

## ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ ВАНКОМИЦИНА В УСЛОВИЯХ ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ КОСТНОЙ ТКАНИ

Божкова С.А.<sup>1</sup>, Пасатецкая Н.А.<sup>2,3</sup>, Кипенко А.В.<sup>2,3</sup>,  
Пеннийненн В.А.<sup>3</sup>, Полякова Е.М.<sup>1</sup>, Лопатина Е.В.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Р. Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

### Контактная информация:

Лопатина Екатерина Валентиновна  
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»  
Минздрава России  
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,  
Россия, 197341.  
E-mail: evlopatina@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 29.09.2016  
и принята к печати 22.10.2016.

### Резюме

Актуальность: Неуклонный рост числа ортопедических операций, таких как эндопротезирование суставов, реконструктивные операции на крупных костях и суставах, приводит к увеличению количества инфекционных осложнений. Ведущими возбудителями ортопедической инфекции являются представители грамположительных патогенов, а именно *S. aureus* и *S. epidermidis*, одним из наиболее часто применяемых антибиотиков является ванкомицин. Антибиотик ванкомицин широко применяют в составе остеозамещающих материалов, используемых при ортопедических операциях. Механизм действия ванкомицина связан с ингибированием синтеза клеточной стенки бактерий, однако влияние на рост клеток, формирующих костную ткань, изучено слабо.

Цель: исследовать влияние ванкомицина на рост эксплантатов костной ткани в условиях органотипического культивирования.

Материалы и методы: Исследование проводили на 1500 эксплантатах ткани кости 10–12-дневных куриных эмбрионов. Использовали метод органотипической культуры ткани; лазерную сканирующую конфокальную микроскопию, активность щелочной фосфатазы определяли на биохимическом анализаторе.

Результаты исследования: С помощью метода органотипической культуры ткани впервые исследовано влияние препарата на рост и пролиферацию эксплантатов ткани кости. В диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  М до  $10^{-13}$  М ванкомицин направленно регулировал рост эксплантатов костной ткани. Впервые показано, что в высоких концентрациях ( $10^{-4}$  и  $10^{-5}$  М) ванкомицин практически полностью угнетает рост эксплантатов ткани кости.

Заключение: Действие ванкомицина было дозозависимым. В концентрациях  $10^{-10}$ – $10^{-13}$  М ванкомицин обнаружил тропные свойства. Данные, полученные при анализе результатов содержания щелочной фосфатазы в питательной среде экспериментальных чашек Петри, позволяют предположить, что стимулирующее действие ванкомицина в концентрациях  $10^{-10}$ – $10^{-13}$  М реализуется за счет активации процессов роста и пролиферации клеток предшественников остеокластов и остеобластов.

**Ключевые слова:** ванкомицин, органотипическая культура ткани, эксплантаты костной ткани.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2016; 3(5): 122–128.

# THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VANCOMYCIN ON THE BONE EXPLANTS GROWTH IN ORGANOTYPIC TISSUE CULTURE

Bozhkova S. A.<sup>1</sup>, Pasatetckaia N.A.<sup>2,3</sup>, Kipenko A.V.<sup>2,3</sup>, Penniyaynen V.A.<sup>3</sup>, Polyakova E.M.<sup>1</sup>, Lopatina E.V.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Vreden Russian research Institute of traumatology and orthopedics, Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Federal Almazov North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

## Corresponding author:

Ekaterina V. Lopatina  
Federal Almazov North-West Medical Research Centre  
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia, 197341  
E-mail: evlopatina@yandex.ru

Received 29 September 2016; accepted 22 October 2016.

## Abstract

**Background:** Leading causative agents of the prosthetic joint infections are the gram-positive pathogens, namely *S. aureus* and *S. epidermidis*, one of the most commonly used antibiotics is vancomycin. Vancomycin is often added to osteogenesis materials for eradication of the causative agents of orthopedic infections. The action mechanism of vancomycin is associated with inhibition of synthesis of the bacterial cell wall, however, the effect on the growth of cells that form bone is poorly studied.

**Objective:** The investigation of the vancomycin effect on the bone explants growth in organotypic tissue culture.

**Design and methods:** Studies were performed on 1500 bone tissue explants of the 10- to 12- day- old chicken embryos. For the first time, the effect of the drug on the growth and proliferation of bone tissue explants was studied using the method of organotypic tissue culture, confocal laser scanning microscopy and determination of alkaline phosphatase activity by biochemical analysis.

**Results:** It was shown that at high concentrations ( $10^{-4}$  and  $10^{-5}$  M) vancomycin is almost completely inhibits the growth of bone tissue explants. Trophotropic effect of the drug is found in concentrations of  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  M.

**Conclusion:** The effect of vancomycin was dose-dependent. It was found the trophotropic properties of the vancomycin in concentrations of  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  M. The data obtained from the results of analysis of alkaline phosphatase activity suggest that the stimulatory effect of vancomycin at concentrations  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  M was based on activation of the growth process and osteoclast proliferation and osteoblast precursor cells.

**Key words:** vancomycin, organotypic tissue culture, bone tissue explants.

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (5):.122–128.*

## Список сокращений

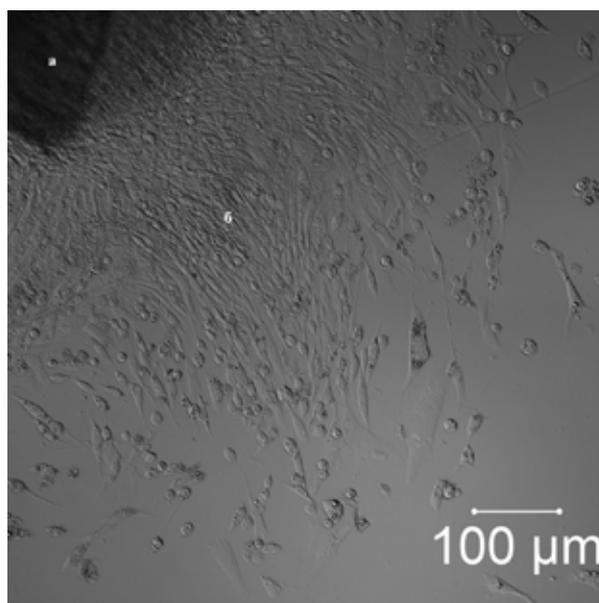
Индекс площади — ИП

## Введение

Неуклонный рост числа ортопедических операций, таких как эндопротезирование суставов, реконструктивные операции на крупных костях и су-

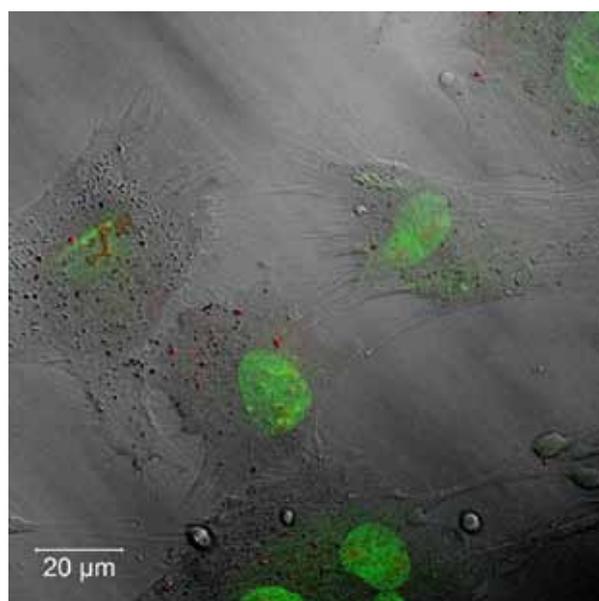
ставах, приводит к увеличению количества инфекционных осложнений. В ходе лечения ортопедических инфекций для замещения дефектов костной ткани после санации инфекционного очага часто используют комбинации остеозамещающих материалов и антибактериальных препаратов. Эффективность локального использования антибиотиков

**Рисунок 1. Микрофотография эксплантата ткани кости 10–12-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. 20). Контроль. Проходящий свет. Плас-ДИК контраст**



а — центральная зона.  
б — зона роста.

**Рисунок 2. Фрагмент зоны роста эксплантата ткани кости 10–12-дневного куриного эмбриона. 3-и сутки культивирования (ув. 100). Контроль. Окраска акридиновым оранжевым**



в составе костного цемента на основе полиметилметакрилата (ПММА) при замещении костных дефектов у пациентов с остеомиелитом и перипротезной инфекцией считается общепризнанной [1, 2]. В связи с тем, что ведущими возбудителями ортопедической инфекции являются представители грамположительных патогенов, а именно *S.aureus* и *S.epidermidis* [3], одним из наиболее часто применяемых антибиотиков является ванкомицин.

Ванкомицин — природный антибиотик группы трициклических гликопептидов. Применяется в медицинской практике с 1958 г. для лечения тяжелых

инфекционных осложнений, вызванных грамположительными микроорганизмами: *Staphylococci* (включая MRSA, MRSE) и *Enterococci*, резистентными к другим антимикробным препаратам. Ванкомицин образует комплекс с ацил-D-аланин-D-аланином мукопептида клеточной стенки бактерий, ингибирует ее формирование и повышает проницаемость, нарушает синтез РНК [4]. Влияние препарата на рост и пролиферацию клеток ткани кости изучено слабо.

Цель работы: исследовать влияние ванкомицина на рост эксплантатов костной ткани в условиях органотипического культивирования.

### Материалы и методы

Исследование проводили на 1500 эксплантатах ткани кости 10-12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри на подложках из коллагена в питательной среде в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе («Sanyo», Япония) в течение 3-х суток при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Препаровку осуществляли инструментами для микрохирургии глаза. Фрагменты бедренной кости, очищенные от надкостницы, аккуратно переносили на коллагеновую подложку чашек Петри. Каждая чашка содержала от 15 до 20 эксплантатов.

Питательная среда содержала 45% раствора Хенкса, 40% среды Игла с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), глюкозы (0,6%), глутамина (2мМ), гентамицина, 5% куриного эмбрионального экстракта и 10% фетальной сыворотки коровы [5]. Через 3-е суток культивирования вокруг исходной зоны формируется зона роста (рис. 1,2).

Контрольные эксплантаты культивировали в питательной среде стандартного состава. В культуральную среду экспериментальных чашек добавляли ванкомицин в широком диапазоне концентраций (от  $10^{-4}$  М до  $10^{-13}$  М). Для визуализации объектов использовали микроскоп «AxioStar Plus» («Carl Zeiss», Германия) по методу, описанному ранее [6]. Полученные изображения анализировали при помощи программы ImageJ. Часть эксплантатов окрашивали витальным красителем акридиновым оранжевым («Sigma») и исследовали с помощью лазерного сканирующего микроскопа «LSM 710» («Carl Zeiss», Германия). В части исследований для улучшения визуализации исследуемые эксплантаты культивировали в чашках  $\mu$ -Dish (IBIDI, Германия), дно которых выполнено с тонкой вставкой из оптически чистого пластика, имеющего коэффициент оптического преломления, соответствующий стеклу и иммерсионному маслу. Последнее позволяло использовать объектив  $\times 100$  (рис.2). Для количественной оценки степени роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение общей площади эксплантата к площади центральной зоны. Контрольное значение ИП принимали за 100%.

Щелочная фосфатаза является одним из ферментов, присутствующим в большинстве тканей человека, в том числе и костной, локализуясь преимущественно в остеобластах, и является их маркером. Высокая активность фермента определяется в молодых остеобластах и формирующемся органическом матриксе [7]. Активность щелочной фосфатазы определяли на биохимическом анализаторе Roche Cobas INTEGRA-800, (Roche Inc., США) тестовыми системами того же производителя.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 8.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

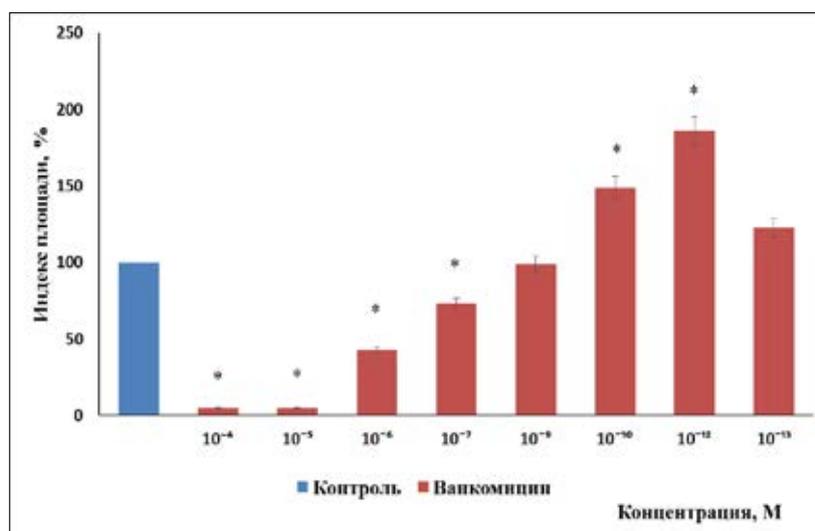
В опытах *in vitro* установлено, что в условиях органотипического культивирования высокие концентрации ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$ М) ванкомицина практически полностью блокируют рост эксплантатов костной ткани. Снижение дозы препарата до  $10^{-6}$  М и  $10^{-7}$  М также приводило к значимому угнетению ( $p < 0,05$ ) роста экспериментальных эксплантатов на 57% и 27% соответственно (рис.3). В ходе исследования обнаружена максимальная эффективная стимулирующая концентрация препарата, которая составила  $10^{-12}$  М. ИП экспериментальных эксплантатов через 3-е суток культивирования в питательной среде, содержащей ванкомицин в указанной дозировке, был выше контрольного значения на 86% ( $p < 0,05$ ). Введение в питательную среду ванкомицина в концентрациях  $10^{-10}$  М и  $10^{-13}$  М стимулировало рост эксплантатов ткани кости на 49% и 23% соответственно ( $p < 0,05$ ). Таким образом, впервые обнаружено трофотропное действие препарата в диапазоне концентраций от  $10^{-10}$  М до  $10^{-13}$  М.

Активность щелочной фосфатазы в питательной среде оценивали после культивирования контрольных и экспериментальных эксплантатов костной ткани. Активность щелочной фосфатазы в питательной среде контрольных и экспериментальных чашек Петри достоверно не различалась. Однако концентрация фермента в питательной среде после инкубирования экспериментальных эксплантатов с ванкомицином в концентрациях  $10^{-10}$ - $10^{-13}$ М была несколько выше контрольных значений.

Выполненное исследование позволило установить дозозависимый эффект ванкомицина на рост эксплантатов ткани кости (рис.3). Увеличение концентрации препарата выше  $10^{-10}$  М вызывало значимое снижение индекса площади и некоторое снижение активности щелочной фосфатазы. Данные, полученные при анализе результатов содержания щелочной фосфатазы в питательной среде экспериментальных чашек Петри, позволяют предположить, что стимулирующее действие ванкомицина в концентрациях  $10^{-10}$ - $10^{-13}$ М реализуется за счет активации процессов роста и пролиферации клеток предшественников остеокластов и остеобластов.

В 1996 г. Edin с соавторами в работе по изучению влияния на культуру остеобластов различных концентраций ванкомицина (от 0 до 10 000 мкг/мл) показали, что препарат в концентрации менее 1000 мкг/мл не влияет или влияет незначительно на пролиферацию остеобластов, а в кон-

**Рисунок 3. Влияние ванкомицина на рост эксплантатов ткани кости 10–12-дневных куриных эмбрионов**



\* — Достоверные различия относительно контроля,  $p < 0,05$ .

центрации 10 000 мкг/мл вызывает гибель клеток [8]. В 2011 г. Rathbone C.R. et al. [9] исследовали влияние большого перечня антибиотиков в концентрациях от 0 до 5 000 мкг/мл на количество остеобластов и активность щелочной фосфатазы. Авторы установили, что наибольшие повреждения вызывали рифампицин, миноциклин, доксициклин, пенициллин, цiproфлоксацин, колистин и гентамицин: они значительно снижали количество остеобластов в культуре и активность щелочной фосфатазы уже при концентрации препарата 200 мкг/мл. Такие антибиотики как ванкомицин, тобрамицин и амикацин продемонстрировали наименьшую токсичность. Авторы вышеупомянутых работ использовали концентрации, которые значительно превышают исследованные нами в данной работе.

Метод органотипического культивирования ткани, применяемый в данном исследовании, является адекватной моделью для оценки трофотропных свойств биологически активных веществ и воздействий. Преимуществом органотипической культуры является возможность оценить влияние фармакологических и иных агентов на развитие клеточного сообщества, составляющего определенную ткань, в строго контролируемых условиях физиологического эксперимента. Необходимо отметить, что в условиях органотипического культивирования сохраняется цитоархитектоника, присущая исследуемой ткани в условиях *in vivo* и связи между клетками, формирующими определенную ткань [6]. Поэтому применение органных культур при изучении фармакологической активности лекарственных препаратов позволяет получить более многогранный результат,

чем исследования на клеточных линиях. Эмбриональный период онтогенеза характеризуется высокой чувствительностью к воздействиям различного рода. Для сопоставления результатов мы проанализировали и пересчитали использованные нами концентрации ванкомицина. Оказалось, что максимальная исследованная нами концентрация составила 145 мкг/мл ( $10^{-4}$  М). В этой дозе препарат практически полностью угнетал рост эксплантатов костной ткани (рис.3). То есть нами обнаружены существенные различия в чувствительности к ванкомицину между клеточными линиями остеобластов и клеточным сообществом, формирующим костную ткань в условиях органотипического культивирования.

Известно, что максимальная антибактериальная активность ПММА-спейсера, содержащего антимикробный препарат, сохраняется первые 24–96 часов после операции [10,11]. Необходимо помнить о том, что высвобождение малого количества антибактериального препарата из остеозамещающих материалов не позволяет достичь его эффективных концентраций в зоне оперативного вмешательства [12,13] и способствует хронизации инфекционного процесса и селекции резистентных штаммов возбудителей.

Таким образом, несмотря на широкое применение в клинической практике антибиотиков в составе остеозамещающих материалов, сложно сохранить баланс между концентрацией, эффективной в отношении возбудителей и безопасной для процесса остеогенеза. В связи с этим представляется необходимым дальнейшее исследование особенностей остеогенеза в присутствии различных концентраций антибиотиков.

### Заключение

Действие ванкомицина было дозозависимым. В концентрациях  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  М ванкомицин обнаружил тропотропные свойства. Данные, полученные при анализе результатов содержания щелочной фосфатазы в питательной среде экспериментальных чашек Петри, позволяют предположить, что стимулирующее действие ванкомицина в концентрациях  $10^{-10}$ - $10^{-13}$  М реализуется за счет активации процессов роста и пролиферации клеток предшественников остеокластов и остеобластов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-00831. Часть исследований выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Список литературы / References

1. Heard GS. PMMA bead versus parenteral treatment of *S. aureus* osteomyelitis. J American Medical Association. 1997; 87:153–164.
2. Langlais F. Can we improve the results of revision arthroplasty for infected total hip replacement? J Bone Joint Surg Br. 2003; 85:637–640.
3. Bozhkova SA, Tikhilov RM, Krasnova MV et al. Orthopedic implant-associated infection: the main etiological agents, local resistance and antimicrobial therapy recommendations. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*=Traumatology and Orthopedics of Russia. 2013; 4:5-15. In Russian [Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., и др. Ортопедическая имплантат-ассоциированная инфекция: ведущие возбудители, локальная резистентность и рекомендации по антибактериальной терапии. Травматология и ортопедия России. 2013; 4:5–15].
4. Rubinstein E, Keynan Y. Vancomycin revisited—60 years later. *Frontiers in public health*. 2014; 2: 217.
5. Lopatina EV, Penniyainen VA, Zaika AA. Regulatory role of Na,K-ATPase in the growth of heart tissue explants in organotypic culture. *Bull Exp Biol Med*. 2005; 140:150-153. In Russian [Лопатина Е.В., Пеннийайнен В.А., Зайка А.А. Исследование участия Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре. Бюллетень эксперим. биологии и медицины. 2005; 140:150–153].
6. Lopatina EV, Kipenko AV, Penniyaynen VA et al. The using of the method of reconstruction of optical cross sections for investigation of the trophotropic effects of adrenaline and atenolol. *Russ. fiziol. jurnal im. I.M. Sechenova*=Russian journal of physiology. 2015; 101:1022-1031. In Russian [Лопатина Е. В., Кипенко А.В., Пеннийайнен В.А., и др. Использование метода реконструкции оптических срезов для оценки тропотропных эффектов

адреналина и атенолола. *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101:1022–1031].

7. Runova NB, Durnovo EA, Kazakov AV. Criteries of the regeneration intensity in bone jaw's tissue during treatment of inflammatory destructive processes. *Stomatologiya*=Stomatology. 2010; 2:32. In Russian [Рунова Н.Б., Дурново Е.А., Казаков А.В. Критерии интенсивности процессов регенерации костной ткани челюстей при лечении воспалительно-деструктивных процессов. *Стоматология*. 2010; 2:32].

8. Edin M, Miclau TP, Lester GE et al. Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clin. Orthop*. 1996; 333:245–251.

9. Rathbone CR, Cross JD, Brown KV et al. Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. *J. Orthop. Res*. 2011; 29: 1070–1074.

10. Konev VA, Bozhkova SA, Netylko GI et al. Results of the fosfomycin application for the impregnation of bone replacement materials in the treatment of chronic osteomyelitis. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*=Traumatology and Orthopedics of Russia. 2016; 22:43-56. In Russian [Конев В.А., Божкова С.А., Нетелько Г.И., и др. Результаты применения фосфомицина для импрегнации остеозамещающих материалов при лечении хронического остеомиелита. *Травматология и ортопедия России*. 2016; 22:43–56].

11. Uskoković V. Nanostructured platforms for the sustained and local delivery of antibiotics in the treatment of osteomyelitis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. 2015; 32:1–59.

12. Neut DA, Kluin OS, Crielaard BJ et al. Biodegradable antibiotic delivery system based on poly-(trimethylene carbonate) for the treatment of osteomyelitis. *Acta Orthop*. 2009; 5:514–519.

13. Tunney MM, Dunne N, Einarsson G et al. Biofilm formation by bacteria isolated from retrieved failed prosthetic hip implants in an in vitro model of hip arthroplasty antibiotic prophylaxis. *J. Orthop Res*. 2007; 25:2–10.

### Информация об авторах:

Божкова Светлана Анатольевна, кандидат медицинских наук, заведующая научным отделением профилактики и лечения раневой инфекции и отделением клинической фармакологии ФГБУ «РНИИТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России;

Пасатецкая Наталья Анатольевна, младший научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Кипенко Анна Викторовна, старший научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, кандидат биологических наук;

Пеннийайнен Валентина Альбертовна, старший научный сотрудник лаборатории физиологии возбудимых мембран ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, кандидат биологических наук;

Полякова Екатерина Михайловна, старший научный сотрудник отделения профилактики и лечения раневой

инфекции ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава России, кандидат биологических наук;

Лопатина Екатерина Валентиновна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

**Author information:**

Svetlana A. Bozhkova, MD, PhD, Head of the research Department of prevention and treatment of wound infection and Department of clinical pharmacology of Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics;

Natalia A. Pasatetskaya, junior researcher at the Department of Experimental Physiology and Pharmacology Federal Almazov North-Weat Medical Research Centre;

Anna V. Kipenko, PhD, senior Researcher the Department of Experimental Physiology and Pharmacology Federal Almazov North-Weat Medical Research Centre;

Valentina A. Penniyaynen, PhD, senior researcher the Laboratory of the physiology excitable membranes Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences;

Ekaterina M. Polyakova, PhD, senior researcher of prevention and treatment of wound infection of Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics;

Ekaterina V. Lopatina, Doctor of Biological Sciences, leading researcher the Department of Experimental Physiology and Pharmacology Federal Almazov North-Weat Medical Research Centre.