

СНИЖЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛМЕТАКРИЛАТА НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ В ПРИСУТСТВИИ ГИПОХЛОРИТА НАТРИЯ

Е.М.Еропкина¹, Е.Г. Мамаева¹, М.Ю. Еропкин², В.М. Машков¹

¹Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена,

²Институт гриппа РАМН, Санкт-Петербург

Проведено исследование влияния раствора гипохлорита натрия (ГХ) на токсический ответ фибробластов человека в культуре под действием метилметакрилата (ММА), входящего в состав костного цемента «Полакрис». Токсическое действие ММА в клинически адекватных концентрациях проявлялось в дозозависимом подавлении суммарной активности митохондриальных ферментов, что является одним из показателей стресса на клеточном уровне. Смесь ММА:ГХ в объемном соотношении 1:1 и 10:1 вызвала достоверное снижение токсичности в отношении клеток в культуре по сравнению с влиянием чистого ММА соответствующей концентрации. Смесь ММА:ГХ в объемном соотношении 1:10, напротив, достоверно ухудшала жизнеспособность фибробластов по сравнению с состоянием клеток в присутствии одного ММА. Таким образом, показано, что в экспериментальной модели in vitro химическая инактивация ММА, приводившая к уменьшению метаболических нарушений в клетках, достигалась только при условии смещения объемного соотношения в сторону ММА.

The effect of sodium hypochlorite (SH) upon toxic response of cultured human fibroblasts to methyl methacrylate (MMA) which is a part of bone cement «Polacris» has been studied. Toxic effect of MMA in clinically adequate concentrations demonstrated dose-dependant suppression of total activity of mitochondrial enzymes and that was one of the showings of stress at the cellular level. MMA:SH mixture in volume ratio 1:1 and 10:1 caused reliable reduction of toxic effect on cultured cells as compared with pure MMA of the similar concentration. On the contrary, MMA:SH mixture in volume ratio 1:10 resulted in true decrease of fibroblasts viability as compared with the state of cells in presence of pure MMA. Thus it was shown that chemical experimental in vitro inactivation of MMA could be achieved only when MMA concentration was either higher or equal to SA concentration. That provided the reduction of metabolic disturbances in cells.

Применение костного цемента на основе метилметакрилата при эндопротезировании крупных суставов сопряжено с дополнительным риском возникновения различных осложнений, комплекс которых называется имплантационным синдромом [6]. Одним из ведущих факторов, способствующих развитию осложнений, является токсическое действие остаточного мономера метилметакрилата (ММА), который в количестве 3–5% от использованной при операции дозы костного цемента может поступать в общий кровоток и вызывать острую дыхательную недостаточность, выраженную гипотонию, изменения сердечного ритма вплоть до остановки кровообращения, инфаркт миокарда [2]. При этом летальность в ходе операций цементного эндопротезирования составляет 0,02–0,6% [8]. Проводимая медикаментозная профилактика и методы лечения имплантационного синдрома носят в значительной мере симптоматический характер.

Ранее нами на экспериментальной модели in vitro было показано, что дозозависимое цитотоксическое действие костного цемента в отношении фибробластов человека в культуре сопровож-

дается окислительным стрессом, возникающим в результате снижения активности внутриклеточной антиоксидантной системы и усиления процессов перекисного окисления липидов, гипоксией, вызванной подавлением суммарной активности дыхательных митохондриальных ферментов, уменьшением митотического потенциала клеток вплоть до гибели всего монослоя [3].

В качестве рабочей гипотезы нами было выдвинуто предположение, что раствор гипохлорита натрия (ГХ), применяемый для детоксикации в лечении эндо- и экзотоксикозов различного генеза [4], способен также вызывать окислительную дегградацию остаточного ММА и тем самым способствовать снижению цитотоксичности мономера в отношении фибробластов. В задачи настоящего исследования входило изучение влияния ГХ в различных концентрациях на вызванный ММА токсический ответ клеток человека в культуре.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Работа выполнена на диплоидных фибробластах легкого эмбриона человека (НИИ гриппа РАМН). Клетки выращивали в

24-лучочных планшетах до получения конфлуэнтного монослоя по ранее описанной нами методике [3]. Перед всеми процедурами токсикологического анализа ростовую питательную среду заменяли бессывороточной поддерживающей средой, в которую добавляли 10% сыворотку крови человека, полученную от здоровых доноров.

Исследованные препараты. В работе использовали костный цемент «Полакрис» (НПО «Феникс», Россия). Дозозависимое действие жидкого компонента для приготовления цемента — ММА на метаболизм фибробластов в культуре исследовали в разведениях, сопоставимых с концентрацией остаточного мономера, попадающего в кровоток при использовании от одной до трех порций костного цемента. Раствор ММА для экспериментов готовили следующим образом: исходный жидкий компонент разводили поддерживающей средой Игла в 100 раз и добавляли по 10, 20 или 40 мкл в лунки объемом 1,5 мл. При этом конечная концентрация ММА составляла 0,07–0,27 мкл/мл.

Раствор ГХ в концентрации 0,06% получали методом электролиза изотонического раствора натрия хлорида на аппарате ЭДО-4. Для получения объемных соотношений ММА:ГХ 1:10, 1:1 и 10:1 исходный раствор ГХ разбавляли в 10, 100 или 1000 раз соответственно поддерживающей средой Игла и вносили по 10, 20 или 40 мкл в лунки объемом 1,5 мл. При этом конечные концентрации ГХ составляли от 0,004 до 0,16 мкг/мл.

Для приготовления растворов, содержащих смесь тестируемых соединений в указанных выше объемных соотношениях, компоненты предварительно смешивали и при периодическом интенсивном встряхивании оставляли при комнатной температуре на 15–20 мин. Далее каждый образец доводили средой Игла до объема, при котором конечные концентрации препаратов соответствовали таковым в разведениях отдельных соединений, и добавляли в лунки в объеме 10, 20 и 40 мкл.

Контролем служили фибробласты, инкубированные в среде без каких-либо добавок. Время воздействия на клетки указанных соединений составляло 24 ч.

Токсикологический анализ. В качестве показателя метаболических отклонений в клетках под действием ММА, ГХ и их смесей использовали суммарную активность дыхательных дегидрогеназ, которую оценивали по способности клеточного монослоя восстанавливать нитросиний тетразолий до фиолетового формазана по методу Mosmann [9]. Результаты тестирования опытных образцов представлены как процент оптической плотности от таковой в контрольных пробах. Все данные являются средними значениями с учетом ошибки среднего по результатам трех независимых экспериментов. Достоверность отличий оценивали с помощью пакета прикладных программ Statistica (Statsoft Inc. USA, 1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1. приведены сравнительные данные о влиянии ММА в концентрациях 0,07–0,27 мкл/мл и ГХ в концентрациях 0,04–0,16 мкг/мл, а также их смесей в объемном соотношении ММА:ГХ 1:1 на суммарную активность дыхательных ферментов фибробластов человека в культуре. Как видно из этого рисунка, ММА в исследованных концентрациях вызывал дозозависимое подавление активности митохондриальных дегидрогеназ. Если в присутствии ММА в дозе 0,07 мкл/мл отмечалось недостоверное снижение способности клеток восстанавливать нитросиний тетразолий (92,9±6,53%), то увеличение дозы до 0,13 мкл/мл приводило к подавлению активности ферментов вдвое (49,7±5,33%). ММА в концентрации 0,27 мкл/мл вызывал практически полное подавление жизнеспособности клеточного монослоя (11,7±1,05%). Добавление в среду инкубации чистого ГХ не влияло на интенсивность дыхания клеток, и метаболический показатель не отличался от контрольных значений. При инкубировании фибробластов в присутствии предварительно смешанных в равных объемах препаратов цитотоксическое действие смеси оказывалось менее выраженным, что отчетливо видно при сравнении с влиянием ММА в дозе 0,13 мкл/мл: активность митохондриальных ферментов составляла 69,7±5,81% и статистически достоверно отличалась от таковой при действии чистого ММА.

В ходе второй серии экспериментов определяли, какие объемные соотношения ММА и ГХ способны обеспечить наиболее выраженное снижение цитотоксического действия мономера в дозе

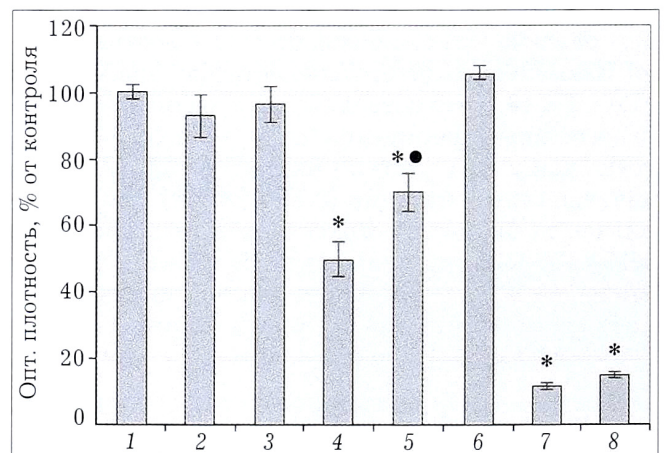


Рис. 1. Влияние гипохлорита натрия (ГХ) на вызванный мономером метилметакрилата (ММА) токсический ответ фибробластов человека в культуре при объемном соотношении ММА:ГХ 1:1.

1 — контроль (ростовая среда); 2 — ММА 0,07 мкл/мл; 3 — ММА 0,07 мкл/мл + ГХ 0,04 мкг/мл; 4 — ММА 0,13 мкл/мл; 5 — ММА 0,13 мкл/мл + ГХ 0,08 мкг/мл; 6 — ГХ 0,08 мкг/мл; 7 — ММА 0,27 мкл/мл; 8 — ММА 0,27 мкл/мл + ГХ 0,16 мкг/мл.

*Достоверное отличие от контроля ($p < 0,001$); • достоверное отличие от 4 ($p < 0,05$); $n = 16$.

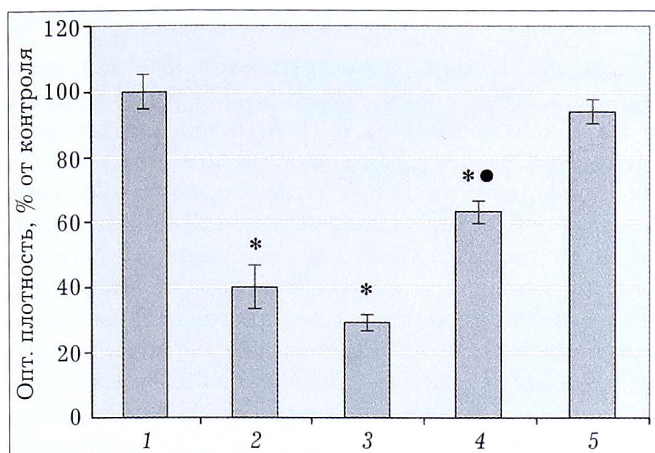


Рис. 2. Влияние гипохлорита натрия (ГХ) в разной концентрации на токсический ответ фибробластов человека в культуре, вызванный мономером метилметакрилата (ММА) в конечной концентрации 0,13 мкл/мл.

1 — контроль (ростовая среда); 2 — ММА; 3 — ММА + ГХ 0,8 мкг/мл (объемное соотношение ММА:ГХ 1:10); 4 — ММА + ГХ 8×10^{-3} мкг/мл (объемное соотношение ММА:ГХ 10:1); 5 — ГХ 0,8 мкг/мл.

* Достоверное отличие от контроля ($p < 0,02$); ● достоверное отличие от 2 и 3 ($p < 0,01$); $n = 14$.

0,13 мкг/мл. На рис. 2 представлены результаты сравнительного исследования влияния смесей препаратов в объемных соотношениях 1:10 и 10:1. Для сравнения приведены также данные о влиянии чистого ГХ в дозе 0,16 мкл/мл, соответствующей его содержанию в смеси 1:10, что составляло высшую концентрацию ГХ в наших экспериментах. Как видно из рис. 2, чистый ГХ и в этом случае не вызывал изменений дыхательного метаболизма фибробластов человека в культуре ($93,5 \pm 3,58\%$). Влияние смесей препаратов 1:10 и 10:1 различалось с высокой степенью достоверности. Наименьшую цитотоксичность проявляла смесь ММА:ГХ 10:1, что позволяло сохранить активность дыхательных ферментов на уровне $62,9 \pm 3,31\%$, тогда как в присутствии чистого ММА в той же конечной концентрации (0,13 мкл/мл) она подавлялась до $40,0 \pm 6,92\%$. Токсическое действие смеси ММА:ГХ 1:10 оказалось даже большим, чем действие ММА, — способность клеток восстанавливать нитросиний тетразолий снижалась до $29,1 \pm 2,34\%$ от контрольных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованиях, проведенных нами ранее [3], были изучены некоторые детали дозозависимого токсического ответа клеток человека *in vitro*, вызванного мономером ММА — жидким компонентом костного цемента. Используемые нами показатели метаболических нарушений на клеточном уровне в присутствии токсичных ксенобиотиков характеризуют комплекс реакций, лежащих в основе проявлений так называемой базовой токсичности [5, 7]. Клинически адекватные дозы ММА вызывали повреждение целостности клеточных мембран, усиление

перекисного окисления липидов, снижение антиоксидантного статуса клеток и торможение их размножения, подавление суммарной активности дыхательных ферментов. Известно, что отмеченные нарушения, как правило, взаимосвязаны и являются пусковыми моментами окислительного стресса и гипоксии на клеточном уровне [1, 3].

В представленной работе получены результаты, также подтверждающие дозозависимое цитотоксическое действие ММА, показателем которого служило ингибирование суммарной активности митохондриальных дегидрогеназ в микротетразолиевом тесте. В настоящее время считается доказанным, что жизнеспособность клеточного монослоя в целом коррелирует с уровнем активности дыхательных ферментов, и данный тест может быть использован в токсикологическом анализе *in vitro* как один из наиболее чувствительных методов [9].

Выдвинутое нами предположение о возможности химической инактивации токсичного мономера в присутствии ГХ в определенном объемном соотношении с ММА нашло подтверждение в проведенных опытах: ГХ предотвращал подавление активности дыхательных ферментов и, как следствие, развитие гипоксии на клеточном уровне. Следует, однако, подчеркнуть, что защитным эффектом, достоверно снижающим цитотоксичность ММА, обладали смеси с объемным соотношением ММА:ГХ 1:1 и 10:1. При смешивании соединений в обеих пропорциях результат оказался приблизительно одинаковым. Вероятно, это связано с тем, что даже низшей концентрации ГХ достаточно для окислительного разрушения ММА, протекающего с образованием нетоксичных органических кислот. Иной результат получен нами в случае использования объемного соотношения ММА:ГХ 1:10. Смесь не только не снижала — по сравнению с действием чистого ММА — подавления активности ферментов, но и вызывала достоверное усиление повреждающего эффекта в отношении клеток в культуре. При этом, как выявлено в наших экспериментах, ГХ ни в одной из тестируемых концентраций, включая четырехкратно превышающие указанные в данной работе, не обладал собственной цитотоксичностью и не вызывал нарушений метаболизма фибробластов. Причина усиления повреждающего действия смеси, в которой объемное соотношение сдвинуто в сторону ГХ, остается пока неясной, и можно только предположить, что в присутствии высоких концентраций ГХ в ходе окислительной модификации мономера появляются метаболиты с выраженными токсическими свойствами. Приходится также признать, что полученные *in vitro* данные достаточно сложно однозначно экстраполировать на *in vivo* ввиду высокой реактивности гипохлорит-аниона и, следовательно, быстрой инактивации препарата в кровеносном русле при капельной инфузии. Результаты настоящей экспериментальной работы показали принципиальную возможность окислительной инактивации остаточного мо-

номера в присутствии ГХ, находящегося в объемном соотношении ММА:ГХ 1:10 и 10:1. Иными словами, для снижения цитотоксического действия ММА его объемное соотношение с ГХ должно быть равным или сдвинутым в сторону ММА, так как в противном случае подавление активности митохондриальных ферментов оказывалось достоверно более выраженным, чем под влиянием чистого ММА соответствующей концентрации.

Полученные *in vitro* данные о возможном снижении токсического эффекта костного цемента под действием ГХ были затем подтверждены на модели с использованием экспериментальных животных. Результаты экспериментальных и клинических исследований легли в основу «Способа профилактики имплантационного синдрома при цементном эндопротезировании суставов» (пат. 2153879 РФ от 10.08.00).

ВЫВОДЫ

1. На экспериментальной модели *in vitro* с использованием клеток человека в культуре показано дозозависимое цитотоксическое действие мономера метилметакрилата в дозах, соизмеримых с концентрациями препарата, попадающими в кровоток в ходе операций эндопротезирования.

2. Продемонстрирована возможность окислительной инактивации метилметакрилата в присутствии гипохлорита натрия, регистрируемой по достоверному снижению подавления суммарной активности дыхательных ферментов фибробластов.

3. Для снижения цитотоксичности метилметакрилата объемное соотношение препаратов в смеси должно быть равным или сдвинутым в сторону метилметакрилата, поскольку показано, что смесь ММА:ГХ 1:10 достоверно усиливала метаболические нарушения в клетках в сравнении с действием чистого метилметакрилата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Еропкин М.Ю. //Токсикол. вестн. — 1999. — N 5. — С. 7–13.
2. Корнилов Н.В., Войтович А.В., Машков В.М., Эпштейн Г.Г. Хирургическое лечение дегенеративно-дистрофических поражений тазобедренного сустава. — СПб, 1997.
3. Корнилов Н.В., Еропкина Е.М., Еропкин М.Ю. и др. //Травматол. ортопед. России. — 2000. — N 2–3. — С. 25–29.
4. Ребров А.П., Пономарева Е.Ю., Головачева Л.Ю. Применение раствора гипохлорита натрия при лечении больных пневмонией и хроническими неспецифическими заболеваниями легких: Метод. рекомендации. — Саратов, 1995.
5. Balls M., Fentem J.H. //ATLA. — 1992. — Vol. 20. — P. 368–389.
6. Byrick R.J. //Can. J. Anaesth. — 1997. — Vol. 44, N 2. — P. 107–111.
7. Clemedson C., Barile F.A., Ekwall B. et al. //ATLA. — 1998. — Vol. 26, Suppl. 1. — P. 93–129.
8. Dahl O.E. //Acta Orthoped. Scand. — 1997. — Vol. 68, N 6. — P. 607–614.
9. Mosmann T. //J. Immunol. Meth. — 1983. — Vol. 65. — P. 55–63.

Нашего полку прибыло !

Редакционная коллегия
«Вестника травматологии и ортопедии
им. Н.Н. Приорова» приветствует рождение нового
журнала «Хирургия позвоночника»
и желает ему долго и успешно
"сеять разумное, доброе, вечное".

Хирургия позвоночника

1/2004

