

ТРИБОХИМИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ИСКУССТВЕННЫХ СУСТАВОВ. ЧАСТЬ 3. ИНГИБИРОВАНИЕ РАДИКАЛООБРАЗУЮЩЕЙ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ ЧАСТИЦ ИЗНОСА АНТИОКСИДАНТАМИ И КОСТНЫМ ЖИРОМ

В.Г. Булгаков, В.К. Ильина, Н.С. Гаврюшенко, А.Н. Шальнев,
Н.П. Омеляненко, В.Ф. Цепалов

ФГБУ «Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова»
Минздравсоцразвития России, Москва

Исследована ингибирующая способность ряда антиоксидантов и костного жира в отношении окислительных свойств частиц износа. Установлено, что использование ионoла и α-токоферола приводит к подавлению окисления кумола в присутствии частиц износа. Обработка частиц ортопедических сплавов костным жиром также сопровождается полным ингибированием окислительной реакции, причем продолжительность эффекта зависит от содержания антиоксидантов в костном жире. Добавление костного жира в смесь частиц сплава и полиэтилена предотвращает развитие свободнорадикальных реакций и возможную окислительную деструкцию полимера. Обработка частиц сплава костным жиром значительно снижает их негативное влияние на остеогенные клетки костного мозга человека.

Ключевые слова: частицы износа, окислительный стресс, антиоксиданты, костный жир, остеогенные клетки, пролиферация, ионы металлов.

Tribochemical Component of Oxidative Stress Development at Artificial Joints Implantation. Part 3. Inhibition of Radical-Forming and Antiproliferative Ability of Wear Particles by Antioxidants and Bone Fat

V.G. Bulgakov, V.K. Il'ina, N.S. Gavryushenko, A.N. Shal'nev,
N.P. Omel'yanenko, V.F. Tsepalov

Inhibition ability of certain antioxidants and bone fat upon the oxidative properties of wear particles was studied. It was shown that at presence of wear particles use of BHT and α-tocopherol resulted in an inhibition of cumene oxidation. Treatment of orthopaedic alloys particles with bone fat was also accompanied by complete inhibition of oxidation reaction and duration of effect depended on the content of bone fat antioxidants. Addition of bone fat into mixture of alloy and polyethylene particles prevented the development of free-radical reactions and potential oxidative destruction of polymer. Treatment of alloy particles with bone fat considerably reduced their negative influence upon human bone marrow osteogenic cells.

Key words: wear particles, oxidative stress, antioxidants, bone fat, osteogenic cells, proliferation, metal ions.

Имплантация искусственных суставов вызывает появление свободных радикалов в окружающих тканях в ходе ответных клеточных реакций, коррозионных и трибохимических процессов на поверхности имплантатов и образующихся частицах износа. В совокупности с выявленным снижением активности ферментов антиоксидантной защиты в тканях, окружающих имплантаты [15], это создает условия для возникновения окислительного стресса при эндопротезировании суставов.

В частности, активные частицы кобальтового сплава, в отличие от инертных частиц керамики, способны ингибировать пролиферацию остеогенных клеток человека и оказывать окислительное воздействие на полимерные компоненты [2]. В связи с этим необходимым условием длительного надлежащего функционирования эндопротезов суста-

вов является предупреждение образования радикалов и/или ингибирование их негативного действия на ткани и компоненты имплантатов, что требует применения при эндопротезировании суставов эффективных антиоксидантов.

Целью настоящей работы было изучить ингибирующую способность ряда антиоксидантов на окислительное действие частиц износа. Проведена также оценка защитного эффекта костного жира при воздействии частиц износа на пролиферативную способность культуры остеогенных клеток человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В опытах использовали антиоксиданты α-токоферол («Aldrich», США) и ионол (синтезирован в Институте химической физики им Н.Н. Семенова

РАН). Способ выделения костного жира и методика определения содержания в нем жирорастворимых антиоксидантов представлены в работе [3].

Метод изготовления частиц износа, методика определения их радикалообразующей способности описаны ранее [1].

Влияние костного жира на антипролиферативное действие частиц износа в культуре остеогенных клеток-предшественников костного мозга человека оценивали как в [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно на рис. 1, а, в присутствии ионола имело место существенное ингибирование окисления кумола с последующим восстановлением скорости окисления. При внесении α -токоферола отмечался период полного ингибирования окислительной реакции и снижение конечной скорости реакции.

В последующих опытах оценивали влияние образцов костного жира на окислительную способность различных частиц износа (рис. 1, б). Добавление к суспензии частиц костного жира также сопровождалось полным ингибированием реакции, продолжительность которого зависела от содержания антиоксидантов в костном жире. Так, при внесении в суспензию частиц кобальтового сплава образца костного жира, содержащего 0,13 мМ антиоксидантов, поглощение кислорода отсутствовало в течение 20 мин. Добавление такого же объемного количества костного жира, содержание антиоксидантов в котором составляло 0,74 мМ, пропорционально удлиняло и период полного ингибирования реакции. Таким образом, продолжительность эффекта костного жира напрямую зависит от содержания в нем антиоксидантов.

Наряду с отмеченным подавлением активности частиц износа кобальтового сплава, ингибирующий эффект костного жира проявляется и при окислительном действии частиц нержавеющей стали и титанового сплава (рис. 2).

Принимая во внимание ранее установленное проокислительное действие смеси частиц полиэтилена и кобальтового сплава [2], представляет значительный интерес оценить эффект костного жира на указанное действие этой комбинации частиц. Как видно на рис. 3, добавление костного жира в реакционную смесь, содержащую частицы сплава и полиэтилена, полностью ингибировало свободно-радикальные реакции и, следовательно, предупреждало возможную окислительную деструкцию полимера.

В работе [2] было установлено, что частицы износа кобальтового сплава подавляют пролиферацию остеогенных клеток человека, тогда как частицы керамики не обладают такой активностью. Учитывая выраженный антиоксидантный эффект костного жира, следует ожидать в его присутствии ослабления токсичного действия частиц сплава на культуру клеток. Для оценки этого эффекта час-

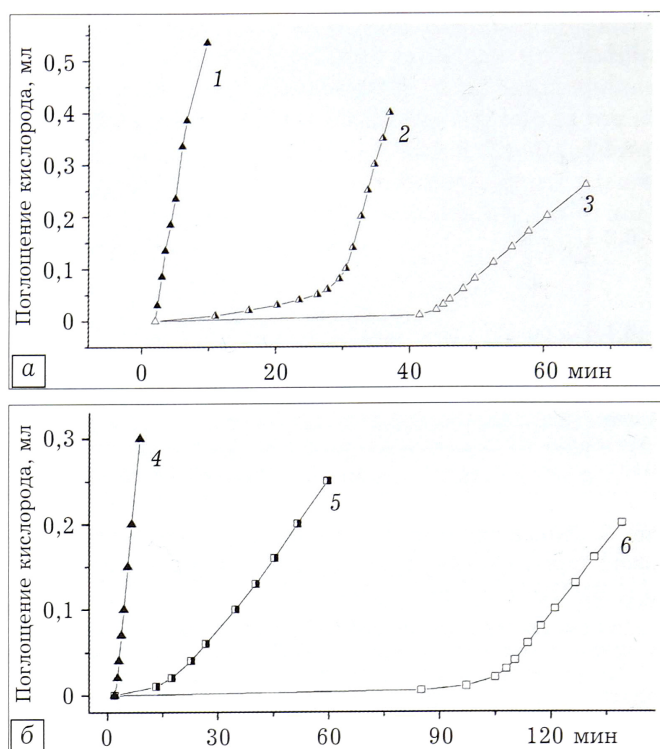


Рис. 1. Влияние антиоксидантов (а) и костного жира (б) на окисление кумола частицами износа кобальтового сплава.

1, 4 — окисление кумола в присутствии только частиц сплава; 2 — при содержании ионола 0,48 мМ; 3 — при содержании α -токоферола 12,4 мМ; 5, 6 — при содержании антиоксидантов костного жира 0,13 и 0,74 мМ соответственно.

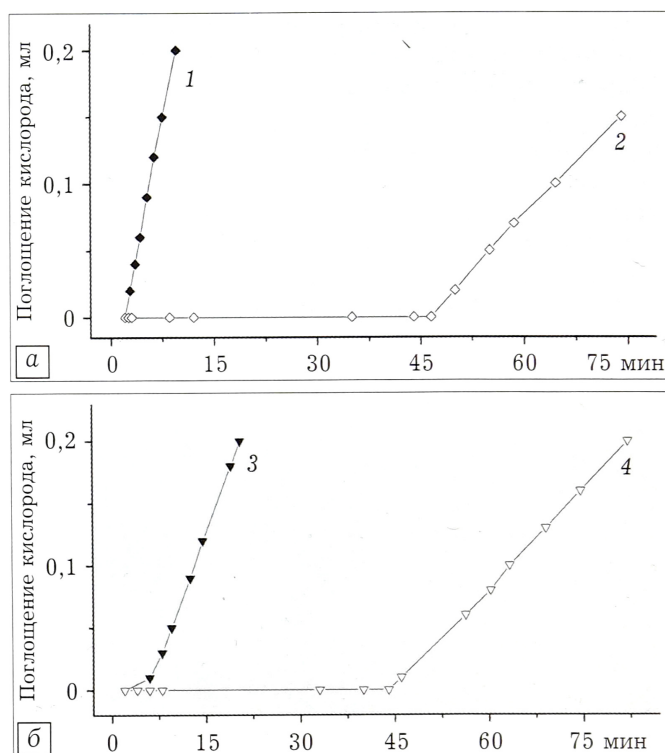


Рис. 2. Ингибирование антиоксидантами костного жира радикалообразующей способности частиц износа нержавеющей стали (а), титанового сплава (б).

1, 3 — окисление кумола в присутствии только частиц износа; 2, 4 — с добавлением костного жира.

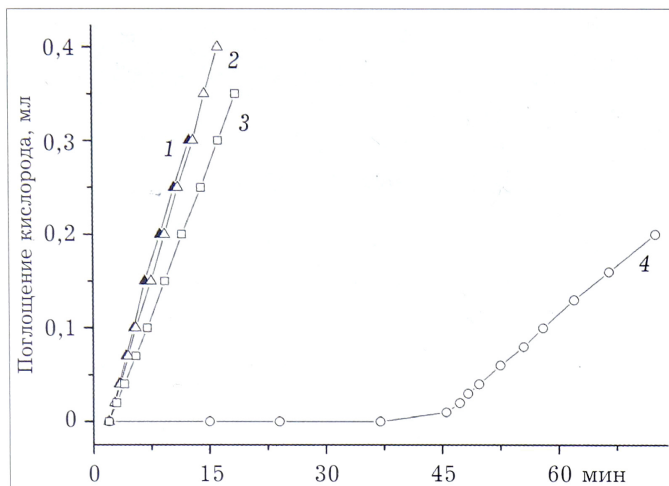


Рис. 3. Окисление кумола в присутствии частиц кобальтового сплава и сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ) и костного жира.

1 — в присутствии частиц кобальтового сплава; 2, 3 — в присутствии смеси частиц сплава и СВМПЭ в соотношении 1:50 и 1:250 (по массе) соответственно; 4 — в присутствии частиц сплава и СВМПЭ (1:250 по массе) при внесении костного жира.

тицы износа предварительно суспензировали в 0,1 мл костного жира, содержание антиоксидантов в котором было равным 0,78 мМ, а затем вносили частицы в культуру клеток. Конечная концентрация антиоксидантов в суспензии клеток составляла 0,01 мМ.

Существенное снижение отрицательного влияния на культуру клеток металлических частиц, предварительно суспензированных в костном жире, выражалось в увеличении на 5-й день культивирования числа пролиферирующих клеток в культуре с частицами, обработанными указанным способом, по сравнению с культурой, содержащей необработанные частицы (рис. 4). Фибробластоподобные клетки проявляли ориентированный для данной культуры рост, в культуре видны капельки жира с включенными в них частицами металла, клетки имели овальное ядро, прозрачную цитоплазму.

Количественная оценка влияния костного жира на пролиферацию клеток проведена путем их под-

счета на 5-й день культивирования (рис. 5). Видно, что обработка частиц сплава костным жиром значительно снижает негативное действие частиц на рост клеток. Число пролиферирующих клеток в этом случае увеличивалось в 2–3 раза во всем диапазоне изученных концентраций частиц по сравнению с опытами без использования костного жира.

ОБСУЖДЕНИЕ

Повреждающее действие свободнорадикальных реакций при эндопротезировании суставов в настоящее время недооценивается, несмотря на то что известно несколько механизмов их возникновения. Так, наложение в ходе операции эндопротезирования турникета и его последующее освобождение приводит к образованию радикалов в реперфузионном периоде [5, 6]. Само хирургическое вмешательство, выраженная кровопотеря и ее восполнение донорской кровью при эндопротезировании суставов также обуславливают образование радикалов и снижение антирадикальной активности тканей пациента [4, 11]. Наиболее неблагоприятная ситуация в плане генерирования свободных радикалов возникает с началом функционирования имплантата и образования частиц износа. Их появление влечет за собой воспалительную реакцию клеток с выделением свободных радикалов и интенсивное непрерывное генерирование радикалов в ходе трибохимических реакций, что требует применения эффективных антиоксидантов.

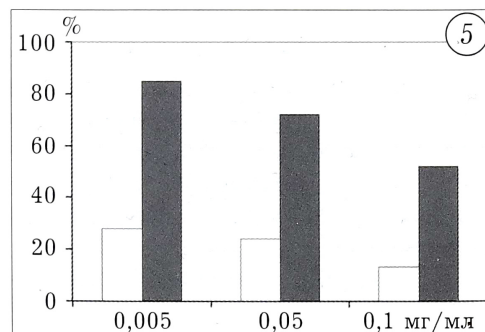
В ряде экспериментальных работ показано защитное действие антиоксидантов. Так, установлено, что данные препараты подавляют выделение иммунными клетками воспалительных медиаторов, в том числе провоспалительных цитокинов, в ответ на частицы износа [13, 14]. Результаты наших исследований с использованием хорошо известных антиоксидантов подтверждают перспективность применения антиоксидантсодержащих препаратов и композиций для ингибирования свободнорадикальных реакций окисления, возникающих при имплантации искусственных суставов. В частно-



Рис. 4. Культура остеогенных клеток-предшественников с частицами износа кобальтового сплава не обработанных (а) и обработанных (б) костным жиром. Ув. 100.

Рис. 5. Влияние различных концентраций частиц кобальтового сплава в отсутствии (□) и в комбинации (■) с костным жиром на пролиферацию остеогенных клеток человека.

По оси абсцисс — концентрация частиц, ординат — число клеток в % от контроля.



сти, имеется возможность эффективного подавления этих нежелательных реакций с помощью костного жира пациента, содержащего природные антиоксиданты. В литературе имеются указания на проявление костным жиром в подобных условиях защитного действия. Например, показано, что введение частиц износа в губчатую кость не вызывает воспалительной реакции и остеолита [8, 9], что можно объяснить антиоксидантным и противовоспалительным действием костного жира, содержащегося в губчатой костной ткани.

При окислении полиэтилена существенно ухудшаются его механические свойства и износостойкость и, таким образом, ускоряется износ полиэтиленовых вкладышей имплантатов [7]. Окисленные частички полиэтилена способны усиливать воспалительную реакцию, стимулировать выделение провоспалительных и вызывающих резорбцию кости цитокинов моноцитами/макрофагами человека [10]. Нами установлено, что внесение костного жира в смесь частиц кобальтового сплава и полиэтилена ингибирует цепную реакцию окисления. Предпринимаются попытки улучшить прочностные характеристики ортопедического полиэтилена путем включения в его состав витамина Е [17]. Ожидается, что это будет повышать также устойчивость полимера к воздействию свободных радикалов, образующихся в ходе трибохимических реакций.

Обнаруженное благоприятное влияние костного жира на пролиферативную способность культуры остеогенных клеток свидетельствует о том, что повреждающий эффект частиц износа вызван радикальными интермедиатами. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы относительно использования антиоксидантов. Так, в работе на культуре фибробластов в условиях гипероксии установлено, что природный антиоксидант α -токоферол, наряду с его прямой антиоксидантной активностью, существенно усиливает защитное действие добавленных к культуре клеток антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Наиболее выраженный эффект наблюдался при комбинации антиоксиданта и глутатионпероксидазы [12]. Учитывая обнаруженное снижение активности антиоксидантных ферментов в окружающих имплантаты тканях [15], этот потенцирующий эффект витамина Е на активность антиоксидантных ферментов может быть весьма важен. В пользу применения костного жира свидетельствует и большая эффективность природных антиоксидантсодержащих композиций по сравнению с каждым антиоксидантом в отдельности вследствие проявления композициями синергического эффекта [16].

Из изложенного ясно, что назначению антиоксидантов, как необходимому компоненту ведения пациентов при эндопротезировании суставов, до настоящего времени не уделяется должного внимания. Однако в связи с увеличивающейся частотой

применения в клинической практике эндопротезов суставов, узел трения которых изготовлен из металлических компонентов, и установленным токсичным действием ионов и частиц металлов на организм пациентов [18] становится очевидной целесообразность применения антиоксидантов и антиоксидантсодержащих композиций (костного жира) при таких операциях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Булгаков В.Г., Гаврюшенко Н.С., Шальнев А.Н., Цепалов В.Ф. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов. Часть 1. Определение радикалообразующей способности частиц износа различных ортопедических материалов // Вестн. травматол. ортопед. — 2010. — N 1. — С. 44–48.
2. Булгаков В.Г., Ильина В.К., Гаврюшенко Н.С. и др. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов. Часть 2. Проокислительный и антипролиферативный эффект частиц износа ортопедических материалов // Вестн. травматол. ортопед. — 2010. — N 3. — С. 29–33.
3. Гаврюшенко Н.С., Булгаков В.Г. Выявление и оценка роли артродулярной связи в функционировании суставов человека (экспериментальное исследование) // Вестн. травматол. ортопед. — 2001. — N 2. — С. 72–75.
4. Лазарев С.М., Кораблева Н.П. Состояние свободнорадикальных процессов, метаболизм оксида азота, железа и уровень кортизола при аутогемотрансфузии и переливании донорской крови // Вестн. хир. — 2006. — Т. 165, N 5. — С. 72–75.
5. Aldemir O., Celebi H., Cevik C., Duzgun E. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty // Acta Anaesthesiol Scand. — 2001. — Vol. 45, N 10. — P. 1221–1225.
6. Cheng Y.J., Chien C.T., Chen C.F. Oxidative stress in bilateral total knee replacement, under ischaemic tourniquet // J. Bone Jt. Surg. (Br.). — 2003. — Vol. 85, N 5. — P. 679–682.
7. Costa L., Jacobson K., Bracco P., Brach del Prever E.M. Oxidation of orthopaedic UHMWPE // Biomaterials. — 2002. — Vol. 23, N 7. — P. 1613–1624.
8. Goodman S.B., Davidson J.A., Fornasier V.L. Histological reaction to titanium alloy and hydroxyapatite particles in the rabbit tibia // Biomaterials. — 1993. — Vol. 10. — P. 723–728.
9. Goodman S.B., Davidson J.A., Song Y. et al. Histomorphological reaction of bone to different concentration of phagocytosable particles of high-density polyethylene and Ti-6Al-4V alloy in vivo // Biomaterials. — 1996. — Vol. 17, N 20. — P. 1943–1947.
10. Kamikawa K., Harada Y., Nagata K., Moriya H. Differential effects of oxidized and non-oxidized polyethylene particles on human monocyte/macrophages in vitro // J. Bone Jt. Surg. (Br.). — 2001. — Vol. 83, N 4. — P. 593–597.
11. Kubin A., Kaudela K., Jindra R. et al. Dehydroascorbic acid in urine as a possible indicator of surgical stress // Ann. Nutr. Metab. — 2003. — Vol. 47, N 1. — P. 1–5.
12. Michiels C., Raes M., Houbion A., Remacle J. Association of antioxidant systems in the protection of human fibroblasts against oxygen derived free radicals // Free Radic. Res. Commun. — 1991. — Vol. 14, N (5–6). — P. 323–334.
13. Mulhall K.J., Curtin W.A., Given H.F. Comparison of different anti-inflammatory agents in suppressing the

- monocyte response to orthopedic particles // Orthopedics. — 2003. — Vol. 26, N 12. — P. 1219–1223.
14. Mulhall K.J., Curtin W.A., Given H.F. Inhibition of polymethylmethacrylate particle-induced monocyte activation and IL-1beta and TNF-alpha expression by the antioxidant agent N-acetylcysteine // Acta Orthop. Scand. — 2002. — Vol. 73, N 2. — P. 206–212.
15. Ozmen I., Naziroglu M., Okutan R. Comparative study of antioxidant enzymes in tissues surrounding implant in rabbits // Cell Biochem. Funct. — 2006. — Vol. 24, N 3. — P. 275–281.
16. Soelaiman I.N., Ahmad N.S., Khalid B.A. Palm oil tocotrienol mixture is better than alpha-tocopherol acetate in protecting bones against free-radical induced elevation of bone-resorbing cytokines // Asia Pac. J. Clin. Nutr. — 2004. — Vol. 13 (Suppl). — S111.
17. Tomita N., Kitakura T., Onmori N. et al. Prevention of fatigue cracks in ultrahigh molecular weight polyethylene joint components by the addition of vitamin E // J. Biomed. Mater. Res. — 1999. — Vol. 48. — P. 474–478.
18. Udipi K., Ornberg R.L., Thurmond K.B. 2nd et al. Modification of inflammatory response to implanted biomedical materials in vivo by surface bound superoxide dismutase mimics // J. Biomed. Mater. Res. — 2000. — Vol. 51, N 4. — P. 549–560.

Сведения об авторах: Булгаков В.Г. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. отдела экспериментальной травматологии и ортопедии ЦИТО; Ильина В.К. — канд. мед. наук, ведущий науч. сотр. лаборатории соединительной ткани с группой клинической генетики ЦИТО; Гаврюшенко Н.С. — профессор, доктор техн. наук, руководитель испытательной лаборатории ЦИТО; Шальнев А.Н. — доктор мед. наук, руководитель отдела экспериментальной травматологии и ортопедии ЦИТО; Омеляненко Н.П. — профессор, доктор мед. наук, руководитель лаборатории соединительной ткани с группой клинической генетики ЦИТО; Цепалов В.Ф. — профессор, доктор хим. наук, консультант Института биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН.

Для контактов: Булгаков Валерий Георгиевич. 127299, Москва, ул. Приорова, дом 10. Тел.: 450-09-38. E-mail: bulgakov_cito@mtu-net.ru



ИНФОРМАЦИЯ

Научная конференция с международным участием,
посвященная 40-летию создания Института
проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ
Харьков, Украина, 18–19 октября 2012 г.

Организаторы: Национальная академия наук Украины
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
Харьковский национальный медицинский университет
Национальная комиссия Украины по делам ЮНЕСКО

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАБОТЫ КОНФЕРЕНЦИИ:

- Фундаментальные и прикладные аспекты низкотемпературного консервирования биологических объектов (клеток, тканей, органов животных или растений).
- Использование низких температур в медицине.
- Современные проблемы клеточной и тканевой терапии.
- Криобанки пуповинной крови, перспективы использования препаратов пуповинной крови в медицине.
- Разработка криобиологического и криомедицинского оборудования; организация и работа низкотемпературных банков.
- Фундаментальные и прикладные проблемы влияния холода на организм человека и животных; реакция биологических объектов на низкие температуры; холодовая адаптация животных и растений.

В рамках конференции планируется провести презентацию фирм-производителей специализированного оборудования для научных исследований, лекарственных средств, химреактивов и т.д., выставку-семинар криобиологических и криомедицинских приборов, а также обсудить вопросы биоэтики при проведении экспериментов в области криобиологии и криомедицины.

Секретариат: Тел.: (057)373-41-43, 373-38-07
e-mail: cryo@online.kharkov.ua
website: www.cryo.org.ua/conference