

Оценка ответа острой фазы при экспериментальном остеосинтезе имплантатами с биоинертным покрытием нитридами сверхтвердых металлов

И.Ф. Ахтямов, Ф.В. Шакирова*, Л.Д. Зубаирова, Э.Б. Гатина, Э.И. Алиев

The assessment of acute phase response for experimental osteosynthesis using implants with bioinert coating of superhard metal nitrides

I.F. Akhtiamov, F.V. Shakirova*, L.D. Zubairova, E.B. Gatina, E.I. Aliev

Казанский государственный медицинский университет (ректор – профессор А.С. Созинов)

*Казанская государственная академия ветеринарной медицины (ректор – профессор Г.Ф. Кабиров)

Цель. Сравнительное изучение изменений в составе крови у экспериментальных животных при использовании имплантатов из медицинской стали и медицинской стали с покрытием нитридами титана и гафния. **Материалы и методы.** Проведено сравнительное исследование влияния покрытия нитридами титана и гафния на состояние крови кролика в эксперименте. Группой сравнения послужили животные с проведенной остеоклазией и последующим остеосинтезом спицей из биоинертной медицинской стали. **Результаты.** В опытной группе животных такие маркеры ответа острой фазы как уровень СРБ, СОЭ, относительный рост количества гранулоцитов в крови нормализовались в более короткие сроки, чем в группе сравнения. Послеоперационное воспаление, обеспечивающее системную и локальную регуляцию гуморальных и клеточных механизмов, вовлеченных в восстановление поврежденной костной ткани, не сопровождается осложнениями при имплантации стали с покрытием нитридами титана и гафния. **Заключение.** Проведенное исследование выявило, что реактивная фаза после остеотомии и остеосинтеза носит краткосрочный характер, а ее проявления несколько менее выражены при использовании имплантатов из стали с покрытием нитридами титана и гафния по сравнению с имплантацией биоинертной медицинской стали.

Ключевые слова: эксперимент, кролики, большеберцовая кость, остеотомия, остеосинтез, спица, нанопокрывтие, кровь, С-реактивный белок, СОЭ, гемоглобин, лейкоциты, эритроциты.

Purpose. Comparative studying the changes in blood composition of experimental animals when using the implants of medical steel and medical steel with coating of titanium and hafnium nitrides. **Materials and Methods.** The comparative study of the effect of titanium and hafnium nitride coating on the rabbit blood condition experimentally. The animals undergone osteoclasia and further osteosynthesis with a wire of bioinert medical steel served as a comparison group. **Results.** In the experimental group of animals such acute phase markers of response as the level of C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), relative growth of granulocyte number in blood normalized in shorter periods than in the comparison group. The postoperative inflammation providing systemic and local regulation of humoral and cellular mechanisms involved in restoration of the damaged bone tissue not accompanied by complications in case of implanting steel with titanium and hafnium nitride coating. **Conclusion.** The study revealed that the reactive phase after osteotomy and osteosynthesis was of short-term character, and its manifestations were somewhat less marked in case of using implants of steel with titanium and hafnium nitride coating comparing with implantation using bioinert medical steel.

Keywords: experiment, rabbits, tibia, osteotomy, osteosynthesis, wire, nano-coating, blood, C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate (ESR), hemoglobin, leukocytes, erythrocytes.

Использование медицинских имплантатов возрастает с каждым десятилетием в связи с увеличением ожидаемой продолжительности жизни, изменением образа жизни и улучшением технологии их производства [1]. Механические и биологические свойства имплантов должны быть оптимальными для формирования быстрой и прочной связи с окружающей тканью. Взаимодействие между устройством и окружающими тканями имеет важное значение для успеха или неудачи имплантации, в этой связи покрытие фиксаторов или других погружаемых в организм человека конструкций должно обеспечивать поверхностную твердость, устойчивость к коррозии,

низкий коэффициент трения, износостойкость. При разработке новых покрытий имплантатов с улучшенной функциональностью должна учитываться биологическая толерантность [2]. Наряду с достаточно широко используемым покрытием нитридами титана, разработана технология покрытия имплантатов нитридами гафния, однако исследования этого вида покрытий единичны [3, 4, 9].

Целью исследования явилось сравнительное изучение изменений в составе крови у экспериментальных животных при использовании имплантатов из медицинской стали и медицинской стали с покрытием нитридами титана и гафния.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведение эксперимента, содержание, уход проводились согласно требованиям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (1986). Исследования были проведены на 30 кроликах обоего пола в возрасте 6–7 месяцев с массой тела $2526,5 \pm 74,4$ г.

Всем животным проводили открытую остеотомию большой берцовой кости в области средней и нижней трети диафиза с последующим ретроградным введением имплантата в костномозговой канал. В группе сравнения (15 животных) вводились спицы из медицинской стали

12Х18Н9Т, $d \times 2$ мм, в опытной группе (15 животных) – спицы из медицинской стали 12Х18Н9Т с биоинертным покрытием нитридами титана и гафния, $d \times 2$ мм. Для покрытия использован способ ионно-плазменного нанесения с электроннодуговым испарением (КИБ). Поскольку толщина покрытия в пределах 10–3 мкм, то оно может быть отнесено к разряду нанопокровтий.

Взятие крови осуществляли венепункцией до операции, на 1-е, 5-е, 10-е, 20-е, 30-е и 60-е сутки после оперативного вмешательства, определяя уровень С-реактивного белка (СРБ) с использованием полуколичественного теста на основе латекс-агглютинации

фирмы «HUMAN» (Германия). У каждого животного на этапах исследования (до оперативного вмешательства, на 1-е, 10-е, 20-е, 30-е, 60-е сутки) оценены скорость оседания эритроцитов (СОЭ), общее количество

лейкоцитов и лейкоформула, уровень гемоглобина и количество эритроцитов стандартными методами.

Статистическую обработку проводили с применением пакета SPSSv.13.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнительном анализе результатов исследований системного ответа на применение имплантатов из медицинской стали (группа сравнения) и имплантатов с биоинертным покрытием нитридами титана и гафния (опытная группа) выявлено повышение уровня СРБ в обеих группах, начиная с первых суток, достигавшее достоверной разницы с дооперационными значениями на пятые сутки (табл. 1). Показатель в группе сравнения превысил исходный уровень в 9,6 раза ($p=0,001$), а в опытной группе реакция была ниже, и уровень СРБ превысил дооперационный лишь в 4,9 раза ($p=0,004$). Динамика СРБ также различалась: на 10 сутки после вмешательства показатель характеризовался снижением, более выраженным в опытной группе по сравнению с группой сравнения, и составил 3,3 и 4 раза по сравнению с изначальным соответственно. Незначительный рост показателя сохранялся в группе сравнения до 30 суток, а к 60 суткам отмечено его достоверное ($p=0,003$) снижение, причем абсолютные значения СРБ остались выше исходных показателей в 1,3 раза. В опытной группе, начиная с 20 суток, отмечалось динамичное снижение концентрации СРБ, что свидетельствует о менее выраженной реакции животных на применение имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния. В целом, выявленная динамика уровня СРБ полностью согласуется с данными других авторов, также отмечающих повышение СРБ в ранний период после ортопедического вмешательства [5, 6].

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) достоверно возрастала на следующие сутки после оперативного вмешательства в обеих группах. В группе сравнения этот показатель достоверно превышал предоперационный уровень в 3,7 раза ($p=0,024$), а в опытной группе в 4,7 раза ($p=0,022$). В последующие сроки значения показателя СОЭ постепенно снижались и на 10 сутки в обеих группах превышали исходные данные лишь в 2,3 раза.

На 30 сутки показатель опытной группы снизился ещё до уровня в 1,7 раза, в то время как в группе сравнения не менялся. К окончанию срока наблюдения показатель скорости оседания эритроцитов в обеих группах сравнялся с исходными величинами до вмешательства (табл. 2).

Практически полное совпадение динамики уровня СРБ и СОЭ после остеотомии и остеосинтеза позволяет рассматривать их в патогенетической взаимосвязи, поскольку известно, что диспротеинемия, развивающаяся за счет роста уровня острофазных глобулинов, сопровождается ускорением СОЭ.

Количество лейкоцитов в периферической крови экспериментальных животных на протяжении всего опыта достоверно не изменялось, незначительные колебания не выходили за пределы физиологической нормы. В то же время, происходило изменение состава лейкоцитов.

Отмечалось повышение количества палочкоядерных нейтрофилов на первые сутки в группе сравнения в 2,2 раза, а в опытной достоверно в 2,4 раза ($p=0,024$) по отношению к предоперационным показателям. В дальнейшем на протяжении эксперимента в группе сравнения сохранялась тенденция к повышенному уровню палочкоядерных нейтрофилов, а в опытной группе показатель нормализовался и уже с 10-х суток достоверно не отличался от исходных значений.

Характер изменения сегментоядерных нейтрофилов в обеих группах определялся резким достоверным ($p=0,001$) повышением на первые сутки в 1,7 раза. В последующие сроки эти показатели в обеих группах стабильно снижались: на 10 сутки в группе сравнения в 1,4 раза ($p=0,028$), а в опытной в 1,8 раза ($p=0,001$); на 30 сутки в группе сравнения в 1,6 раза ($p=0,003$), а опытной группе в 1,7 раза ($p=0,001$); на 60 сутки в опытной группе в 2,3 раза ($p=0,001$), а в группе сравнения в 1,8 раза ($p=0,013$).

Таблица 1

Изменение концентрации СРБ в сыворотке крови (мг/л)

	До операции	1 сутки	5 сутки	10сутки	20сутки	30 сутки	60 сутки
Группа сравнения	17,6±3,1	128,0±14,6***	169,6±24,6***	72,0±14,1###	74,0±21,2##	84,6±20,4#	41,4±14,8##
Опытная группа	22,9±6,5	94,4±17,1**	113,1±25,9**	59,6±12,7	70,8±22,6	50,4±12,5	16,8±2,9

Обозначения. Достоверные различия с дооперационными значениями: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ *** – $p<0,001$; достоверные различия с показателями 5-х суток: # – $p<0,05$, ## – $p<0,01$, ### – $p<0,001$.

Таблица 2

Морфологические показатели крови

	Количество эритроцитов (10 ¹² /л)		Количество гемоглобина (г/%)		Скорость оседания эри- троцитов (мм/ч)		Количество лейкоцитов (10 ⁹ /л)	
Норма	5 – 8		10,0 – 17,0				5 – 12,5	
Группа	опытная	сравнения	опытная	сравнения	опытная	сравнения	опытная	сравнения
До операции	4,30±0,15	4,77±0,16	12,1±0,4	12,9±0,3	1,16±0,1	1,1±0,11	5,15±0,30	4,66±0,27
1-е сутки	4,13±0,21	4,22±0,16	11,5±0,6	11,5±0,6	5,7±1,37*	4,06±0,91*	5,87±0,49	5,44±0,46
10-е сутки	4,43±0,40	4,41±0,20	11,7±0,6	11,5±0,3	2,84±1,37	2,56±0,72	5,69±0,56	6,26±0,78
30-е сутки	4,56±0,27	4,43±0,14	10,4±0,9	11,0±0,8	1,65±0,4	2,55±0,88	5,05±0,71	4,91±0,40
60-е сутки	3,46±0,48	4,17±0,19	12,2±0,8	11,8±0,8	1,3±0,3	0,9±0,1	6,16±0,65	7,30±0,81

Обозначения. Достоверные различия с дооперационными значениями: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$ *** – $p<0,001$.

Количество лимфоцитов на первые сутки было достоверно ниже дооперационных значений в группе сравнения на 31 % ($p=0,001$), в опытной группе на 36 % ($p=0,001$). В последующие сроки показатели достоверно увеличивались по сравнению с первыми сутками после оперативного вмешательства. В группе сравнения на 10 сутки 22 % ($p=0,021$), на 30 сутки 25 % ($p=0,019$), на 60 сутки увеличение составило 27 % ($p=0,042$). В опытной группе на 10 сутки увеличение составило 36 % ($p=0,001$), на 30 сутки 35 % ($p=0,001$), а на 60 – соответственно 42 % ($p=0,001$).

Количество моноцитов в группе сравнения снижалось к 10 суткам после вмешательства. Последующий рост восстановил уровень до начального к 30-м суткам. В опытной группе наблюдалось достоверное и стабильное снижение количества моноцитов с первых до 30 суток ($p=0,021$).

Остеотомия и введение инородного материала в костную ткань сопровождается стадийным ответом, включающим реактивную воспалительную фазу и развитие грануляций, занимающую дни; репаративную фазу, длящуюся неделями, и фазу ремоделирования костной ткани продолжительностью до нескольких месяцев или лет [7]. Наблюдаемые нами изменения состава лейкоцитов

в виде относительного возрастания гранулоцитарной фракции в первые дни после оперативного вмешательства, сменяющиеся относительным ростом мононуклеаров, отражают смену клеточных фаз в динамике острого воспалительного ответа (табл. 3).

Отдельного обсуждения, на наш взгляд, заслуживает снижение содержания моноцитов в опытной группе в течение первого месяца наблюдения.

Одним из объяснений может быть мобилизация из кровотока клеток моноцитарно/макрофагальной линии в зону репарации и ремоделирования кости, где они являются предшественниками остеокластов [8].

Достоверного изменения количества эозинофилов и базофилов в ходе эксперимента не наблюдалось, что может быть косвенным свидетельством отсутствия гиперэргической реакции на материалы имплантатов.

Незначительные колебания концентрации гемоглобина в периферической крови у животных обеих групп на протяжении всего эксперимента находились в пределах физиологической нормы для данного вида животных. Мы также не наблюдали статистически значимых изменений количества эритроцитов на протяжении эксперимента. То есть оперативное вмешательство и имплантация не сопровождалась развитием анемии (см. табл. 2).

Таблица 3

Показатели лейкоцитарной формулы

	Палочкоядерные		Сегментоядерные		Лимфоциты		Моноциты		Эозинофилы		Базофилы	
Норма	2-10%		20-75%		30-85%		1-4%		1-4%		1-7%	
Группа	опытная	сравнения	опытная	сравнения	опытная	сравнения	опытная	сравнения	опытная	сравнения	опытная	сравнения
До операции	3,3±0,7	2,7±0,4	26,7±2,0	23,9±2,5	65,6±2,4	69,7±2,7	1,7±0,3	1,3±0,3	1,6±0,5	1,3±0,3	1,1±0,4	1,0±0,3
1-е сутки	8,0±1,0*	6,1±1,1	44,1±2,2***	40,6±2,5***	43,5±2,5***	48,7±2,8***	1,2±0,2	1,2±0,2	2,2±0,3	2,7±0,4	1,1±0,2	0,7±0,3
10-е сутки	5,3±1,2	5,1±1,2	24,2±1,9~	29,3±2,9~	67,0±2,1~	62,4±3,3~	0,7±0,2**	0,6±0,2	1,7±0,4	1,8±0,4	1,2±0,4	0,9±0,4
30-е сутки	7,8±1,5	7,3±2,0	24,0±2,5~	24,8±3,3~	66,0±3,9~	64,2±4,4~	0,6±0,2*	1,3±0,3	1,2±0,2	1,4±0,3	0,4±0,2	1,0±0,3
60-е сутки	4,0±1,5	7,0±2,0	18,4±3,6~	23,2±2,5~	74,4±4,2~	66,6±3,3~	1,2±0,4	1,6±0,4	2,0±0,4	1,2±0,5	0,0±0,0	0,4±0,2

Обозначения. Достоверные различия с дооперационными значениями: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$; достоверные различия с показателями 1-х суток ~ – $p<0,05$ ~ – $p<0,01$, ~ – $p<0,001$.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенное исследование выявило, что реактивная фаза после остеотомии и остеосинтеза носит краткосрочный характер, а ее проявления несколько менее выражены при использовании имплантатов из медицинской стали с биоинертным покрытием нитридами титана и гафния по сравнению с имплантацией спиц из медицинской стали без покрытия. В опытной группе животных такие маркеры ответа острой фазы как уровень СРБ, СОЭ, относительный рост количества гранулоцитов в крови нормализова-

лись в более короткие сроки, чем в группе сравнения. В наших экспериментах мы не наблюдали патологических сдвигов со стороны эозинофильных и базофильных гранулоцитов, а также клеток «красной крови». То есть послеоперационное воспаление, обеспечивающее системную и локальную регуляцию гуморальных и клеточных механизмов, вовлеченных в восстановление поврежденной костной ткани, не сопровождается осложнениями при имплантации стали с покрытием нитридами титана и гафния.

ЛИТЕРАТУРА

- Barrère F., Mahmood T.A., de Groot K., Van Blitterswijk C.A. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions // Mater. Sci. Eng. Rep. 2008. Vol. 59. P. 38–71.
Barrère F, Mahmood TA, de Groot K, Van Blitterswijk CA. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions. Mater Sci Eng Rep. 2008;59:38-71.
- Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang, D.T. Foreign body reaction to biomaterials // Semin. Immunol. 2008. Vol. 20, No 2. P. 86-100.
Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol. 2008;20(2):86-100.
- Chen Y., Laha T., Balani K., Agarwal A. Nanomechanical properties of hafnium nitride coating // Scripta Materialia. 2008. Vol. 58. P. 1121-1124.
Chen Y, Laha T, Balani K, Agarwal A. Nanomechanical properties of hafnium nitride coating. Scripta Materialia. 2008;58:1121-1124.
- Абдуллин И.Ш., Миронов М.М., Гаринова Г.И. Бактерицидные и биологически стойкие покрытия для медицинских имплантатов и инструментов // Мед. техника. 2004. № 4. С. 20-22.
Abdullin ISh, Mironov MM, Garipova GI. Bakteritsidnye i biologicheski stoikiye pokrytiia dlia meditsinskikh implantatov i instrumentov [Bactericidal and biologically resistant coatings for medical implants and instruments]. Med. tekhnika. 2004;(4):20-22.
- Orrego L.M., Pérez C.M., Pérez Y.M., Cheyre E.J., Mardones P.R. Plasma C reactive protein in elective orthopedic surgery // Rev. Med. Chil. 2005. Vol. 133, No 11. P. 1341-1348.

- Orrego LM, Pérez CM, Pérez YM, Cheyre EJ, Mardones PR. Plasma C reactive protein in elective orthopedic surgery. *Rev Med Chil.* 2005;133(11):1341-1348.
6. Lee D.Y., Cho T.J., Lee H.R., Park M.S., Yoo W.J., Chung C.Y., Choi I.H.. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man // *Bone.* 2010. Vol. 46, No 3. P. 673-679.
Lee DY, Cho TJ, Lee HR, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. Bone. 2010;46(3):673-679.
7. Einhorn T.A. One of nature's best kept secrets // *J. Bone Miner. Res.* 1998. Vol. 13, No 1. P. 10-12.
Einhorn TA. One of nature's best kept secrets. J Bone Miner Res. 1998;13(1):10-12.
8. Roodman G.D. Cell biology of the osteoclast // *Exp. Hematol.* 1999. Vol. 27, No 8. P. 1229-1241.
Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. Exp Hematol. 1999;27(8):1229-1241.
9. Сравнительное изучение ряда сывороточных маркеров при экспериментальном остеосинтезе имплантатами с покрытием нитридами титана и гафния / И.Ф. Ахтямов, Ф.В. Шакирова, Э.Б. Гатина, Л.Д. Зубаирова, Э. И. Алиев // *Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова.* 2013. № 2. С. 60-64.
Akhtramov IF, Shakirova FV, Gatina EB, Zubairova LD, Aliev EI. Sravnitel'noe izuchenie riada syvorochnykh markerov pri eksperimental'nom osteosintezе implantatami s pokrytiem nitridami titana i gafniia [Comparative study of some serum markers in experimental osteosynthesis using implants with titanium and hafnium nitride coating]. Vestn Travmatol. Ortop. im. NN. Priorova. 2013;(2):60-64.

Рукопись поступила 22.08.2013.

Сведения об авторах:

1. Ахтямов Ильдар Фуатович – Казанский государственный медицинский университет, заведующий кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний, профессор, д. м. н.; e-mail: yalta60@mail.ru.
2. Шакирова Фаина Владимировна – Казанская государственная академия ветеринарной медицины, доцент кафедры ветеринарной хирургии, д. м. н.; e-mail: shakirova-fv@yandex.ru.
3. Зубаирова Ляйли Дилияверовна – Казанский государственный медицинский университет, профессор кафедры патологической физиологии, д. м. н.; e-mail: zubairovalaily@gmail.com.
4. Гатина Эльмира Биктемировна – Казанский государственный медицинский университет, соискатель кафедры травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний, к. м. н.; e-mail: abdullin@mail.ru.
5. Алиев Эльчин Ильяс-оглы – Казанский государственный медицинский университет, соискатель кафедры травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний; e-mail: alelil@mail.ru.