

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ

Е.В. Лопатина^{1,2}, Н.А. Пасатецкая^{2,3}

¹*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

²*Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

³*Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия, evlopatina@yandex.ru*

В настоящее время инфекция в области хирургического вмешательства является наиболее серьезным осложнением при ортопедических операциях. Зачастую инфекционный процесс принимает хронический характер. В этом случае повторные оперативные вмешательства приводят к развитию костных дефектов. Для замещения дефектов костной ткани после санации инфекционного очага, часто используют комбинации остеозамещающих материалов и антибактериальных препаратов. Широко распространено использование костного цемента на основе полиметилметакрилата (ПММА) в сочетании с антибиотиками различных классов. Несмотря на хорошо изученный механизм действия и широкое применение фосфомицина и ванкомицина влияние препаратов на рост и пролиферацию клеток костной ткани изучено слабо.

Цель: Исследовать влияние фосфомицина и ванкомицина на эксплантаты костной ткани в условиях органотипического культивирования

Материалы и методы. Исследование проводили на эксплантатах ткани кости 10-12 дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на подложках из коллагена в питательной среде в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение 3-х суток при 37°C и 5% CO₂. Препаровку осуществляли инструментами для микрохирургии глаза. Фрагменты бедренной кости, очищенные от надкостницы, аккуратно переносили на коллагеновую подложку чашек Петри. Каждая чашка содержала от 15 до 20 эксплантатов.

Питательная среда содержала 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), глюкозы (0,6%), глютамина (2мМ), гентамицина, 5% куриного эмбрионального экстракта и 10% фетальной сыворотки коровы [5]. Через 3-е суток культивирования вокруг исходной зоны формируется зона роста. Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде стандартного состава. В культуральную среду экспериментальных чашек добавляли антибиотики фосфомицин в концентрациях от 10⁻² М до 10⁻⁶ М и ванкомицин в широком диапазоне концентраций (от 10⁻⁴ М до 10⁻¹³ М). Для визуализации объектов использовали микроскоп «Axiostar Plus» («Carl Zeiss», Германия) по методу, описанному ранее [6]. Полученные изображения анализировали при помощи программы ImageJ. Прижизненное окрашивание препаратов ткани кости осуществляли фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Texas Red (Texas Red®-X phalloidin, Life Technologies, USA) и исследовали с помощью лазерного сканирующего микроскопа «LSM 710» («Carl Zeiss», Германия). Фаллоидин высокоспецифично связывается с F-актином и позволяет оценивать актиновый цитоскелет клеток зоны роста. Для доказательства присутствия клеток остеогенного ряда в зоне роста исследуемых эксплантатов использовали антитела к рецептору витамина Д₃.

Для улучшения визуализации эксплантаты культивировали в чашках μ -Dish (IBIDI, Германия) дно которых выполнено с тонкой вставкой из оптически чистого пластика, имеющего коэффициент оптического преломления, соответствующий стеклу и иммерсионному маслу. Для количественной оценки степени роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывали, как отношение общей пло-

щади эксплантата к площади центральной зоны. Контрольное значение ИП принимали за 100%. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Фосфомицин исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-2} М до 10^{-6} М. В концентрации 10^{-2} М антибиотик достоверно ингибировал рост эксплантатов ткани кости на 46% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. При введении в питательную среду фосфомицина в концентрациях 10^{-3} М и 10^{-4} М ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на 12 и 18 % соответственно. Исследование влияния фосфомицина в концентрации 10^{-6} М на рост эксплантатов костной ткани не выявило достоверных отличий между значением ИП контрольных и экспериментальных эксплантатов. Стимулирующее действие фосфомицина на рост эксплантатов ткани кости не обнаружено.

Доказано, что в условиях органотипического культивирования высокие концентрации (10^{-4} - 10^{-5} М) ванкомицина практически полностью блокируют рост эксплантатов костной ткани. Снижение дозы препарата до 10^{-6} М и 10^{-7} М также проводило к значимому угнетению ($p < 0,05$) роста экспериментальных эксплантатов на 57% и 27% соответственно. Обнаружена максимальная эффективная стимулирующая концентрация препарата, которая составила 10^{-12} М. ИП экспериментальных эксплантатов через 3-е суток культивирования в питательной среде, содержащей ванкомицин в указанной дозировке, был достоверно выше контрольного значения на 86% ($p < 0,05$). Введение в питательную среду ванкомицина в концентрациях 10^{-10} М и 10^{-13} М стимулировало рост эксплантатов ткани кости на 49% и 23% соответственно ($p < 0,05$). Таким образом, впервые обнаружено трофотропное действие препарата в диапазоне концентраций от 10^{-10} М до 10^{-13} М.

В ходе сравнительного анализа эффективности фосфомицина и ванкомицина при лечении хронического остеомиелита *in vivo* установлено, что фосфомицин легко проникает и накапливается в инфицированной костной ткани (Poeppel et al., 2014; Naag et al., 1989). Это, по-видимому, объясняется структурным сходством молекулы антибиотика и гидроксипатата (Schintler et al., 2009). В отличие от фосфомицина большая молекула ванкомицина плохо проникает в костную ткань и биопленки (Monzon et al., 2001). При местном применении фосфомицин также способен ускорять репарацию послеоперационных и посттравматических ран с нарушением целостности кожных покровов, стимулируя процессы гемостаза и ангиогенеза, активируя хемотаксис моноцитов и фибробластов в очаг воспаления, а также повышая количество макрофагов, продуцирующих тканевой фибронектин. Однако данные свойства фосфомицина в настоящее время не находят широкого клинического применения, возможно, за счет недостаточной ранозаживляющей активности (Гайдуль К.В. и др. 2012).

Выводы. Разработанная методика органного культивирования костной ткани может использоваться для оценки фармакологической и физиологической активности активных субстанций и материалов.

Экспериментально доказано, что фосфомицин в диапазоне концентраций от 10^{-2} М до 10^{-6} М дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани кости. Стимулирующее рост эксплантатов ткани кости действие фосфомицина не обнаружено.

В условиях органотипического культивирования костной ткани обнаружено трофотропное действие ванкомицина в диапазоне концентраций от 10^{-10} М до 10^{-13} М.

Полученные экспериментальные данные позволят дифференцированно включать исследуемые антибиотики в состав остеозамещающих материалов в ходе хирургических вмешательств при эндопротезировании крупных суставов.