

Васильев Андрей Вячеславович

**ВЛИЯНИЕ ОПИоиДА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДАЛАРГИНА
НА КЛЕТОЧНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ *IN VITRO*
И РЕПАРАТИВНУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ *IN VIVO***

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук**

Москва - 2016

Работа выполнена в Федеральном агентстве научных организаций Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Медико-генетический научный центр»

Научные руководители: доктор биологических наук
Большакова Галина Борисовна

доктор биологических наук, профессор
Гольдштейн Дмитрий Вадимович

Официальные
оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Шехтер Анатолий Борисович
НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, зав. лабораторией экспериментальной морфологии

доктор медицинских наук
Буравков Сергей Валентинович
МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, в.н.с. кафедры экологической и экстремальной медицины, лаборатории анализа изображения клеточных структур

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 25 февраля 2016 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д001.004.01. Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте www.morfolhum.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2016 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Л.П. Михайлова

Актуальность темы исследования

С момента открытия индукционного пути репаративной регенерации костной ткани [Полежаев, 1977] стали активно исследовать вещества, принимающие участие в этом процессе [Bilezikian et al., 2008]. Наиболее известные и изученные из них – это семейство костных морфогенетических белков (BMP) [Burr, Allen, 2013]. В частности, BMP-2 является сильнейшим индуктором неоостеогенеза [Wikesjo et al., 2008]. Поскольку регенерация костной ткани является одной из основных проблем таких направлений практической медицины, как травматология и ортопедия, хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия, поиски новых веществ и создание препаратов, способных стимулировать образование костной ткани, не прекращаются.

После того, как была обнаружена реципрокная связь между экспрессией гена проэнкефалина (PENK) в созревающих остеобластах и их дифференцировкой, было высказано предположение о том, что опиоиды могут участвовать в регенерации костной ткани [Keshet et al., 1989; Rosen et al., 1995]. Опиоидные рецепторы обнаружены на остеобластоподобных клетках линии MG-63 [Pérez-Castrillón et al., 2000]. Установлено, что образующие кость клеточные структуры, кроме зрелых остеобластов и остеокластов, способны синтезировать опиоиды [Elhassan et al., 1998].

Наиболее перспективным для изучения является структурный аналог эндогенного лей-энкефалина – даларгин. Это первый и единственный препарат опиоидов, изначально позиционированный как средство для ускорения регенерации. Показанием к его применению является язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки. Доказана его способность ускорять регенерацию слизистой желудочно-кишечного тракта и других эпителиальных тканей в 1,5 - 2 раза [Виноградов, Полонский, 1986; Григоренко, 1990; Панькова, 1992]. Как опиоидный пептид периферического действия, даларгин не проникает через гематоэнцефалический барьер, то есть не является наркотическим средством [Виноградов, Полонский, 1986; Судаков, Судаков, 2003]. Влияние даларгина на регенерацию костной ткани практически не изучено.

Для оценки роли опиоидов в репаративной регенерации костной ткани и отсутствия туморогенной активности необходимы как исследования на клеточных культурах *in vitro*, так и эксперимент на животных *in vivo*, что позволит выявить непосредственное воздействие даларгина на рецепторы клеток, исключая влияние интегративных систем, а также позволит оценить его влияние в условиях целого организма.

Степень разработанности темы исследования

Существуют единичные работы о влиянии как самого даларгина [Тургунов, Лаврищева, 1989], так и других опиоидов на процессы репаративной регенерации костной ткани [Ляшев, 2002]. Работа Н. Т. Тургунова и Г. И. Лаврищевой не содержала достоверных результатов, поскольку была пилотной и не была подкреплена статистической обработкой данных. Тем не менее в ней были выявлены следующие тенденции: даларгин ускоряет регенерацию костной ткани и увеличивает объём костного мозга. В работе Ю. Д. Ляшева показано, что к 7-му дню после перелома голени максимальные показатели остеогенеза были в той группе, где применялся селективный агонист κ-рецепторов динорфин, на 10-й день наилучший результат показал агонист μ-рецепторов DAGO, а на 14-й – агонист δ-рецепторов DSLET. Однако эксперимент был выполнен на трудно воспроизводимой модели перелома голени крыс: дефект не был

строго фиксирован по размеру, а имел произвольный характер и был рассчитан на спонтанное сращение; методика морфометрического анализа не соответствовала современным рекомендациям [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013]: главным образом вычисляли процентное соотношение костной ткани, хрящевой ткани и рубца в случайных полях зрения. Крайне малое количество однозначных достоверных данных по теме регенерации костной ткани под действием опиоидов требует проведения более тщательных исследований.

Цель исследования

Целью настоящей работы является изучение влияния опиоида периферического действия даларгина на репаративную регенерацию костной ткани *in vivo* и пролиферацию нормальных и опухолевых клеток костной ткани *in vitro*.

Задачи исследования

1. Оценить влияние даларгина на регенерацию костной ткани *in vivo* на модели критического дефекта теменных костей крыс.
2. Исследовать *in vitro* влияние даларгина на рост клеток разной степени зрелости одного дифферона: мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и дермальных фибробластов.
3. Изучить воздействие даларгина на пролиферацию клеток остеосаркомы человека линии HOS для оценки его влияния на опухолевый рост.
4. Определить тип опиоидных рецепторов, принимающих участие в регенерации костной ткани.
5. Для модели критического дефекта теменных костей крыс разработать доказательные методы объёмной динамической морфометрии костной ткани, включающие адаптацию двойного мечения флуорохромами и разработку метода 3D-морфометрии, точно характеризующего регенерат, с последующим сравнением с традиционными 2D-методиками.

Научная новизна исследования

Впервые установлено, что даларгин стимулирует пролиферацию остеогенных клеток в культуре, воздействуя на опиоидные δ -рецепторы. На модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью объективных методов морфометрии показано, что введение даларгина подавляет процессы неоостеогенеза, в то время как блокирование опиоидных рецепторов налоксоном в присутствии даларгина, напротив, увеличивает объем регенерата. Полученные данные раскрывают механизм его воздействия на репаративную регенерацию костной ткани: даларгин стимулирует пролиферацию, но не дифференцировку остеогенных клеток.

Впервые выполнено сравнение пролиферативной активности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их «опухолевого эквивалента» - клеток линии HOS - под действием опиоидов. Показано противоопухолевое действие даларгина, подавляющего пролиферацию линии клеток остеосаркомы. Установлено, что даларгин стимулирует пролиферацию незрелых клеток и не влияет на зрелые в пределах одного дифферона.

Для точной оценки дефектов костной ткани цилиндрической формы, в частности критического дефекта теменных костей крыс, разработана математическая модель «резаный цилиндр» - метод 3D-морфометрии костной ткани на гистологических препаратах. Математическая модель «резаный цилиндр» самым точным образом воспроизводит контур дефекта и позволяет автоматически позиционировать срезы в

пространстве. Её комбинация с адаптированным протоколом двойного мечения тетрациклиноподобными флуорохромами позволяет оценить динамику неоостеогенеза в объёме.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Данные о подавлении даларгином пролиферации остеосаркомы линии HOS могут быть использованы для разработки новых подходов лечения опухолей костной ткани.

Результаты работы могут лечь в основу дальнейших исследований механизма действия опиоидов и разработки новых схем лечения и реабилитации в отделениях травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии.

Разработанные новые подходы для объективной оценки регенерации костной ткани позволяют провести более точную количественную оценку этого процесса и повысить качество исследований, направленных на изучение репаративной регенерации костной ткани *in vivo*.

Методология и методы исследования

В работе применена комплексная методология исследования, сочетающая культуральные методы, гистологические (специфические методики окраски костной ткани, подготовки костных шлифов и приготовление гистологических препаратов); методы морфометрии флуоресцентной микроскопии, в том числе конфокальная микроскопия, компьютерное сегментирование и 3D-моделирование, математическое моделирование, статистические методы.

Положения, выносимые на защиту

Даларгин замедляет репаративную регенерацию костной ткани, стимулируя пролиферацию клеток-предшественников, но не их дальнейшую дифференцировку, что приводит к снижению объёма костного регенерата.

Даларгин не оказывает влияния на пролиферацию зрелых соединительнотканых клеток - дермальных фибробластов и подавляет пролиферацию опухолевых клеток.

Разработанный метод 3D-морфометрии - математическая модель «резаный цилиндр» более точно характеризует регенерат в области критического дефекта теменных костей крыс по сравнению с классическими методами.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обусловлена достаточным количеством контрольных групп в эксперименте и сравнением результатов, полученных различными методами морфометрии с помощью адекватно применённых статистических тестов.

Материалы диссертации были доложены на XVIII Межгородской конференции молодых учёных (СПб, 2012); V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2013); Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» с международным участием (Москва, 2014) и межлабораторной конференции (ФГБНУ НИИМЧ, Москва, апрель 2015).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 4 научные работы, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

Внедрение результатов работы

Результаты исследования внедрены в лекционные курсы для студентов и ординаторов ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России и ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего в себя 45 российских и 66 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 39 рисунком и 3 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование включало три этапа. Прежде всего были отработаны методики операции, гистологической обработки материала и разработаны новые методы объёмной морфометрии. Затем было проведено экспериментальное исследование влияния даларгина на репаративную регенерацию костной ткани на крысах. В дальнейшем изучали воздействие даларгина и его блокатора налоксона на пролиферацию клеточных культур *in vitro*.

Исследование модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью объёмной морфометрии

Операция формирования дефекта. Исследование проводили на 21 самце крыс линии Sprague-Dawley массой тела 350 г. Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета (Протокол № 8а заседания биоэтической комиссии ФГБУ «ННИИМЧ» РАМН от 10.11.2012), при его постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г. и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. Под внутрибрюшинным наркозом (Золетил (Virbac, Франция) в дозировке 125 мкг/кг) крысам на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана S-reamer диаметром 5,5 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса.

Послеоперационный период и мечение флуорохромами. В послеоперационном периоде крысы были разделены на 3 группы по 7 крыс в каждой. В первой группе (К) исследуемым животным ежедневно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в объёме 0,5 мл, во второй (Д) – 0,5 мл раствора даларгина в дозировке 100 мкг/кг, в третьей (Д+Н) – 0,5 мл смеси растворов даларгина и налоксона в дозировке 100 мкг/кг и 0,5 мг/кг, соответственно. Поскольку налоксон является неизбирательным блокатором опиоидных рецепторов, его использование позволяет установить рецепторный механизм действия даларгина. Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках проводили прижизненное двойное мечение новообразованной костной ткани ализариновым красным С и доксициклином по модифицированной методике, подробное описание которой представлено в разделе «Результаты».

Рентгенологическое исследование. Полученный 21 образец свода черепа подвергали прицельной рентгенографии (радиовизиограф Gendex Expert DC). На

рентгенограммах измеряли площадь рентгеноконтрастных зон внутри дефекта, соответствующих новообразованной минерализованной костной ткани. Во избежание проекционных искажений, связанных с позиционированием образца по отношению к лучевой трубке и датчику, измеряли также площадь изначального дефекта (*Рисунок 1*).

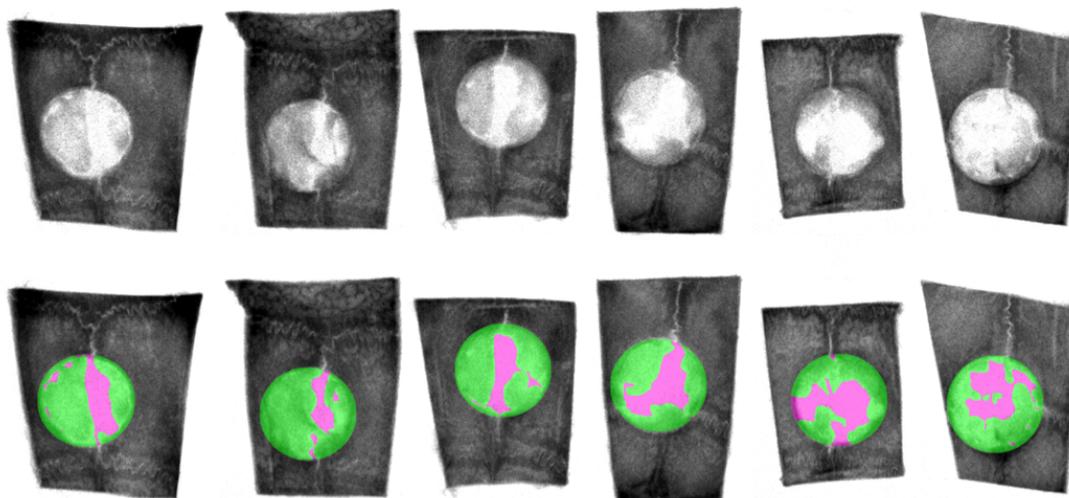


Рисунок 1 - Прицельная рентгенография образцов. Выделение на рентгенограмме области дефекта (розовый) и образованного регенерата (зелёный).

Гистологическое исследование и морфометрия. После рентгенографии образцы заключали в полимерные блоки полиэтилметакрилата и изготавливали серийные срезы с помощью, закреплённой портативной стоматологической установки с использованием стандартного алмазного зуботехнического отрезного диска. Далее срезы шлифовали до толщины 50-60 мкм и производили их анализ с помощью люминесцентной микроскопии для визуализации флуоресцентных меток. На полученных изображениях отдельно измеряли площади (Md.Ar.) каждой метки [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013] (*Рисунок 2*).

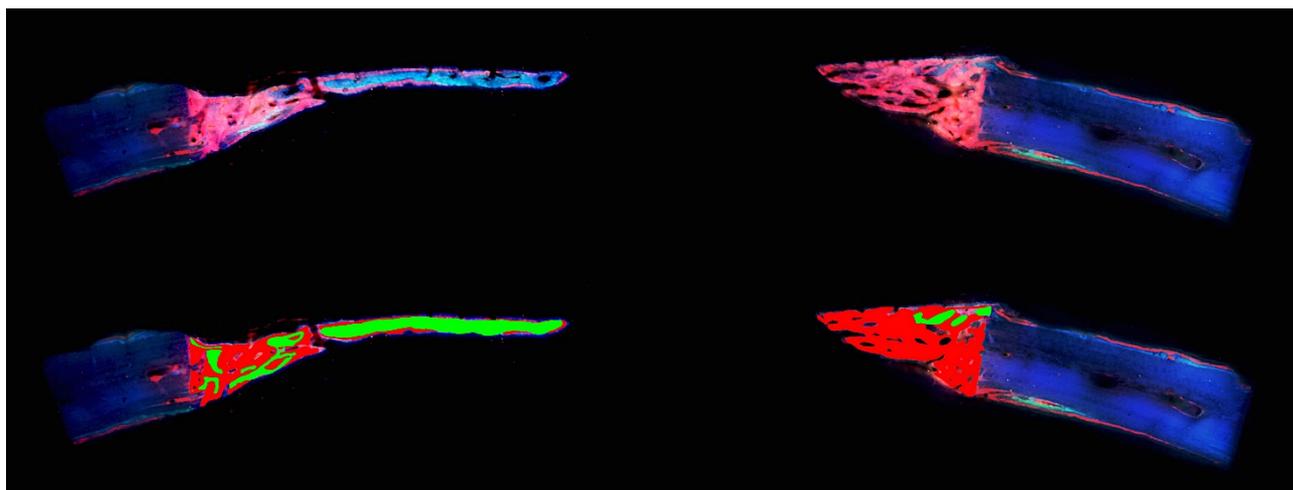


Рисунок 2 - Шлиф дефекта теменных костей крысы при флуоресцентной микроскопии. Сверху - свечение бирюзовым доксициклина и красным - ализарина. Снизу – обработка того же изображения для морфометрического анализа в Photoshop: зелёным выделена доксициклиновая метка, красным - ализариновая метка. Объектив x5.

На основе плоскостных параметров регенерата, определённых на каждом шлифе [Parfitt et al., 1987; Dempster et al., 2013], вычисляли его объёмные параметры с помощью построения 3D-моделей по данным сегментирования изображений шлифов. Для этого изображения серии гистологических шлифов вводили в программу Visage Imaging Amira v5.5 (США), где размещали в пространстве, выполняли разметку (Рисунок 3). Далее вычисляли объёмы регенерата и дефекта, а также их соотношение, то есть значение относительного объёма регенерата.

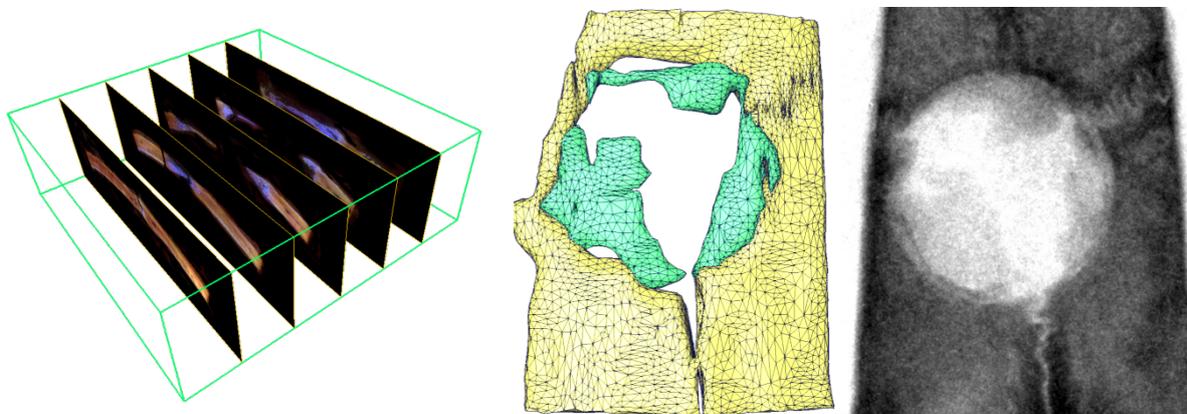


Рисунок 3 - 3D-реконструкция по гистологическим срезам. Слева - позиционирование гистологических срезов в пространстве. В центре – на реконструкции зелёным цветом выделена новообразованная костная ткань. Справа - для сравнения показана прицельная рентгенограмма того же образца.

Поскольку вышеописанный метод 3D-реконструкции не позволял точно позиционировать в пространстве срезы с нестандартизированной толщиной, а стандартный протокол программы Amira не адаптирован к построению модели цилиндрической формы и приводил к возникновению артефактов в виде «лесенки», возникла необходимость в более точной методике для выполнения объёмной морфометрии. Для этого была разработана и использована математическая модель «резанный цилиндр», более точно адаптированная к модели критического дефекта теменных костей крыс (см. раздел «Результаты и обсуждение»).

Конфокальная микроскопия. С целью детального анализа морфологии костного регенерата, меченного флуоресцентными метками, шлифы изучали с помощью конфокального микроскопа (Leica TCS SP8 X). Ализариновую метку визуализировали с помощью возбуждающего источника света длиной волны 580 нм и фильтрацией эмиссии 679 нм. Доксициклиновую метку визуализировали с помощью возбуждающего источника света частотой 450 нм и фильтрацией эмиссии 540 нм.

Микроскопия в проходящем свете. После того как шлифы исследовали с помощью люминесцентной и конфокальной микроскопии, их окрашивали в водном растворе толуидинового синего, подкисленного уксусной кислотой (10 мин) и кислого фуксина (30 мин). Далее шлифы обезвоживали в восходящих спиртах, карбол-ксилоле и ксилоле и заключали в канадский бальзам.

Оценку морфологии тканей и клеток в области регенерата проводили на классических парафиновых срезах. Для этого дополнительно использовали образцы теменных костей, полученные в процессе пилотного эксперимента. Всего использовали 6 образцов, по 2 образца для каждой группы исследования. Теменные кости, содержащие дефект, после фиксации в нейтральном 10% растворе формалина

декальцинировали в смеси концентрированной муравьиной кислоты и 15% раствора формалина 1:1 в течение 2-3 суток, после чего образцы обезвоживали в восходящих спиртах, просветляли в ксилоле и заливали в парафиновые блоки по общепринятой методике. Далее на санном микротоме (Microm HM 430, Thermo Scientific, Германия) делали срезы толщиной 5-10 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровное стекло в бальзам (Bio-Optica, Италия).

Фотосъёмку препаратов в проходящем свете выполняли с помощью микроскопа Leica DM 4000 (Германия) и цифровой камеры Leica DFC 310 FX. Полученные изображения объединяли в панораму каждого среза с помощью программы Adobe Photoshop CS6 (США) и проводили морфологический анализ.

Статистический анализ. Относительные площади дефекта, измеренные на рентгенограммах, сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и теста Холма-Сидака (GraphPad Prism 6, США). Данные, полученные в ходе анализа соотношений флуоресцентных меток, сравнивали с помощью рангового дисперсионного анализа Краскала-Уоллиса с последующим тестом Данна.

Оценка пролиферации клеточных культур

Изучение влияния даларгина (Биолек, Украина) и его блокатора налоксона (Польфа, Польша) на пролиферацию клеток проводили на ММСК человека, ФБД и опухолевых клетках саркомы человека линии НОС.

Получение клеточных культур. Культуры ФБД и ММСК были получены, соответственно, из кожного биоптата и липоасpirата взрослых здоровых доноров после подписания добровольного развёрнутого информированного согласия (Рисунок 4а, б). Клетки остеосаркомы человека линии НОС были любезно предоставлены компанией «РеМеТэкс» (россия) (Рисунок 4в).

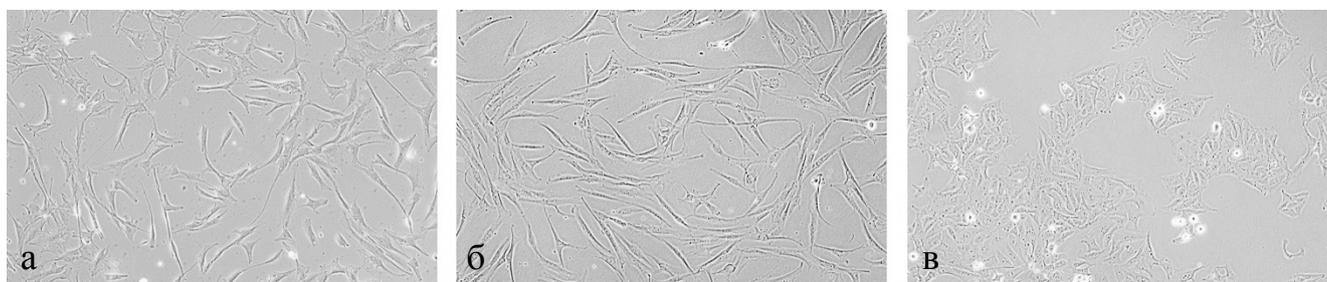


Рисунок 4 - Общий вид культур ММСК (а), ФБД (б) и клеток остеосаркомы линии НОС (с). Фазовый контраст, увеличение $\times 100$.

Экспериментальная часть. Клетки после размораживания культивировали в течение 3 суток, затем рассевали в чашки Петри диаметром 90 мм, выполненные из адгезивного полимера (Nunc, Дания). Три культуры ММСК и три культуры ФБД рассевали по 70×10^3 клеток на чашку. Клетки остеосаркомы человека линии НОС рассевали по 50×10^3 клеток на чашку, эксперимент повторяли трижды. Для культивирования использовали ростовую среду DMEM/F12 1:1 (ПанЭко, Россия), содержащую 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 10% ЭТС (РАА, Австрия) и 0,1 мг/мл амикацина (Синтез, Россия).

Оценку влияния различных доз даларгина и его блокатора налоксона на пролиферацию ММСК, ФБД и клеток остеосаркомы линии НОS проводили в 5 экспериментальных группах для каждой клеточной культуры:

Контроль - изотонический раствор хлорида натрия 0,09%.

1 группа – комбинация даларгина (100 мкг/л) и налоксона (0,5мг/л);

2 группа – комбинация даларгина (100 мкг/л) и налоксона (3 мг/л)

3 группа – даларгин в концентрации 10 мкг/л;

4 группа – даларгин в концентрации 100 мкг/л;

5 группа – даларгин в концентрации 1000 мкг/л;

Ежедневно в течение 3 сут в ростовую среду к клеткам, находящимся в логарифмической фазе роста, добавляли растворы исследуемых веществ в объёме 100 мкл для создания нужных концентраций этих веществ в каждой группе.

После 3 суток инкубирования клетки снимали с чашек Петри смесью растворов 0,02% Версена (ПанЭко, Россия) и 0,25% трипсина (ПанЭко, Россия) в соотношении 1:1. Клетки подсчитывали на аппарате "Пикоскель ПС-4М" (ООО «НПВ Лабовэй», Россия). Полученные данные анализировали с помощью рангового дисперсионного анализа Краскала-Уоллеса и теста Данна в программе GraphPad Prism 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка и усовершенствование методов исследования

Способ формирования критического дефекта теменных костей. Для проведения операции формирования критического дефекта теменных костей наилучшим образом подходит трепан С-геатер диаметром 5,5 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), используемый в хирургической стоматологии. Конструкция его рабочей части предусматривает защиту от повреждения подлежащих мягких тканей. Данный способ позволяет получить более аккуратно сформированный дефект воспроизводимых размеров в отличие от ранее предложенных способов [Полежаев, 1977; Montjovent et al., 2007].

Способ двойного мечения для модели критического дефекта теменных костей. Классическая схема введения флуорохромов [Ревелл, 1993] была модифицирована для достижения полной равномерной окраски регенерата, образованного на разных сроках эксперимента. К началу активной минерализации остеоида (на 8-й, 9-й и 10-й дни после операции) крысам делали внутрибрюшинные инъекции раствора доксициклина. На 15-й, 16-й и 17-й дни эксперимента крысам вводили раствор ализарина красного С для создания границ между метками. На 22-й, 23-й и 24-й день повторяли инъекции ализарина, в результате получали полное окрашивание краёв минерализованного регенерата, образованного к концу первичного неоостеогенеза (Рисунок 5). Внутрибрюшинный способ введения был выбран потому, что он обеспечивал наибольшую интенсивность свечения меток при минимальной травматизации животных.



Рисунок 5 - Адаптация схемы введения флуоресцентных меток для модели критического дефекта теменных костей крыс с целью окрашивания регенерата, образованного в процессе первичного неоостеогенеза. Зелёным цветом обозначены дни введения доксициклина, красным – ализаринового красного С.

Выбор способа оценки рентгенограмм. Полученные в ходе рентгенографии изображения критического дефекта теменных костей (см. главу "Материалы и методы") оценивали двумя способами. Первый способ заключался в визуальной оценке заполнения дефекта регенератом по балльной шкале от 0 до 4 [Patel et al., 2008; Spicer et al., 2012]. Второй способ включал измерения относительной площади регенерата. Для этого на рентгенограммах в программе Adobe Photoshop CS6 (США) выполняли измерение площадей костного регенерата и всего дефекта. После этого вычисляли отношение площади регенерата к площади дефекта, то есть относительную площадь регенерата. Использование такой величины позволяет исправить пространственные искажения, которые возникают при позиционировании образцов относительно лучевой трубки или датчика.

При сравнении количественных данных выявлена статистически значимая положительная корреляция между визуальной балльной оценкой регенерата и относительной площадью дефекта, определённой по рентгенограммам ($r=0,72$, $p<0,001$). Таким образом, применённые 2D методы дали сходную оценку регенерата.

Математическая модель «резаный цилиндр»

Для получения данных об объёме всего регенерата необходимо выполнить пересчёт 2D-параметров в 3D. Поскольку стандартные протоколы программ для 3D-реконструкций недостаточно адаптированы для воспроизведения объектов цилиндрической формы, то для получения более точных данных был разработан и использован индивидуальный для каждого среза множитель-коэффициент [Васильев и др., 2014].

Предложенный алгоритм позволяет:

- 1) автоматически позиционировать срез в пространстве модели и находить его толщину;
- 2) отказаться от использования крайне дорогостоящего оборудования, которое обеспечивает выполнение срезов со строго стандартизированным шагом;
- 3) более точно воссоздаёт контур регенерата и избавляет от артефактов типа "ступеньки" (Рисунок 6).

Математическая модель «резаный цилиндр» была рецензирована и одобрена ФГБУН Институт вычислительной математики Российской академии наук (ИВМ РАН). Особую благодарность выражаем специалисту в области математического сегментирования Александру Анатольевичу Данилову за вклад в исправления и совершенствование модели.

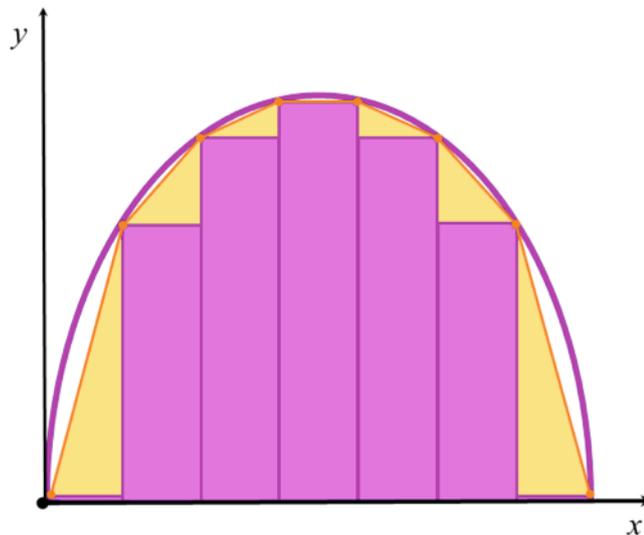


Рисунок 6 – Сравнение математических способов описания круглого дефекта. Наглядно продемонстрирован метод реконструкции края дефекта с помощью прямоугольников (обозначены сиреневым), трапеций (обозначены жёлтым), и разработанной нами модели «резанный цилиндр» (фиолетовый контур). Очевидно, что модель «резанный цилиндр» характеризует край дефекта без погрешностей.

Сравнение методик морфометрии. Для статистического анализа результатов в зависимости от характера распределения данных были использованы методы параметрической (парный t -тест Стьюдента) и непараметрической (корреляционный анализ по Спирмену) статистики с помощью программы SigmaStat 3.5 (SyStat Software).

При сравнении количественных данных, полученных с помощью различных способов морфометрии, выявлена статистически значимая положительная корреляция между визуальной балльной оценкой регенерата с относительной площадью дефекта, определённой по рентгенограммам ($r=0,72$, $p<0,001$). Таким образом, применённые 2D-методы дали сходную оценку регенерата. Относительная площадь дефекта по данным рентгенографии ($66,1\pm 2,7\%$) статистически значительно превышала долю регенерата в дефекте, определённую методами объёмной морфометрии: при использовании математической модели "резанный цилиндр" она составила $35,8\pm 6,5\%$ ($p=0,002$), наглядной 3D-реконструкции - $30,3\pm 6,7\%$ ($p<0,001$).

Таким образом, балльная оценка регенерата по прицельным рентгенограммам может использоваться для приблизительной оценки регенерата, поскольку данные, полученные этим методом, коррелируют с результатами измерения относительной площади регенерата на рентгенограммах.

Измерение относительной площади минерализованного регенерата на прицельных рентгенограммах не даёт точного представления об объёме новообразованной костной ткани, но позволяет оценить аппозиционный рост от края дефекта. Данные измерений относительной площади дефекта по рентгенограмме всегда превышали значения, полученные разработанными нами методами 3D-морфометрии, поскольку рентгеновский 2D-снимок не позволяет визуализировать пустоты над и под регенератом. Этот метод может применяться для оценки закрытия площади дефекта без учёта толщины регенерата.

Математическая модель "резанный цилиндр" очень удобна в применении и при использовании флуоресцентных меток позволяет охарактеризовать динамику

регенерации на одном образце. Неоспоримым плюсом этого метода является возможность автоматического позиционирования среза в пространстве: в зависимости от ширины дефекта на срезе вычисляется его толщина. Однако этот метод ещё не интегрирован в программы для 3D-моделирования и не позволяет визуализировать данные.

Наглядная 3D-реконструкция по гистологическим срезам уступает математической модели "резаный цилиндр" в связи с тем, что использует универсальный протокол интерполяции, не позволяющий точно воспроизвести форму дефекта (Рисунок 7). Тем не менее мы получали данные, сопоставимые с математической моделью "резаный цилиндр". Однако, в отличие от этой модели, универсальность метода наглядной 3D-реконструкции позволяет использовать его для морфометрии и реконструкции морфологических структур любой формы.

Математическая модель «резаный цилиндр» была рецензирована и одобрена ФГБУН Институт вычислительной математики Российской академии наук (ИВМ РАН). Особую благодарность выражаем специалисту в области математического сегментирования Александру Анатольевичу Данилову за вклад в совершенствование модели.

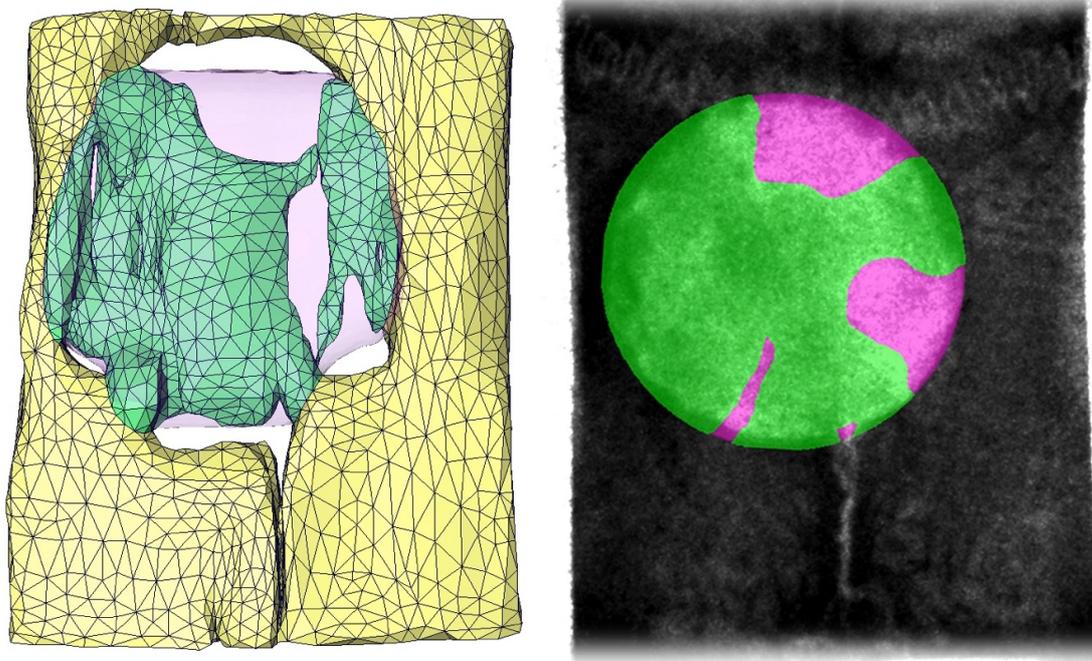


Рисунок 7 - Сравнение контура дефекта и регенерата по данным наглядной 3D-реконструкции и рентгенологической картины. В ходе 3D-моделирования на модели в области дефекта обнаруживаются пустые зоны сверху и снизу. Контуров самого дефекта (розовый) и регенерата (зелёный) имеют очертания сглаженных "ступенек".

Влияние даларгина на процессы репаративной регенерации костной ткани

Морфология регенерата. Различия в размере регенерата хорошо были видны на шлифах в проходящем свете. Не было выявлено межгрупповых различий в морфологии регенерата (*Рисунок 8, Рисунок 9, Рисунок 10*). Регенерат имел вид треугольника, основанием обращённого к материнской кости и разрастался по твёрдой мозговой оболочке к центру дефекта. При флуоресцентной микроскопии наблюдается накопление флуорохромов в местах минерализации, которые расположены на небольшом удалении от сосудов и краёв дефекта, что является показателем минерализации регенерата.

На парафиновых срезах, выполненных по традиционной методике с последующей окраской гематоксилином и эозином, морфология регенерата и его клеточный состав были визуализированы более точно. Край дефекта представлен новообразованной грубоволокнистой костной тканью, которая прилежит к материнской кости - пластинчатой костной ткани (*Рисунок 10*). Новообразованная костная ткань окружена первичными остеобластами и содержит первичные остециты. Оставшаяся часть дефекта представлена неоформленной соединительной тканью, распространяющейся от новообразованной грубоволокнистой костной ткани к центру дефекта и заполняющей его. Неоформленная соединительная ткань содержит полнокровные сосуды: вены, артериолы и капилляры. Она представлена неупорядоченными волокнами коллагена с фибробластами, имеющими веретенообразную форму. Лейкоциты и лимфоциты в поле зрения не обнаружены, что свидетельствует об отсутствии воспалительной реакции в области дефекта.

На рентгенограммах виден чёткий край круглого дефекта, имеющего правильную геометрическую форму. В области дефекта различаются рентгеноконтрастные зоны новообразованной костной ткани, стремящиеся от края дефекта к центру, но не заполняющие его полностью.

Морфометрическое исследование. По данным рентгенографии, относительная площадь регенерата в группе, где применяли комбинацию даларгина и налоксона, статистически значимо превышала площадь регенерата в группе, где применяли даларгин. Таким образом, блокирование опиоидных рецепторов, в отличие от их стимуляции, ускоряло неоостеогенез (*Рисунок 11*). Статистически значимых различий между группой контроля и группами, где применяли даларгин и его комбинацию с налоксоном, обнаружено не было.

Мечение флуоресцентными метками позволило разграничить области новообразованной костной ткани. Так, костная ткань, окрашенная доксициклином, образовалась в первые 14 суток эксперимента, ализариновым красным С – в последующие 14 суток (*Рисунок 9*). Флуоресцентная микроскопия гистологических срезов с последующей 3D-морфометрией показала, что соотношения площадей меток, полученных в каждой группе, статистически значимо не различались (*Рисунок 11*), что говорит в пользу того, что воздействия на опиоидные рецепторы в нашем эксперименте не изменяли характер неоостеогенеза, и в группе с даларгином и налоксоном мы имеем дело с истинным ускорением процессов неоостеогенеза, а не увеличением длительности какой-либо стадии регенерации.

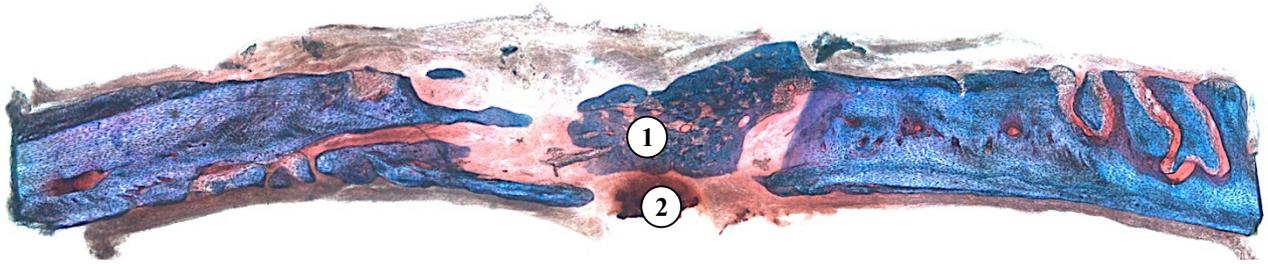


Рисунок 8 – Окрашенный илиф регенерата в области дефекта. Группа с введением даларгина и налоксона. Микроскопия в проходящем свете. Панорамное изображение. Окраска толуидиновым синим и кислым фуксином. Объектив х5.

1 – регенерат, 2 – неповрежденный сагиттальный венозный синус.

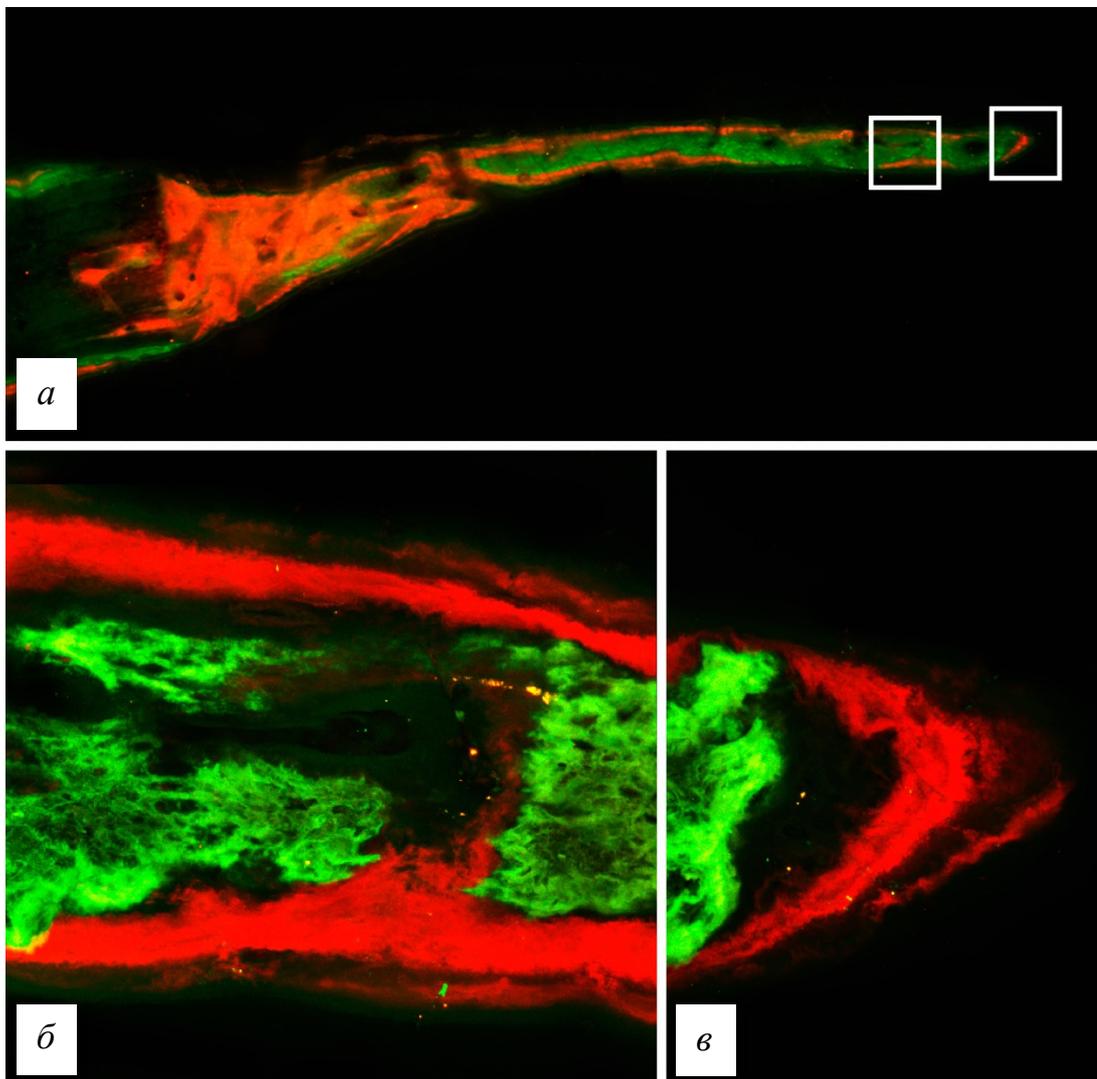


Рисунок 9 – Сравнение изображений регенерата, полученного с помощью обычной флуоресцентной микроскопии (а) и с помощью конфокального микроскопа (б, в). Зелёным окрашена костная ткань, меченная доксициклином, красным – ализарином. Объектив х 63.

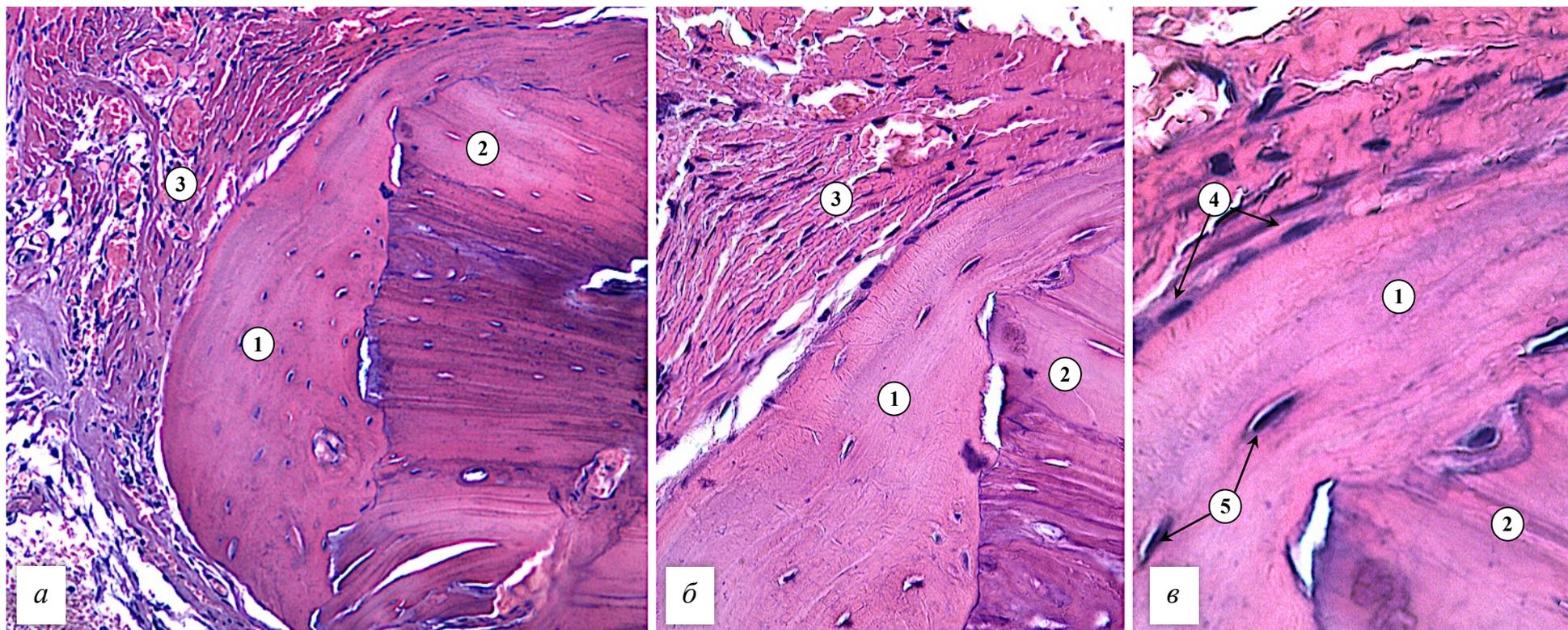


Рисунок 10 - Край дефекта на 28-е сутки. Г-Э. место соединения новообразованной костной ткани (1) с материнской костью (2) и рыхлой неоформленной соединительной тканью (3). Новообразованная кость представляет собой грубоволокнистую костную ткань, окружённую снаружи первичными остеобластами (4) и содержащую первичные остеоциты (5).

а - объектив 10х, б - объектив 40х, в - объектив 100х.

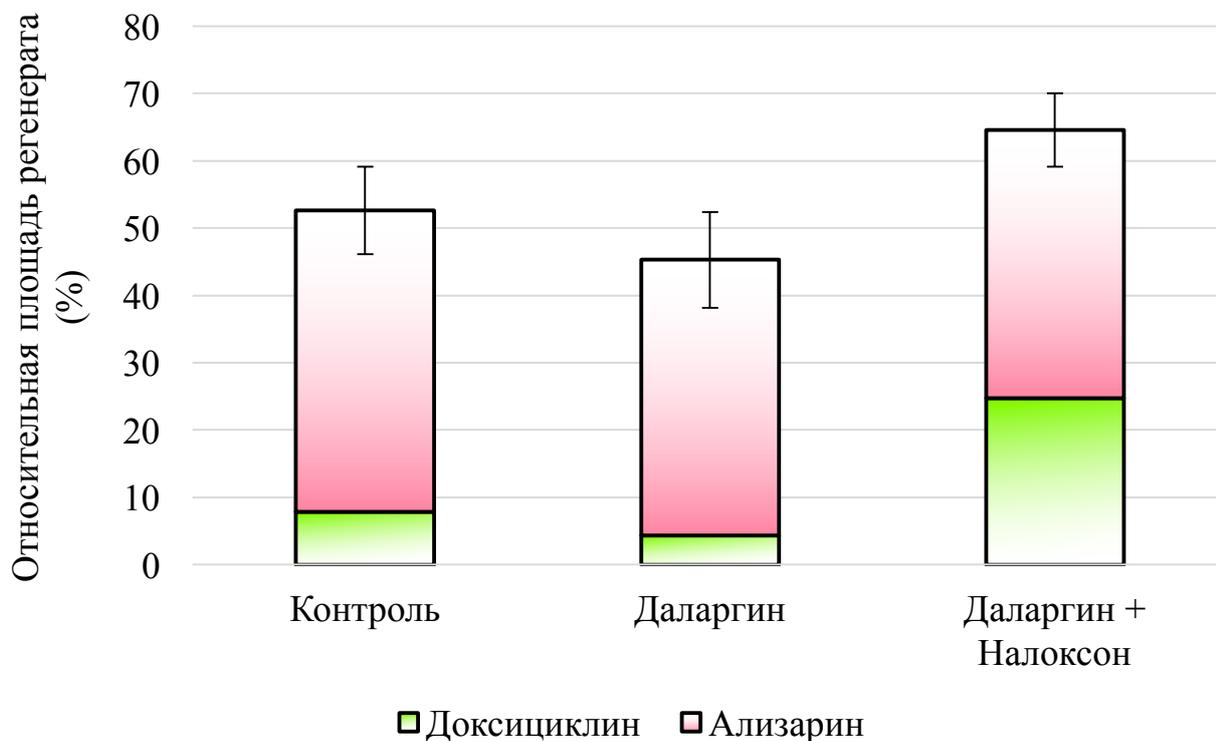


Рисунок 11 - Относительный объём регенерата, измеренный по данным рентгенографии. На гистограмме показаны арифметические средние и стандартное отклонение. Столбики гистограммы разделены на две части, соответствующие относительно объёму каждой метки по данным флуоресцентной микроскопии.

Влияние даларгина и налоксона на пролиферацию клеточных культур

К концу третьих суток эксперимента количество ММСК в группе с применением даларгина в концентрации 100мкг/л было статистически значимо больше по сравнению с контрольными значениями. При применении даларгина в меньшей концентрации, а именно 10 мкг/л, количество клеток ММСК от двух доноров из трёх было статистически значимо больше по сравнению с контролем, но меньше по сравнению с применением даларгина в концентрации 100 мкг/л. Использование даларгина в концентрации 1000 мкг/л не привело к статистически значимым изменениям количества клеток относительно контрольных значений (Рисунок 12).

Таким образом, оптимальной концентрацией для воздействия на ММСК можно считать 100 мкг/л, что согласуется с данными работ, выполненных для других типов клеток в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [Хугаева, 1990; Панькова, 1990]. Воздействие комбинацией налоксона в концентрациях 0,5 мг/л и 3 мг/л и даларгином в концентрации 100 мкг/л статистически значимо не повлияло на изменение количества клеток, выросших к концу эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о рецепторном механизме действия даларгина как агониста μ - и δ -опиоидных рецепторов, а именно о преобладающем участии δ -опиоидных рецепторов при стимуляции пролиферации ММСК, поскольку налоксон в концентрации 0,5 мг/л не блокирует μ -опиоидные рецепторы, а в концентрации 3мг/л неизбирательно блокирует все опиоидные рецепторы [Millan, Morris, 1988]. В пользу рецепторного механизма действия даларгина свидетельствует характер изменения эффекта в зависимости от дозировки [Сергеев и др., 1999]: по сравнению со средними дозировками применение больших и малых доз не было эффективным.

При анализе данных, полученных при исследовании клеток остеосаркомы линии HOS нами были получены противоположные результаты. Так, даларгин в концентрации 100 мкг/л статистически значимо снижал количество клеток линии HOS, выросших к концу эксперимента, по сравнению с контрольными значениями. В двух повторах эксперимента из трёх в группе с применением меньшей дозировки даларгина, 10 мкг/кг, статистически значимых отличий замечено не было (*Рисунок 13*).

Только во втором повторе наблюдалось статистически значимое уменьшение количества клеток по сравнению с контрольными значениями, хотя и менее выраженное по сравнению с группой, где применяли дозировку 100 мкг/л. Таким образом, оптимальной концентрацией даларгина для воздействия на опухолевые клетки линии HOS, как и для ММСК, можно считать 100 мкг/л. Однако под действием даларгина происходит угнетение пролиферации клеток линии HOS, в то время как у ММСК, напротив, происходит усиление пролиферативной активности. Воздействие комбинациями налоксона, 0,5 мг/л и 3 мг/л, и даларгином, 100 мкг/л, на клетки линии HOS статистически значимо не повлияло на изменение количества клеток, выросших к концу эксперимента, как и случае с ММСК (*Рисунок 12, Рисунок 13*).

Распределение полученных медиан количества ФБД во всех группах напоминало распределение, полученное при исследовании пролиферации ММСК (*Рисунок 12*). Однако меньшая амплитуда этих изменений в группах исследования не давала статистически значимых различий по сравнению с группой контроля. Исключение составили 2 случая: у первого донора при применении даларгина в концентрации 1000 мкг/л наблюдалось статистически значимое уменьшение количества ФБД по сравнению с контролем; у второго донора при воздействии даларгина, 100 мкг/л наблюдалось статистически значимое увеличение количества ФБД по сравнению с контрольными значениями (*Рисунок 14*).

Таким образом, исследование ММСК и ФБД показало, что эффективность воздействия даларгина на пролиферацию клеток в пределах одного дифферона снижается по мере взросления клеток. Эти данные соотносятся с результатами экспериментов, в которых было показано, что гены проэнкефалина (PENK) экспрессируются в клетках-предшественницах остеобластов, но не в зрелых клетках [Keshet et al., 1989; Rosen et al., 1995]. Наши данные также косвенно подтверждают то, что опиоды являются эволюционно древними молекулами сигнализаторами [Дьяконова, 2001; Ашмарин, 2005]: в процессе специализирования клеток влияние опиоидной системы нивелируется.

Известно, что инициаторы дифференцировки в остеогенном направлении позволяют не только увеличить объём костного регенерата в области дефекта кости [Terbish et al., 2015; Полежаев, 1977], но и индуцировать эктопический неоостеогенез [Lee et al., 2015]. Так, при введении BMP-2 под кожу, там образуется костная ткань [Бухарова, 2014]. В то же время стимуляторы пролиферации остеобластов и их клеток-предшественников, например, bFGF, наоборот, препятствуют неоостеогенезу [Ma et al., 2015]. Как нами было показано в эксперименте на клеточной культуре *in vitro*, даларгин стимулирует именно пролиферацию ММСК. Таким образом, можно предположить, что хроническое введение одного лишь даларгина с целью увеличения объёма костного регенерата нецелесообразно, что было нами подтверждено в эксперименте на крысах *in vivo*.

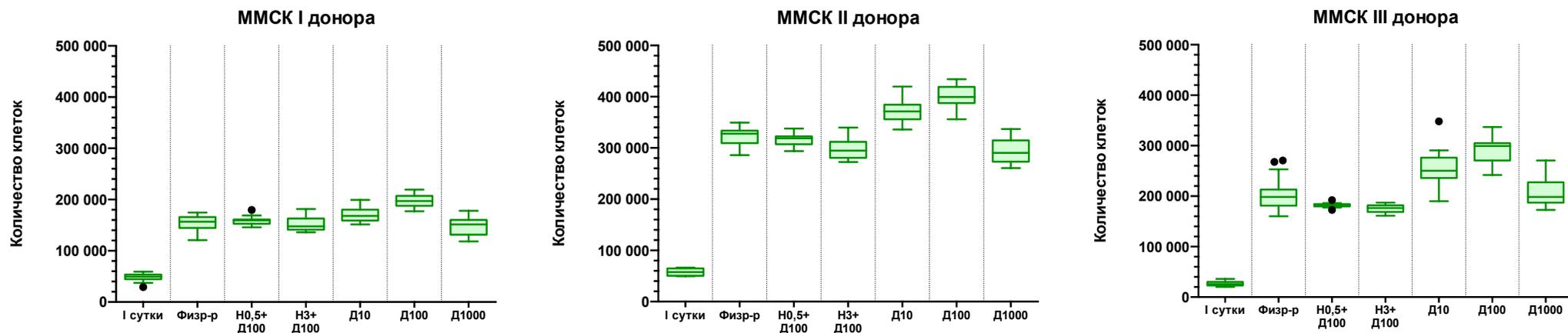


Рисунок 12 - Количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток от первого донора к концу 3 суток культивирования. Обозначение групп здесь и далее: I сут. – количество клеток до начала эксперимента. Физр-р – контрольная группа (добавлен физраствор). Н0,5+Д100 – группа, получавшая комбинацию налоксона 0,5 мг/л и даларгина 100 мкг/л. Н3+Д100 – группа, получавшая комбинацию налоксона 3 мг/л и даларгина 100 мкг/л. Д10 – группа, получавшая даларгин в концентрации 10 мкг/л. Д100 – группа, получавшая даларгин в концентрации 100 мкг/л. Д1000 – группа, получавшая даларгин в концентрации 1000 мкг/л.

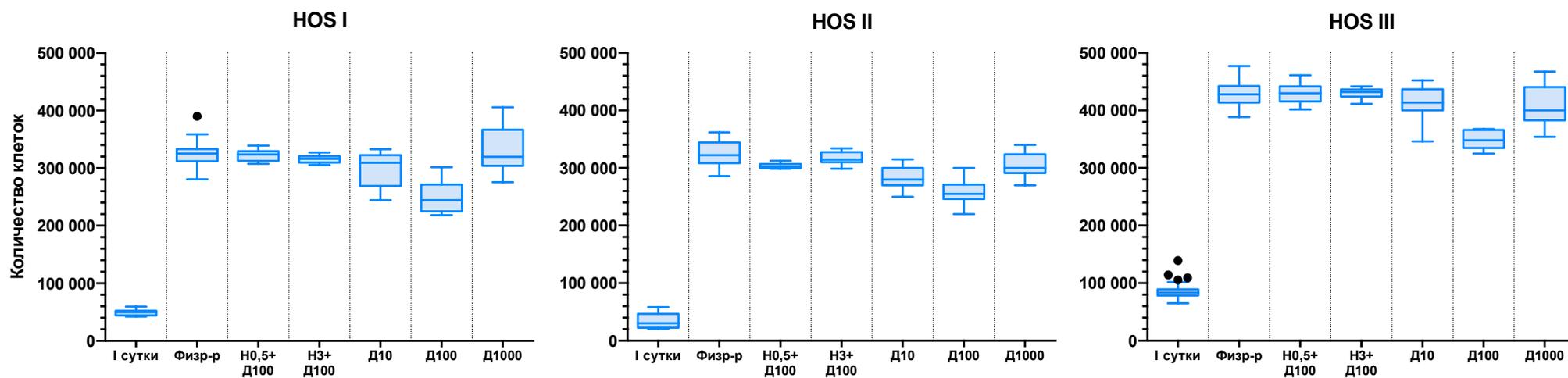


Рисунок 13 - Количество клеток остеосаркомы линии HOS опыте к концу 3 суток культивирования.

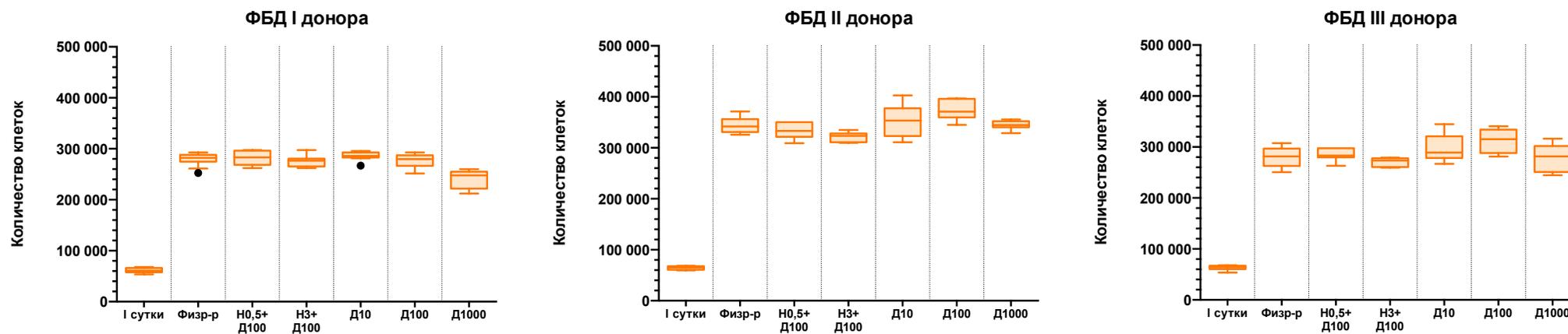


Рисунок 14 - Количество дермальных фибробластов после 3 суток культивирования.

ВЫВОДЫ

1. Длительное курсовое введение даларгина замедляет репаративную регенерацию костной ткани на 30% по сравнению с применением его комбинации с налоксоном, стимулируя пролиферацию клеток-предшественников, но не их дальнейшую дифференцировку, что приводит к снижению объёма костного регенерата.

2. Даларгин в концентрации 100 мкг/л, воздействуя через опиоидные δ -рецепторы, стимулирует пролиферацию в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), увеличивая их прирост к 3-м суткам на 19-34%.

3. Даларгин не оказывает существенного влияния на пролиферацию *in vitro* дермальных фибробластов, т.е. более зрелых клеток, дифференцированных из ММСК.

4. Даларгин в оптимальной концентрации 100 мкг/л оказывает выраженное антипролиферативное действие на клетки остеосаркомы линии HOS за счёт стимулирования опиоидных δ -рецепторов, уменьшая их прирост к 3-м суткам на 22-34%.

5. На модели критического дефекта теменных костей крыс разработан протокол двойного мечения костного регенерата флуорохромами, позволяющий получить полное окрашивание регенерата метками разного цвета, соответствующими различным срокам остеогенеза, что делает возможным анализ динамики неоостеогенеза. Его комбинация с методами трёхмерной гистоморфометрии позволяет оценить динамику изменения объёма регенерата.

6. Для точной оценки дефектов костной ткани цилиндрической формы, в частности критического дефекта теменных костей крыс, разработана математическая модель «резанный цилиндр» - метод 3D-морфометрии костной ткани на гистологических препаратах. Математическая модель «резанный цилиндр» самым точным образом воспроизводит контур дефекта и позволяет автоматически позиционировать срезы в пространстве.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Применение флуоресцентных меток для оценки регенерации костной ткани на модели критических дефектов теменных костей крыс с использованием адаптированного метода гистоморфометрии / Волков, А.В., **Васильев, А.В.**, Рачинская, О.А, Большакова, Г.Б., Гольдштейн, Д.В. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2013. – № 2. – С. 73-80.

2. Влияние даларгина на пролиферацию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, дермальных фибробластов и клеток остеосаркомы человека *in vitro* / **Васильев А.В.**, Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. // Гены и клетки. – 2014. – № 4. – С. 76-80

3. Влияние даларгина на репаративную регенерацию критического дефекта теменных костей крыс / **Васильев А.В.**, Большакова Г.Б. // Морфологические ведомости. – 2014. – № 4. – С.11-18

4. Характеристика неоостеогенеза на модели критического дефекта теменных костей крыс с помощью традиционной и трёхмерной морфометрии. / **Васильев А.В.**, Волков А.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В. // Гены и клетки. – 2014. – № 4. – С. 121-127

5. Возможности влияния опиоидов на репаративную регенерацию костной ткани: перспективы синтетического опиоидного пептида периферического действия «даларгина» / **Васильев А.В.**, Волков А.В. // Актуальные проблемы физиологии. XVIII межгородская конференция молодых учёных. Сборник тезисов. – 2012. – С. 27-28.

6. Влияние даларгина на пролиферацию культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и дермальных фибробластов и линии клеток саркомы человека / **Васильев А.В.**, Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б. // V Всероссийская научно-практическая конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина». Сборник тезисов. 2013. – С. 12.

7. Влияние даларгина на пролиферацию культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и их дифференцировку в остеобластическом направлении / **Васильев А.В.**, Бухарова Т.Б., Волков А.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Салимханов В.Я. // Всероссийская научная конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» с международным участием. Сборник научных трудов. – 2014. – С. 53-54.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

HOS – human osteosarcoma (остеосаркома человека)

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ФБД – дермальные фибробласты