

Том 79, Номер 2

ISSN 0367-6765

Февраль 2015



ИЗВЕСТИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

СЕРИЯ ФИЗИЧЕСКАЯ



<http://www.naukaran.ru>
<http://www.maik.ru>

В журнале "Известия Российской академии наук. Серия физическая" печатаются научные материалы, доложенные на сессиях и совещаниях, созываемых Российской академией наук.



"НАУКА"

УДК 615.076:616-073.582

КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ В ИЗУЧЕНИИ ВЛИЯНИЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ ПРО-ФЕРМЕНТНЫХ НАНОГЛИКОКОНЪЮГАТОВ ЭЛЕМЕНТНОГО СЕЛЕНА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ОПОРНЫХ ТКАНЕЙ

© 2015 г. И. А. Шурыгина^{1,2}, Л. В. Родионова¹, М. Г. Шурыгин^{1,2}, Б. Г. Сухов³,
С. В. Кузнецов³, Л. Г. Попова¹, Н. Н. Дремина¹

E-mail: irinashurygina@gmail.com

Методами конфокальной и флуоресцентной микроскопии изучено воздействие оригинального нанокompозита элементного селена и гетерополисахарида арабиногалактана на скорость кальцификации костной мозоли при травматическом повреждении в эксперименте. Установлено, что при локальном повышении концентрации селена в зоне травматического повреждения наблюдается низкая интенсивность минерализации формирующейся костной мозоли, замедление формирования костного регенерата. Обсуждены вопросы сложности визуализации одновременно внесенных флуоресцентных меток.

DOI: 10.7868/S0367676515020271

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы нарушения минерализации костной ткани в последние десятилетия приобрели чрезвычайную актуальность в связи с широким распространением остеопороза. При этом остеопороз называют “тихой эпидемией” в связи с длительным латентным течением и проявлением только в виде осложнений. Известно, что минерализация костной ткани во многом определяет ее прочностные свойства.

В настоящее время для оценки скорости минерализации костной ткани применяют различные методы: анализ поперечных срезов методом анализа обратного рассеяния электронов, анализ рамановской спектроскопии и фурье-преобразований ИК-микроскопии с использованием прижизненно внесенной тетрациклиновой метки [1], ¹⁸F-фторидов в позитронной эмиссионной томографии [2], флуоресцентную микроскопию костной ткани с прижизненным внесением флуоресцентных меток. В качестве прижизненно внесенных меток, отражающих процесс оссификации, наиболее часто применяется тетрациклин. При этом для оценки динамики процесса, когда необходимо оценить временные сроки отложения солей кальция в костной ткани, однократного вне-

сения метки недостаточно, и с определенными перерывами либо применяют неоднократно введение тетрациклина, либо чередуют его с другими образующими нерастворимые соединения с ионами кальция веществами. В настоящем исследовании нами изучена возможность одновременного применения двух различных прижизненно вводимых меток для оценки скорости оссификации в зоне перелома. Кроме того, нами изучены возможность визуализации оригинального препарата селена в виде наночастиц в полисахариде арабиногалактане при местном применении и его влияние на оссификацию зоны перелома при травме костной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез и характеристика нанокompозита селен(0)-арабиногалактан

В работе использовали специально синтезированный оригинальный нанокompозит элементного селена и гетерополисахарида арабиногалактана. Синтез композита осуществляли окислением в водном растворе бис(2-фенилэтил)диселенофосфината натрия перекисью водорода в присутствии арабиногалактана в качестве стабилизирующей матрицы образующихся наночастиц элементного селена(0). Содержание селена в образце нанокompозита, определенное титриметрическим методом, составило 0.54%. Характеризацию композита проводили методами трансмиссионной электронной микроскопии (исследование проведено с помощью микроскопа TEM-410) и УФ-спектроскопии (Shimadzu UV-1800). Методом оптической

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии” Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Иркутск.

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск.

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Иркутский Институт химии имени А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск.

спектроскопии изучена также матрица нанокompозита — арабиногалактан.

Моделирование травматического повреждения

Экспериментальные исследования проведены на двух моделях повреждения костной ткани: модель полного поперечного перелома в верхней трети диафиза бедренной кости с открытым погруженным ретроградным интрамедуллярным остеосинтезом стальным штифтом [3] (крысы самцы линии Wistar, $N = 30$) и дырчатого перелома большеберцовой кости (кролики породы Шиншилла, самцы, $N = 8$, в том числе 5 — с естественным течением репаративного процесса (контрольная группа) и 3 — локальное интраоперационное введение в зону перелома препарата наноселена в пересчете на селен — 50.33 мкг/кг (группа “наноселен”)).

Эксперимент выполняли в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, которые регламентированы “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) согласно протоколу, одобренному Комитетом по биомедицинской этике НЦРВХ СО РАМН.

В качестве маркеров скорости регенерации костной ткани животным всех групп на 7-е и 21-е сутки внутримышечно вводили раствор окситетрациклина гидрохлорида (ООО “Биохимфарм”, ТУ 9344-080-70972578-06) в дозе 250 мг/кг веса тела, а на 14-е и 28-е сутки — раствор ализаринового красного S внутрибрюшинно 100 мг/кг веса тела.

Выведение крыс из эксперимента осуществляли на 3, 5, 9, 14, 21 и 35-е сутки, кроликов — на 35-е сутки внутриплевральным введением раствора тиопентала натрия в дозе 167 мг/кг.

Фиксацию материала проводили в растворе FineFix (Milestone, Италия).

Декальцинацию и последующую подготовку препаратов костной ткани для гистологического исследования проводили разработанным нами способом [4]. Осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 7 мкм, депарафинировали срезы и заключали в Fluoromount (Diagnostic Biosystems, REF K024, Lot P 939-B). Визуализацию специфического свечения флуорохромных меток проводили на лазерном конфокальном микроскопе Zeiss LSM-710 и на исследовательском микроскопе Nikon Eclipse 80i с приставкой для эпифлуоресценции DИH-M. В качестве фильтров для выделения требуемых диапазонов флуоресценции использовались Nikon B-2A (возбуждение 450–490 нм, дихроичное зеркало 505 LP, эмиссия ≥ 515 нм), Nikon TRITC (возбуждение 528–553 нм, дихроичное зеркало 565 LP, эмиссия 590–650 нм). В качестве регистратора использовали камеру Nikon DS-Fi1c, подключенную к

контроллеру Nikon DS-U2, с использованием программного обеспечения Nikon Elements.

Также осуществляли визуализацию препаратов окситетрациклина гидрохлорида, ализаринового красного S и нанокompозита элементного селена на арабиногалактане.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор арабиногалактана для синтеза селенового нанокompозита обусловлен тем, что этот водорастворимый гетерополисахарид уже хорошо рекомендовал себя как базовый биосовместимый полимер для получения различных нанокompозитных систем биомедицинского назначения [5, 6].

Установлено, что синтезированный нанокompозит элементарного селена и арабиногалактана — это порошок красно-оранжевого цвета, хорошо растворимый в воде. Спектр оптического поглощения арабиногалактана, использованного в качестве матрицы при синтезе нанокompозита, имеет четко выраженные пики в области 199 и 287 нм, которые можно отнести к остаточным конечным альдегидным группам углеводных звеньев полисахарида. При исследовании спектра оптического поглощения нанокompозита Se-AG в диапазоне 190–1000 нм регистрировался минимальный подъем (0.005 abs.) в области 926 нм, а также постепенный рост в диапазоне 600–190 нм до 0.772 abs. с небольшими плато в районе 230–221 нм и 204–197 нм, что характерно для наноселена(0) [7].

При электронно-микроскопическом исследовании установлено, что композит представлен глобулами арабиногалактана, покрытыми частицами селена, при этом размер отдельных частиц селена составляет всего 2–3 нм.

Установлено, что при исследовании изолированного препарата окситетрациклина гидрохлорида он представлен кристаллами игольчатой формы. При возбуждении лазером с длиной волны 405 нм наблюдается эмиссия в области спектра от 490 до 565, пик приходится на 553 нм.

Раствор ализаринового красного при возбуждении лазером с длиной волны 561 нм имеет эмиссию в диапазоне 570–675 с максимумом 605 нм.

При оценке оссификации в образующейся кости у крыс и кроликов контрольной группы установлено, что наблюдалось интенсивное отложение солей кальция в формирующейся костной мозоли, что отражалось в виде отложения прижизненно введенного окситетрациклина и ализаринового красного. На 35-е сутки после травмы регистрировался костный регенерат, полностью заполняющий зону дефекта кости. Методом эпифлуоресценции установлено, что зоны отложения обоих маркеров совпадали, при этом применение конфокальной микроскопии на тех же образцах позволило выделить как изолированные

зоны отложения окситетрациклина или ализаринового красного (накладывающиеся друг на друга в проекции), так и зоны, где оксификация наблюдалась в период введения как ализарина, так и окситетрациклина (симультантное отложение обоих красителей). Таким образом, метод конфокальной микроскопии позволил более четко локализовать зоны отложения окситетрациклина и ализарина.

При изучении нанокompозита элементного селена и арабиногалактана методом эпифлуоресценции установлено, что для изучаемого объекта было характерно свечение во всех изученных областях. При исследовании на конфокальном микроскопе LSM-710 (Zeiss) установлено, что препарат обладает свойствами квантовых точек. Наиболее часто встречающиеся частицы нанокompозита имели флуоресценцию в широком диапазоне спектра — при возбуждении лазером 405 нм с максимумом излучения 480 нм, 458 нм — максимумом 520 нм, 488 нм — максимумом на 538 нм, 514 нм — максимумом на 555 нм.

Более крупные частицы поглощали только коротковолновое излучение и при возбуждении лазером 405 нм демонстрировали пик эмиссии на 446 нм.

У животных, которым проводили введение нанокompозита селена на арабиногалактане, в костной ткани в зоне перелома полноценный регенерат отсутствовал. Костные балки были истончены. Методом эпифлуоресценции установлено, что наблюдалось слабо выраженное отложение окситетрациклина и ализарина в зоне перелома, причем преобладало отложение окситетрациклина. Отмечены большое количество флуоресцирующих аморфных масс вне зоны перелома, а также интенсивное свечение флуоресцентных меток в гаверсовых каналах. Учитывая эмиссию этих масс в диапазоне как 515–560 нм (включает максимум эмиссии окситетрациклина), так и 590–650 нм, захватывающем почти половину спектра излучения ализаринового красного, было сложно сделать заключение об их природе. Эти массы могли представлять собой как комплексы прижизненно внесенных окситетрациклина и ализарина с кальцием, так и отложения самого нанокompозита, *in vitro* флуоресцирующего во всем исследованном диапазоне. Таким образом, примененный метод эпифлуоресценции не позволил получить однозначных ответов на поставленные вопросы.

При изучении данных препаратов методом конфокальной микроскопии в режиме спектральной детекции удалось четко отграничить, что в регенерате флуоресцентные метки представлены практически только окситетрациклином.

Флуоресцирующие аморфные массы вне зоны перелома и в гаверсовых каналах по спектру излу-

чения были ближе к спектрам нанокompозита селена и арабиногалактана (от 430 до 630 нм с максимумом в области 490 нм).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить, что локальное применение наноселена в зоне репарации при травме костной ткани привело к значительному нарушению репаративного процесса, замедлению формирования костного регенерата, нарушению формирования формирующейся костной мозоли. В ранее проведенных исследованиях биологических эффектов матрицы — арабиногалактана при альтерации тканей не зарегистрировано подобных отклонений в естественном течении репаративного процесса, что позволяет исключить развитие наблюдаемых изменений за счет токсического воздействия вещества матрицы на клетки организма [8]. По-видимому, локальное применение в зоне травмы наночастиц селена, ассоциированных с объемными макромолекулами арабиногалактана, прежде всего приводит к значительному диффузионному затруднению эвакуации нанокompозита из этой зоны, следовательно, к выраженному пролонгированному местному воздействию наноселена на область травмы.

Результаты исследования получены с использованием материально-технической базы Байкальского аналитического центра коллективного пользования СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Misof B.M., Gamsjaeger S., Cohen A. et al. // J. Bone Miner. Res. 2012. V. 27. № 12. P. 2551–2561; doi:10.1002/jbmr.1699.
2. Frost M.L., Compston J.E., Goldsmith D. et al. // Calcif. Tissue Int. 2013. V. 93. P. 436; DOI 10.1007/s00223-013-9778-7.
3. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Родионова Л.В., Лебедев В.Ф., Дремина Н.Н. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН, 2012. Т. 5. № 2. С. 120.
4. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. // Пат. РФ 2500104; Shurygina I.A., Shurygin M.G. Pat. RU 2500104.
5. Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V. et al. // Nanomedicine. 2011. V. 7. № 6. P. 827–833; doi: 10.1016/j.nano.2011.03.003.
6. Trofimov B.A., Sukhov B.G., Aleksandrova G.P. et al. // Dokl. Akad. Nauk. 2003. V. 393. № 5. P. 634.
7. Singh S.C., Mishra S.K., Srivastava R.K., Gopal R. // J. Phys. Chem. C. 2010. V. 114. № 41. P. 17374; DOI: 10.1021/jp105037w.
8. Костыро В.В., Костыро Я.А., Лепехова С.А. и др. // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН, 2013. Т. 1. С. 106.