



УДК 575.224.23:616.155.015:615.47:539.2

ОЦЕНКА ЧАСТОТЫ И СПЕКТРА ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ДИСПЛАЗИЕЙ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ КОНТАКТЕ КЛЕТОК КРОВИ С НАНОСТРУКТУРНЫМИ МАТЕРИАЛАМИ

Дворниченко М.В.

НОЦ «Биосовместимые материалы и биоинженерия» при Национальном исследовательском Томском политехническом университете, Сибирском государственном медицинском университете, Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск

РЕЗЮМЕ

С целью оценки цитогенетического эффекта нанокompозитных материалов, применяемых в травматологии и ортопедии, проведено исследование хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов при их краткосрочном контакте с искусственными материалами (наноструктурированные титановые образцы имплантатов, несущие двустороннее кальций-фосфатное покрытие) у пациентов с дисплазией соединительной ткани (ДСТ) и несовершенным остеогенезом (НО). При добавлении модельных биосовместимых композитов в культуры клеток крови пациентов с ДСТ и НО выявлено снижение доли aberrантных клеток, несущих одиночные и (или) парные разрывы хромосом, по сравнению с результатами спонтанного мутагенеза (без модельных образцов). Анализ частоты и спектра хромосомных aberrаций в клетках периферической крови может рассматриваться как потенциальный прогностический критерий и предиктор эффективности имплантата в хирургическом лечении осложнений ДСТ и НО.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: одиночные и парные разрывы хромосом, культура лимфоцитов, *in vitro*, дисплазия соединительной ткани, наноструктурированный титан, кальций-фосфатное покрытие.

Введение

Переход к наноразмерному состоянию органических и неорганических материалов является перспективным для современного этапа развития науки и техники. В настоящее время актуальным представляется достижение баланса между безусловным обеспечением безопасности применения нанотехнологий для здоровья ныне живущего и будущих поколений, с одной стороны, и насущной необходимостью обеспечения прогресса в производстве и внедрении продукции nanoиндустрии, обладающей множеством полезных потребительских свойств [1, 2].

Сегодня постулируется, что наноразмерные материалы, наноструктурные имплантаты и покрытия должны найти активное применение для решения большинства критических проблем современной био-

логии и медицины [3]. Появились новые методы регенерации костной ткани, основанные на применении наноматериалов. Подобные костные матрицы, содержащие коллаген и гиалуроновую кислоту, уже прошли клинические испытания на пациентах с дефектами костей, возникающими после травмы, удаления опухолей и спондилодеза [4].

Наноматериалы находят применение и в качестве покрытий на конструкции для металлоостеосинтеза. В экспериментальных исследованиях показано, что покрытия из наноразмерных частиц фосфата кальция способствуют лучшей остеоинтеграции в сравнении с обычными кальций-фосфатными покрытиями [5]. Кроме того, модификация покрытий позволяет создавать пористые наноструктурные компоненты имплантатов, имеющие большую площадь поверхности для взаимодействия с клетками, белками и молекулами лекарственных препаратов [6].

Одним из перспективных направлений применения наноматериалов является разработка терапевтиче-

✉ Дворниченко Марина Владимировна, тел. 8-913-826-6800; e-mail: dochic@yandex.ru

ских решений в области детской патологии костно-мышечной системы и соединительной ткани, частота которой достигает 31,5%, а среди всех детей с ограниченными функциональными возможностями указанная патология встречается с частотой 5,3% [7]. Одними из наиболее проблематичных в плане терапевтических решений являются диспластические состояния соединительной ткани: дисплазия соединительной ткани (ДСТ) и несовершенный остеогенез (НО). Они характеризуются нарушением гистогенеза в эмбриональный и постнатальный периоды вследствие генетически измененного фибриллогенеза внеклеточного матрикса, который затрагивает все виды соединительной ткани [7, 8].

Однако вопросы взаимодействия биологических структур и искусственных наноразмерных и наноструктурных материалов на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях практически не изучены, методики трудно воспроизводимы [9]. Наномедицина, нанобиотехнология и нанотоксикология являются новыми областями, существует немного экспериментальных данных о молекулярно-генетических эффектах (как позитивных, так и негативных), вызванных использованием нанообъектов. Генотоксичность наноматериалов исследована в единичных работах, в основном в тестах *in vitro* [2, 10–14]

По мнению ряда авторов, генотоксическая активность ультрамелкодисперсных материалов определяется их способностью индуцировать активные радикалы кислорода и азота, повреждающие ДНК [15, 16], а также высокой проницаемостью и прямым действием на внутриклеточные структуры, в том числе на цитоскелет и хроматин [2, 12, 17]. Учитывая возможность возникновения спонтанных мутаций *de novo*, с которыми связано большинство случаев патологии соединительной ткани [18, 19], оценка генетической безопасности длительного применения наноматериалов в практике остеосинтеза является одним из актуальных вопросов нанотоксикологии.

Для оценки активности мутационного процесса применяется методология цитогенетического анализа (рутинного и FISH) частоты нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций (ХА), анеуплоидий и сестринских хроматидных обменов в соматических клетках человека [20–22].

Учитывая, что нарушение структуры хромосом отражает мутагенные процессы при воздействии факторов как эндогенной, так и экзогенной природы, в настоящей работе была проведена оценка цитогенетического эффекта нанокompозитных материалов, применяемых в травматологии и ортопедии при травмах и дисплазиях соединительной ткани.

Материал и методы

Для проведения исследования выбран алгоритм, основанный на анализе вариабельности уровня ХА в культуре лимфоцитов при краткосрочном контакте с искусственными материалами. Это оправдано тем, что оценка ХА является хорошо зарекомендовавшим высокочувствительным методом анализа мутагенного воздействия, позволяющим определить сам факт такого воздействия, его степень, а также эффективно дифференцировать тип мутагенеза (химический, радиационный, биологический) [21, 23, 24].

Для анализа ХА выбран стандартный цитогенетический анализ культивируемых лимфоцитов периферической крови [25, 26]. Забор венозной крови для цитогенетического анализа производился в вакуумные контейнеры типа Vacuette объемом 10 мл с антикоагулянтом (гепарином). Кровь культивировали при температуре 37 °С в питательной среде, содержащей 85% среды RPMI-1640 (Sigma, США) и 15% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США). Среду для культивирования стерильно добавляли во флаконы с кровью из расчета 5 мл среды на 1 мл крови. Вторую часть крови пациентов и здоровых добровольцев культивировали в присутствии потенциального индуктора мутагенеза (см. ниже) из расчета 1 диск на 1 флакон. В каждый флакон вносили по 0,2 мл фитогемагглютинина (ФГА), используемого для стимуляции деления лимфоцитов. Фиксацию культур проводили через 72 ч культивирования, так как в этот период отмечается наибольшее число клеток первого митоза [26]. При более поздних сроках фиксации культур происходит изменение состава клеточной популяции, так как появляются клетки во втором и третьем митозах и вследствие элиминации части поврежденных хромосом изменяются частота и спектр ХА [26].

Для накопления клеток в стадии метафазы в культуре клеток за 1 ч 45 мин до окончания культивирования вводили 180 мкл колхицина в конечной концентрации 0,06 мкг/мл. Через 1 ч 45 мин содержимое флаконов взбалтывали, переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при скорости 1 000 об/мин. Супернатанты удаляли и добавляли гипотонический раствор (0,55%-й раствор хлорида калия) в количестве 8 мл. Гипотоническая обработка осуществлялась при температуре 37 °С в течение 45 мин. После центрифугирования (5 мин при скорости 300g) надосадочную жидкость удаляли, а к осадку добавляли 8 мл фиксатора (этанолледяная уксусная кислота в соотношении 3 : 1). Пробирки встряхивали и оставляли в холодильнике при температуре 4 °С на 30 мин. Смену фиксатора про-

водили 2 раза. Из полученной суспензии приготавливали препараты [26].

Хромосомный анализ выполняли на препаратах с помощью микроскопа марки Nicon при малом (10×10) и большом (10×100) увеличении. Отбор метафазных пластинок осуществляли с учетом следующих требований: цельность метафазной пластинки, четкость окраски, отсутствие или небольшое число (1–4) поперечных наложений хромосом, средняя степень их конденсации, обособленность метафазных пластинок друг от друга. Количество центромер – от 44 до 46. Обследовано 4 пациента с ДСТ, 2 человека с НО, 4 здоровых донора. От всех обследованных было получено информированное согласие на участие в исследовании. Была изучена клиническая картина четырех пациентов с различной выраженностью диспластического изменения соединительной ткани по классификации D.O. Sillence [27–30].

У каждого индивида было обследовано не менее 300 метафаз. Цитогенетические эффекты мутагенного воздействия оценивали по следующим параметрам: доля аберрантных клеток (отношение числа аберрантных метафаз к общему числу проанализированных метафаз), число аберраций (на 100 клеток), число одиночных и парных разрывов на 100 клеток [21, 26].

В качестве потенциальных индукторов мутагенеза применяли подложки из наноструктурированного титана BT1.0 (диаметр 12 мм, толщина 1 мм), несущие двусторонние кальций-фосфатные (КФ) покрытия. Наноструктурные покрытия наносили на титановую подложку с помощью модификации способа микродугового оксидирования [16] в электролите с взвесью нанопорошка (диаметр частиц 10–40 нм) стехиометрического гидроксилапатита, полученного механохимическим способом.

Шероховатость поверхности Ra искусственных покрытий оценивали по значениям параметров вертикальных неровностей профиля с помощью измерительной системы Talysurf 5-120 (разрешающая способность 10 нм). Определяли Ra (мкм) как средний результат шероховатости в пределах нескольких длин

участков измерений согласно ГОСТ 2789-73. Измеренный индекс Ra фиксировали для всех модельных матриц в одном диапазоне (1,33–1,44 мкм), чтобы нивелировать известный эффект шероховатости на поведение клеток [28].

Полученные результаты выражали как выборочное среднее X и ошибку среднего m . При оценке полученных данных были использованы методы статистического описания, а также методы проверки статистических гипотез. Для анализа имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Колмогорова–Смирнова). Для оценки достоверности различий выборок, подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали t -критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке активности спонтанного мутагенеза было выявлено увеличение доли аберрантных клеток у пациентов с ДСТ в 5,8 раза, с НО – в 9,4 раза по сравнению с показателями здоровых доноров. Наиболее высокое число аберраций было зарегистрировано у пациентов с НО (рост в 8,7 раза по сравнению с показателями группы контроля и 1,4 раза по сравнению с показателями пациентов с ДСТ). Следует отметить, что структурные нарушения хромосом лимфоцитов были представлены аберрациями хроматидного и хромосомного типа (одиночные и парные фрагменты ДНК) (табл. 1, рис. 1, 2).

При этом зарегистрированные цитогенетические изменения в лейкоцитах периферической крови при ДСТ и НО могут быть связаны с негативным эффектом продуктов деградации (CrossLaps) мутантного коллагена, выявленных в культуре мононуклеаров крови у пациентов с НО [29].

При введении в культуры клеток крови здоровых доноров модельных биосовместимых имплантатов статистически значимых изменений ХА в лимфоцитах не выявлено (табл. 2).

Таблица 1

Показатели спонтанного мутагенеза в лимфоцитах здоровых доноров, пациентов с дисплазией ($X \pm m$)			
Показатель	Здоровые доноры	Дисплазия соединительной ткани	Несовершенный остеогенез
Количество исследованных метафаз	1 200	1 200	600
Аберрантные клетки, % (число аберрантных метафаз к общему числу метафаз)	$0,50 \pm 0,12$	$2,90 \pm 0,14^*$	$4,70 \pm 0,71^{***}$
Число аберраций на 100 клеток	$0,58 \pm 0,28$	$3,59 \pm 0,12^*$	$5,06 \pm 0,27^{***}$
в том числе			
одиночные фрагменты	$0,42 \pm 0,11$	$2,40 \pm 0,09^*$	$3,30 \pm 0,12^{***}$
парные фрагменты	$0,16 \pm 0,10$	$1,19 \pm 0,05^*$	$1,76 \pm 0,04^*$

* Статистическая значимость различий показателей пациентов и здоровых доноров, $p < 0,05$.

** Статистическая значимость различий показателей пациентов с ДСТ и больных НО, $p < 0,05$.

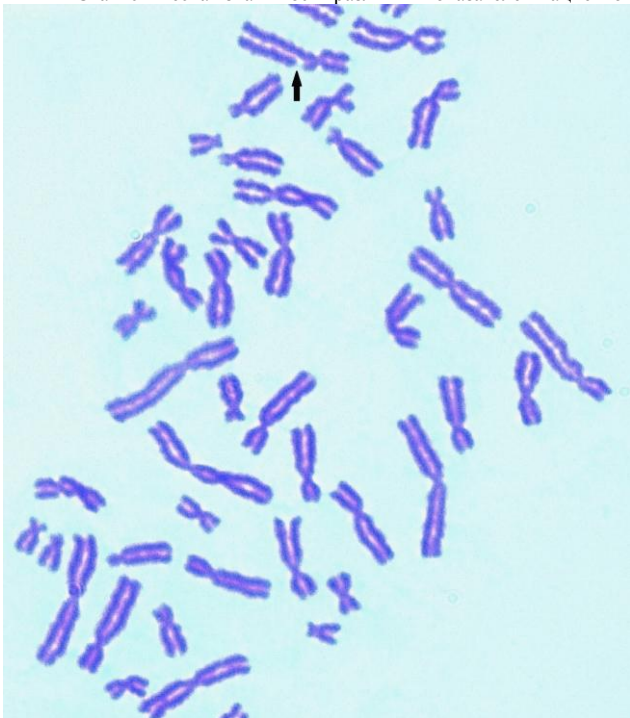


Рис. 1. Структурные нарушения хромосом лимфоцитов. Одиночный фрагмент (отмечено стрелкой). Окраска по Гимзе. Ув. 1 000

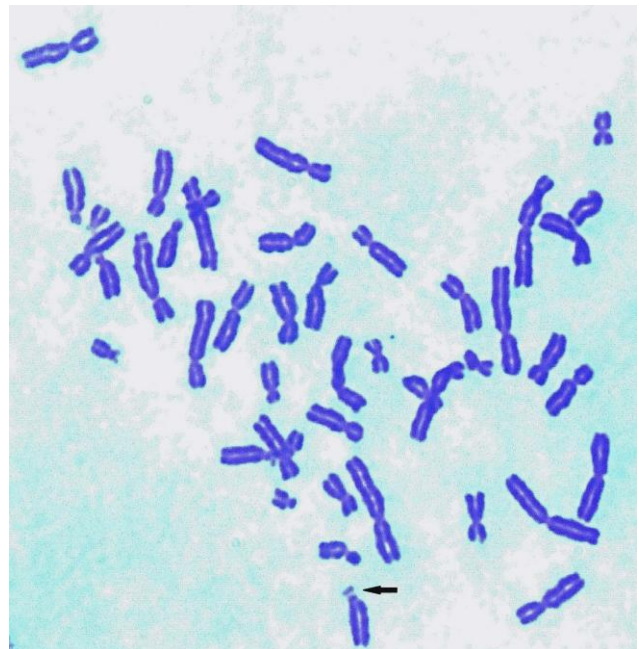


Рис. 2. Структурные нарушения хромосом лимфоцитов. Парный фрагмент (отмечено стрелкой). Окраска по Гимзе. Ув. 1 000

Таблица 2

Сравнительный анализ спонтанного и индуцированного мутагенеза (при контакте с образцами имплантатов) лимфоцитов крови у здоровых доноров и пациентов с дисплазией соединительной ткани в условиях краткосрочного контакта с тестируемыми материалами ($X \pm m$)

Показатель	Здоровые доноры		Дисплазия соединительной ткани	
	Спонтанный мутагенез	Индукцированный мутагенез	Спонтанный мутагенез	Индукцированный мутагенез
Количество исследованных метафаз	1 200	1 200	1 200	1 200
Аберрантные клетки, % (число аберрантных метафаз к общему числу метафаз)	$0,50 \pm 0,12$	$0,79 \pm 0,04$	$2,90 \pm 0,14^*$	$1,42 \pm 0,08^{* **}$
Число aberrаций на 100 клеток	$0,58 \pm 0,28$	$0,79 \pm 0,10$	$3,59 \pm 0,12^*$	$1,56 \pm 0,11^{* **}$
в том числе				
одиночные фрагменты	$0,42 \pm 0,11$	$0,69 \pm 0,04$	$2,40 \pm 0,09^*$	$1,70 \pm 0,10^*$
парные фрагменты	$0,16 \pm 0,10$	$0,10 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,05^*$	$0,00 \pm 0,00^{**}$

* Статистическая значимость различий показателей пациентов и здоровых доноров.

** Статистическая значимость различий показателей пациентов с ДСТ в тестах спонтанного и индуцированного мутагенеза, $p < 0,05$.

В то же время в культуре мононуклеарных лейкоцитов, выделенных из крови пациентов с ДСТ, после введения искусственных матриц установлено значительное (более чем в 2 раза) снижение доли аберрантных клеток, а также числа aberrаций в клетках (в 2,3 раза) (табл. 2).

Отрицательный эффект синтезируемой мутантной цепи коллагена [31], присутствующей в одной молекуле белка с нормальной цепочкой, реализуется при

формировании трехмерного внеклеточного матрикса соединительной ткани и ее производных. Нарушение трехмерной структуры волокнистого вещества способно нарушать по механизму обратной связи структурно-функциональное состояние клеток. В связи с этим восстановление нормального паттерна экстрацеллюлярного матрикса за счет введения в культуру клеток имплантатов, имитирующих минеральную часть кости, способно, по-видимому, нормализовать

трансмембранные сигнальные процессы и структурное состояние внутриклеточных органелл. Выявленный феномен улучшения состояния хромосом в лимфоцитах крови пациентов с ДСТ требует дальнейшего изучения для понимания механизмов эффективной биоинтеграции и терапевтического эффекта биоактивных (с КФ-покрытием) имплантатов, выявленного ранее [29] при остеосинтезе переломов у пациентов с ДСТ и НО.

Заключение

Дезорганизация органического матрикса у пациентов с ДСТ и НО сопровождается повышенным фоном хромосомных aberrаций в клетках периферической крови. Краткосрочный контакт модельных матриксов с культурой лимфоцитов пациентов с ДСТ, но не здоровых добровольцев сопровождался снижением выхода ХА (одиночных и парных разрывов ДНК). Возможно, это связано с эпигенетическим влиянием кальций-фосфатных материалов, имитирующих природный минеральный матрикс кости, на хромосомный аппарат клеток мезенхимального происхождения. Антимутагенный эффект наноструктурных материалов с кальций-фосфатным покрытием в условиях патологии соединительной ткани интересен как потенциальный прогностический критерий и предиктор успешности их применения в хирургическом лечении осложнений ДСТ и НО и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8036 от 12.07.2012).

Литература

1. Гмошинский И.В., Смирнова В.В., Хотимченко С.А. Современное состояние проблемы оценки безопасности наноматериалов // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5, № 9–10. С. 6–10.
2. Шляхто Е.В. Нанотехнологии в биологии и медицине. СПб., 2009. 320 с.
3. Андреев Г.Б., Минашкин В.М., Невский И.А., Путилов А.В. Материалы, производимые по нанотехнологиям: потенциальный риск при получении и использовании // Российский химический журнал (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). 2008. Т. LII, № 5. С. 32–38.
4. Федотов А.Ю. Пористые композиционные материалы. Фосфатно-кальцевая керамика – биополимер для регенерации костных тканей: автореф. ... канд. тех. наук. М., 2010. 26 с.
5. Баринов С.М. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука. 2005. 204 с.
6. Гречников Ф.В., Соснина Т.Н. Наноматериалы и нанотехнологии в технико-технологическом и социально-экологическом измерении // Известия Самар. науч. центра РАН. 2007. Т. 9, № 3. С. 562–569.
7. Горбунова В.Н., Кадурина Т.И., Белоног О.Л., Арсентьев В.Г., Шабалов Н.П. Наследственные нарушения соединительной ткани в детской ортопедической практике (обзор литературы). Ч. I // Рос. вестн. дет. хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2011. № 1. С. 110–113.
8. Чурилина А.В., Москалюк О.Н. Нарушение метаболизма соединительной ткани при некоторых патологических состояниях у детей // Здоровье ребенка. 2006. Т. 1, № 1. URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/240>
9. Проданчук Н.Г., Балан Г.М. Нанотоксикология: состояние и перспективы исследований // Современ. проблемы токсикологии. 2009. № 3–4. С. 4–20.
10. Катлинский А.В. Курс лекций по биотехнологии. М.: Москов. мед. акад. им. И.М. Сеченова, 2005. 152 с.
11. Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды / Глушкова А.В., Радилов А.С., Рембовский В.Р. Нанотехнологии и нанотоксикология – взгляд на проблему // Под ред. акад. РАМН Ю.А. Рахманина. М., 2007. С. 89–91.
12. Оценка безопасности наноматериалов: метод. рекомендации. М., 2007.
13. Heinlaan M., Ivask A., Blinov I., Dubourguier H.-Ch., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* // Chemosphere. 2008. V. 71, Iss. 7. P. 1308–1316.
14. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles // Small-journal. 2008. V. 4, № 1. P. 26–49.
15. Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J., Jha A.N. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells // Mutat. Res. 2008. V. 640. P. 113–122.
16. Zhang Y., Chen W., Zhang J., Liu J., Chen G., Pope C. *In vitro* and *in vivo* toxicity of CdTe nanoparticles // J. Nanosci. Nanotechnol. 2007. V. 7. P. 497–503.
17. Zhu Y., Zhao Q., Li Y., Cai X., Li W. The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylyonchia mytilus* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2006. V. 6. P. 1357–1364.
18. Chan W.H., Shiao N.H., Lu P.Z. CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals // Toxicol. Lett. 2006. V. 167. P. 191–200.
19. Zhu L., Chang D.W., Dai L., Hong Y. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells // Nano. Lett. 2007. V. 7. P. 3592–3597.
20. Асанов А.Ю., Демикова Н.С., Морозов С.А. Основы генетики и наследственные нарушения развития у детей М.: Академия, 2003. 224 с.
21. Бочков Н.П. Клиническая генетика. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. 448 с.
22. Лазюк Г.И., Кириллова И.А., Кравцова Г.И., Кручинский Г.В. Тератология человека. М.: Медицина, 1991. 480 с.
23. Кулешов Н.П., Мutowин Г.Р., Барцева О.Б., Атаева Дж.М. Молекулярно-цитогенетические методы в диагностике хромосомных болезней // Мед. науч. и учебно-метод. журн. 2007. № 37. С. 66–85.
24. Пикалова Л.В. Применение цитогенетических методов исследования хромосом в радиологии // Молекулярная биология. 2007. Т. 9. URL: www.medline.ru
25. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока // Экологическая генетика. 2006. Т. V, № 3. С. 7–19.
26. Фреши Р.Я. Культура животных клеток Бином. Лаборатория

- тория знаний. 2010. 706 с.
27. Карлов А.В., Хлусов И.А., Зайцев К.В., Дворниченко М.В., Бельбасов Е.Н., Чайкина М.В., Аронов Д.А., Розенман Г. Взаимодействие *in vivo* остеогенных клеток с наноструктурными кальцийфосфатными покрытиями при электронно-индуцированном изменении их поверхностного электрического потенциала // Бюл. СО РАМН. 2010. Т. 30, № 03. С. 105–112.
28. Хлусов И.А., Пичугин В.Ф., Гостищев Э.А., Шаркеев Ю.П., Сурменев Р.А., Сурменова М.А., Легостаева Е.В., Чайкина М.В., Дворниченко М.В., Морозова Н.С. Влияние физических, химических и биологических манипуляций на поверхностный потенциал кальцийфосфатных покрытий на металлических подложках // Бюл. сиб. медицины. 2011. Т. 10, № 3. С. 72–81.
29. Хлусов И.А., Саприна Т.В., Нечаев К.А., Дворниченко М.В., Шевцова Н.М., Зайцев К.В., Попков А.В. Морфофункциональные особенности культуры мононуклеарных клеток крови у больных несовершенным остеогенезом: клинико-диагностическое наблюдение // Бюл. сиб. медицины. 2010. Т. 9, № 6. С. 71–79.
30. Silience D.O., Senn A., Danks D.M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta // J. Med. Genet. 1979. V. 16. P. 101–116.
31. Prockop D.J., Kivirikko K. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy // Ann. Rev. Biochem., 1995. V. 64. P. 403–434.
32. Лучинин В.В. Наноиндустрия и «человеческий капитал» // Наноиндустрия. 2007. № 6. С. 2–8.
33. Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu., Khlusov I.A., Kashin O.A. The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured titanium-calcium-phosphate coating // Composite Interfaces. 2009. V. 16. P. 535–546.

Поступила в редакцию 27.06.13 г.

Утверждена к печати 09.10.2013 г.

Дворниченко Марина Владимировна (✉) – канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии, доцент кафедры морфологии и общей патологии СибГМУ (г. Томск).

✉ Дворниченко Марина Владимировна тел. 8-913-826-6800; e-mail: dochic@yandex.ru

AN ESTIMATION OF FREQUENCY AND SPECTRUM OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN PATIENTS WITH CONNECTIVE TISSUE DYSPLASIA IN CONDITIONS OF BLOOD CELLS CONTACT WITH NANOSTRUCTURED MATERIALS

Dvornichenko M.V.

Scientific Educational Center “Biocompatible Materials and Bioengineering” at Tomsk Polytechnic University, Siberian State Medical University, Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch of Russia Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

In order to evaluate cytogenetic effect of nanocomposite materials used in traumatology and orthopedics an investigation of chromosomal aberration ins in the culture of lymphocytes short-term contacted with artificial material (nanostructured titanium samples of implants bearing bilateral calcium phosphate coating) in patients with dysplasia of connective tissue (DCT) and osteogenesis imperfecta (OI) has been conducted. A reduction of percent of aberrant cells having single or/and paired chromosomal breaks as compared with spontaneous mutagenesis (without model samples) was revealed under introduced biocompatible composites into blood cell cultures of patients with DCT or OI. Analysis of frequency and spectrum of chromosomal aberrations in blood cells can be considered as potential prognostic criterion and a predictor of implant's efficacy in the surgical treatment of DCT and OI complications.

KEY WORDS: single and paired chromosomal breaks, lymphocytes culture, *in vitro*, dysplasia of connective tissue, nanostructured titanium, calcium phosphate coating.

Bulletin of Siberian Medicine, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 175–181

References

- Gmshinskij I.V., Smirnova V.V., Khotimchenko S.A. *Nanotechnologies in Russia*, 2010, vol. 5, no. 9–10, pp. 6–10 (in Russian).
- Shlyakhto E.V. *Nanotechnologies in biology and medicine*. St. Petersburg, 2009. 320 p. (in Russian).
- Andreev G.B., Minashkin V.M., Nevsky I.A., Putilov A.V.

- Russian Journal of General Chemistry*, 2008, vol. LII, no. 5, pp. 32–38 (in Russian).
4. Fedotov A.Yu. *Porous composite materials. Phosphate calcium ceramics – biopolymer for regeneration of bone tissue*. Author. dis. cand. technical sci. Moscow, 2010. 26 p. (in Russian).
 5. Barinov S.M. *Bioceramics on the basis of phosphates of calcium*. Moscow, Science Publ., 2005. 204 p. (in Russian).
 6. Grechnikov F.V., Sosnina T.N. *Proceedings of Samara Scientific Center of RAS*, 2007, vol.9, no. 3, pp. 562–569 (in Russian).
 7. Gorbunova V.N., Kadurina T.I., Belonog O.L., Arsenyev V.G., Shabalov N.P. *The Russian Bulletin of Children's Surgery, Anesthesiology and Resuscitation*, 2011, no. 1, pp. 110–113 (in Russian).
 8. Churilina A.V., Moskalyuk O.N. *The Health of the Child*, 2006, vol. 1, no. 1. URL: <http://www.mif-ua.com/archive/article/240> (in Russian).
 9. Prodanchuk N.G., Balan G.M. *Modern Problems of Toxicology*, 2009, no. 3–4, pp. 4–20 (in Russian).
 10. Katlinsky A.V. *A course of lectures on biotechnology*. Moscow, Moscow Medical Academy named after I.M. Sechenov, 2005. 152 p. (in Russian).
 11. Methodological problems of study and assessment of bio- and nanotechnologies (nanowaves, particles, structures, processes, bioobjects) in human ecology and environmental hygiene. Glushkova A.V., Radilov A.S., Rembovsky V.R. *Nanotechnology and nanotoxicology: view on the problem*. Ed. Yu.A. Rakhmanin. Moscow, 2007, pp. 89–91 (in Russian).
 12. *Safety evaluation of nanomaterials Methodical recommendations*. Moscow, 2007 (in Russian).
 13. Heinlaan M., Ivask A., Blinov I., Dubourguier H.-Ch., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 2008, vol. 71, iss. 7, pp. 1308–1316.
 14. Lewinski N., Colvin V., Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small-journal*, 2008, vol. 4, no. 1, pp. 26–49.
 15. Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J., Jha A.N. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.*, 2008, vol. 640, pp. 113–122.
 16. Zhang Y., Chen W., Zhang J., Liu J., Chen G., Pope C. *In vitro* and *in vivo* toxicity of CdTe nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2007, vol. 7, pp. 497–503.
 17. Zhu Y., Zhao Q., Li Y., Cai X., Li W. The interaction and toxicity of multi-walled carbon nanotubes with *Stylonychia mytilus*. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, vol. 6, pp. 1357–1364.
 18. Chan W.H., Shiao N.H., Lu P.Z. CdSe quantum dots induce apoptosis in human neuroblastoma cells via mitochondrial-dependent pathways and inhibition of survival signals. *Toxicol. Lett.*, 2006, vol. 167, pp. 191–200.
 19. Zhu L., Chang D.W., Dai L., Hong Y. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano. Lett.*, 2007, vol. 7, pp. 3592–3597.
 20. Asanov A.Yu., Demikova N.S., Morozov S.A. *Fundamentals of genetics and hereditary malformations in children*. Moscow, Academy Publ., 2003. 224 p. (in Russian).
 21. Bochkov N.P. *Clinical genetics*. Moscow, GEOTAR-MED Publ., 2002. 448 p. (in Russian).
 22. Lazyuk G.I., Kirillova I.A., Kravtsova G.I., Kruchinsky G.V. *Teratology of person*. Moscow, Medicine Publ., 1991. 480 p. (in Russian).
 23. Kuleshov N.P., Mutovin G.R., Barceva O.B., Ataeva Dzh.M. *Medical Scientific and Educational-Methodical Journal*, 2007, no. 37, pp. 66–85 (in Russian).
 24. Pikalova L.V. *Molecular Biology*, 2007, vol. 9. URL: www.medline.ru (in Russian)
 25. Ingel F. *Ecological genetics*, 2006, vol. V, no. 3, pp. 7–19 (in Russian).
 26. Freshni R.Ya. *Culture of animal cells Binom*. Laboratory of knowledge 2010. 706 p. (in Russian).
 27. Karlov A.V., Khlusov I.A., Zaitsev K.V., Dvornichenko M.V., Bol'basov E.N., Chaikina M.V., Aronov D., Rosenman G. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2010, vol. 30, no. 3, pp. 105–112 (in Russian).
 28. Khlusov I.A., Pichugin V.F., Gostischev E.A., Sharkeyev Yu.P., Surmenev R.A., Surmeneva M.A., Legostayeva Ye.V., Chaikina M.V., Dvornichenko M.V., Morozova N.S. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 72–81 (in Russian).
 29. Khlusov I.A., Saprina T.V., Nechayev K.A., Dvornichenko M.V., Shevtsova N.M., Zaytsev K.V., Popkov A.V. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2010, vol. 9, no. 6, pp. 71–79 (in Russian).
 30. Sillence D.O., Senn A., Danks D.M. Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.*, 1979, vol. 16, pp. 101–116.
 31. Prockop D.J., Kivirikko K. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, vol. 64, pp. 403–434.
 32. Luchinin V.V. *Nanoindustry*, 2007, no. 6, pp. 2–815 (in Russian).
 33. Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Eroshenko A.Yu., Khlusov I.A. and Kashin O.A. The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured titanium-calcium-phosphate coating. *Composite Interfaces*, 2009, vol. 16, pp. 535–546.

Dvornichenko Marina V. (✉), Scientific Educational Center “Biocompatible Materials and Bioengineering” at Tomsk Polytechnic University, Siberian State Medical University, and Institute of Strength Physics and Materials Science of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Dvornichenko Marina V.**, Ph. +7-913-826-6800; e-mail: dochic@yandex.ru