D.O., Senn A., and Danks D.M. // J. Med. Genet. – 1979. – V. 16. – P. 101–116.
17. Хлусов И.А., Саприна Т.В., Нечаев К.А. и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – Т. 9. – № 6. – С. 71–79.
18. Милковска-Дмитрова Т., Каркашев А. Врождена соеденительнотканна малостойкость у децата. – София: Медицина и физкультура, 1987. – 189 с.
19. Фомина Л.Н. Клинические формы соединительнотканной дисплазии у детей: учеб. пособие. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2001. – 60 с.
20. Бочков Н.П., Захаров А.Ф., Иванов В.И. Медицинская генетика (руководство для врачей). – М.: Медицина, 1984. – 365 с.
21. He Q., Wan C., and Li G. // Stem Cells. – 2007. – V. 25. – P. 69–77.
22. Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж. Остеопороз: пер. с англ. – СПб.: ЗАО «Издательство БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.
23. Prockop D.J. and Kivirikko K. // Ann. Rev. Biochem. – 1995. – V. 64. – P. 403–434.

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск, Россия
**Национальный исследовательский Томский политехнический университет, г. Томск, Россия
***Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск, Россия
E-mail: dochic@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.11.13.

Дворниченко Марина Владимировна, к.м.н., доцент каф. морфологии и общей патологии СГМУ, инженер каф. теоретической и экспериментальной физики ТПУ;

Нечаев Кирилл Андреевич, аспирант каф. фармакологии;

Сизикова Анастасия Евгеньевна, студентка;

Легостаева Елена Викторовна, к.ф.-м.н., ст. науч. сотр.;

Шаркеев Юрий Петрович, д.ф.-м.н., профессор, зав. лаб. физики наноструктурных биосовместимых композитов;

Хлусов Игорь Альбертович, д.м.н., профессор, профессор каф. морфологии и общей патологии СГМУ, профессор каф. теоретической и экспериментальной физики ТПУ.