

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

ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана», Казань, РФ

На 30 кроликах в возрасте 6–7 мес проведено моделирование интрамедуллярного остеосинтеза перелома большой берцовой кости. В опытной группе использовали спицы из медицинской стали с покрытием смесью нитридов титана и гафния, в группе сравнения — спицы без покрытия. Оценивая реакцию организма путем сравнительного изучения ряда биохимических показателей крови, содержания фосфора и кальция, авторы пришли к выводу, что использование имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния, обладающих высокой прочностью, термической и химической стабильностью, не сопровождается развитием дополнительных реактивных изменений в организме экспериментальных животных по сравнению с имплантатами из медицинской стали. Это подтверждает перспективность использования нанотехнологичных покрытий имплантатов биоинертным сочетанием нитридов титана и гафния для профилактики возможной индивидуальной непереносимости материалов, из которых изготавливаются имплантаты.

Ключевые слова: имплантаты, биоинертное покрытие, нитриды титана и гафния.

Comparative Study of Certain Serum Markers in Experimental Osteosynthesis Using Implants with Titanium Nitride and Hafnium Coating

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

Simulation of intramedullary osteosynthesis was performed at experimental tibia fracture in 30 rabbits, 6–7 months aged. In main group pins from medical steel coated by mixture of titanium nitride and hafnium were used, in comparative group pins without coating were used. Comparative study of certain biochemical blood indices, P and Ca content was performed. It was shown that application of implants coated by titanium nitride and hafnium that possessed high firmness and chemical stability did not cause additional reactive changes in experimental animals as compared with implants of medical steel. It confirmed the prospects of bioinert titanium nitride and hafnium coated nanotechnologic implants application for prevention of possible individual intolerance of metals.

Key words: implants, bioinert coating, titanium nitride, hafnium.

Одними из основных проблем травматологии и ортопедии являются высокая частота и тяжесть инфекционных осложнений. Во многом это обусловлено качеством используемых имплантатов и в первую очередь материала, из которых они изготовлены. Металлоз — состояние, с которым неизбежно сталкивается каждый травматолог. Реакция организма на материалы, используемые в современных конструкциях, подчас зависит от индивидуальной непереносимости пациента, а возможность «изолировать» их друг от друга дает шанс избежать развития грозных осложнений.

Вариантом решения проблемы получения нового поколения имплантатов является нанесение на их поверхность нерезорбируемых покрытий. В настоящее время в этом качестве используются покрытия на основе нитридов титана. Они биосовместимы, обеспечивают низкий коэффициент тре-

ния и адекватную остеоинтеграцию [1]. Потенциально перспективными представляются также покрытия, содержащие нитрид гафния, который характеризуется химической инертностью, низкой окисляемостью в экстремальных условиях [2], а также биологической совместимостью с тканями организма [3, 4]), однако исследования этого вида покрытий единичны. Особый интерес представляют нанотехнологические покрытия фиксаторов смесью нитридов титана и гафния, поскольку положительные свойства каждого из них позволяют достичь высокого суммарного результата в профилактике развития возможной непереносимости металла вообще и инфекционных осложнений в частности.

Целью исследования явилось сравнительное изучение реактивных изменений в организме экспериментальных животных при использовании

имплантатов из медицинской стали и стали с покрытием смесью нитридов титана и гафния.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 30 кроликах обоего пола в возрасте 6–7 мес с массой тела $2526,5 \pm 74,4$ г. Животным выполняли открытую остеотомию большой берцовой кости в области средней трети диафиза с последующим интрамедуллярным введением имплантата в костномозговой канал. Операцию осуществляли под общей анестезией (rometar 2% 0,15–0,2 мл/кг, золетил 100 10–15 мг/кг). В опытной группе интрамедуллярный остеосинтез произведен спицей из медицинской стали 12Х18Н9Т с покрытием нитридов титана и гафния диаметром 2 мм, в группе сравнения — аналогичной спицей из медицинской стали 12Х18Н9Т, но без покрытия. В послеоперационном периоде осуществлялась внешняя иммобилизация оперированной конечности гипсовой повязкой на срок до 10 сут.

Забор крови осуществляли методом венепункции v. saphena lateralis до операции, на 1, 5, 10, 20, 30 и 60-е сутки после вмешательства. В сыворотке крови определяли маркеры костного метаболизма: общую активность щелочной фосфатазы (ЩФ) (кинетический колометрический метод с применением тест-системы ALP DGKC; «Audit Difgnostics», Ирландия), уровни кальция (фотометрический метод) и фосфора (спектрометрический метод), а также маркеры потенциальной гепатотоксичности: уровень глюкозы (оксидазный тест с использованием тест-системы GLUC – PAP; «Randox», Великобритания), общего белка (биуретовый метод; «Randox», Великобритания), аланинаминотрансферазы (АЛАТ), аспарагинаминотрансферазы (АсАТ).

Эксперимент, содержание, уход соответствовали требованиям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (1986).

Статистическую обработку проводили с применением пакета SPSSv.13.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень общей ЩФ сыворотки снижался в обеих группах животных. Однако с 5-х суток динамика активности фермента в группах заметно отличалась (табл. 1). В группе сравнения показатель ЩФ имел тенденцию к снижению на всех сроках наблюдения, достигнув минимального значения на 20-е сутки. В то же время у животных опытной группы динамика снижения активности ЩФ была менее выраженной, а ее уровень стал сопоставимым с таковым в группе сравнения только на 60-е сутки. На этом сроке показатели ЩФ значительно отличались от дооперационных значений, однако статистическую достоверность различий установить не удалось, так как количество обследованных животных было различным. Полученные результаты согласуются с данными [5], зарегистрировавшими снижение активности костной фракции ЩФ у собак, начиная с 1-й и вплоть до 4-й недели после экспериментальной остеотомии и остеосинтеза. Более того, согласно данным К. Akesson и соавт. [6], в динамике костного метаболизма в рамках ремоделирования ткани после остеотомии процессы естественной резорбции преобладают в первые месяцы, а уровни маркеров восстановления костной ткани, в том числе ЩФ и остеокальцина, возрастают лишь к 4–7-му месяцу после начала эксперимента. В целом процесс формирования костной ткани по данным этих авторов возвращается к исходным значениям в течение года.

Уровень кальция в сыворотке крови возрастал в обеих группах животных, однако в группе сравнения динамика данного показателя характеризовалась лишь тенденцией к повышению на всех сроках наблюдения. В опытной группе уровень кальция на 10-е сутки достоверно превышал исходные показатели на 12% ($p=0,004$), а на 60-е сутки — на 15% ($p=0,015$). Эти результаты согласуются с описанной выше логикой костного ремоделирования после оперативного вмешательства.

Ремоделирование, т.е. сопряженные во времени процессы локальной резорбции и формирования кости посредством базисной мультиклеточ-

Табл. 1. Показатели концентрации ЩФ, кальция, фосфора в сыворотке крови в динамике

Срок исследования	ЩФ (100–700), Ед/л		Кальций (1,4–3,1) мМ/л		Фосфор (0,81–1,13) мМ/л	
	опытная группа	группа сравнения	опытная группа	группа сравнения	опытная группа	группа сравнения
До операции	270,95±27,81	249,96±40,80	2,90±0,15	3,10±0,08	1,63±0,08	1,67±0,10
1-е сутки	235,35±27,79	217,79±29,71	3,10±0,04	3,16±0,05	1,48±0,06	1,42±0,05
5-е сутки	166,16±18,56*	146,36±18,63	3,22±0,04*	3,29±0,05	1,53±0,05	1,51±0,06
10-е сутки	175,94±19,23	138,44±22,02	3,22±0,04*	3,29±0,05**	1,58±0,07	1,54±0,07
20-е сутки	179,88±24,90	122,77±18,27	3,14±0,03	3,18±0,04	1,54±0,07	1,57±0,08
30-е сутки	180,56±24,10	125,52±23,38	3,22±0,06	3,17±0,06	1,54±0,05	1,52±0,06
60-е сутки	136,27±15,87	142,41±21,62	3,41±0,08*	3,25±0,10	1,54±0,10	1,40±0,14

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 в скобках указан показатель нормы для кроликов. Достоверность различий с дооперационными значениями: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

ной единицы (БМЕ), образованной остеокластами, остеобластами, активными мезенхимальными клетками и капиллярными петлями, функционирует для поддержания скелетного баланса. В основе ремоделирования лежит взаимное влияние всех клеток БМЕ посредством локальных сигналов факторов роста и других цитокинов. Активация остеокластов в ходе резорбции кости сопровождается освобождением кальция во внеклеточное пространство.

Единого мнения относительно продолжительности периода усиленной резорбции в период адаптивной перестройки костной ткани нет. Отмечается, в частности, что повышенная резорбция и гиперкальциемия после перелома бедра может наблюдаться с 1-й недели и продолжаться до 3 мес [7]. В экспериментах на кроликах показано, что после экспериментальной остеотомии процесс формирования костной ткани занимает не менее 12 нед [8].

В ходе исследования не было выявлено достоверно значимых различий концентрации фосфора в сыворотке крови между экспериментальными группами (см. табл. 1). Значения этого показателя не отличались от дооперационного уровня и колебались в пределах статистической погрешности.

Результаты исследования маркеров возможного гепатотоксического эффекта имплантированных материалов не выявили признаков гепатодепрессии или цитолиза.

При сравнительном анализе установлено (табл. 2), что на следующий день после вмешательства концентрация глюкозы в сыворотке крови в обеих группах имела тенденцию к повышению: в группе сравнения на 2%, а в опытной — на 13%. Достоверные колебания уровня глюкозы в течение всего периода наблюдения отмечены в опытной группе и характеризовались его снижением на 10-е сутки по сравнению с 1-ми на 36% ($p=0,001$), на 60-е сутки — на 28% ($p=0,030$). В группе сравнения достоверные различия уровня глюкозы относительно дооперационных значений зарегистрированы на 60-е сутки ($p=0,020$). Наблюдаемая динамика не приводила к снижению уровня глюкозы, а лишь нормализовала его.

Незначительные, не выходявшие за границы физиологических значений для данного вида животных колебания уровня глюкозы являются, по видимому, следствием послеоперационного стресса.

Как известно, в ходе ответа на повреждение клетки скелетной мускулатуры, печени, жировой ткани становятся резистентными к инсулину. Развитие этой устойчивости в свою очередь связано с сопутствующим стрессу выбросом в системную циркуляцию контринсулярных гормонов и противовоспалительных цитокинов [9]. После оперативных вмешательств наиболее существенное значение в запуске стрессовой гипергликемии имеют провоспалительные цитокины [10]. При механической травме причиной гипергликемии может также являться повышение продукции глюкозы в печени, а не нарушение ее утилизации тканями.

Абсолютные значения уровня общего белка в ходе эксперимента в обеих группах животных не выходили за пределы физиологической нормы (см. табл. 2). Некоторые различия наблюдались лишь в динамике исследуемого параметра: в опытной группе показатели общего белка на 20-е ($p=0,024$) и 30-е ($p=0,013$) сутки достоверно превышали исходные на 14 и 15% соответственно, тогда как в группе сравнения концентрация общего белка на 60-е сутки достоверно превысила этот показатель опытной группы на 12% ($p=0,006$).

Остеотомия и остеосинтез сопровождаются развитием естественной защитной воспалительной реакции с заметным возрастанием уровня белков острой фазы, в частности С-реактивного белка (результаты не включены в данную публикацию), что может объяснить наблюдаемое повышением уровня общего белка, который, впрочем, не выходит за границы видовой нормы.

Концентрацию АлАТ и АсАТ (табл. 3) оценивали с точки зрения возможной гепатотоксичности. В обеих группах эксперимента показатели АлАТ оставались в пределах физиологических значений и достоверно от дооперационных значений не отличались. Показатели АсАТ были на нижней границе нормы, еще до операции. Симметричное ко-

Табл. 2. Показатели концентрации глюкозы, белка в сыворотке крови в динамике

Срок исследования	Глюкоза (4,1–8,5), мМ/л		Белок (54–83), г/л	
	опытная группа	группа сравнения	опытная группа	группа сравнения
До операции	6,86±0,28	7,56±0,46	56,42±1,48	61,10±1,82
1-е сутки	7,85±0,19	7,67±0,37	59,17±1,14	60,77±1,32
5-е сутки	7,09±0,24*	6,17±0,63	59,30±0,90	59,33±2,32
10-е сутки	7,39±0,28**	6,95±0,25	62,13±1,37	62,47±1,15
20-е сутки	6,85±0,17	6,45±0,21	64,49±3,56*	64,79±1,37
30-е сутки	7,01±0,42	7,01±0,42	64,96±1,58**	64,72±1,23
60-е сутки	5,75±0,32*#	5,66±0,47*	58,84±0,68	66,23±1,88**

Примечание. Достоверность различий по сравнению с дооперационными значениями — * $p<0,05$ ** $p<0,01$, с показателем 1-х суток — * $p<0,05$, ** $p<0,01$; с показателями 10-х суток — # $p<0,05$; с показателем опытной группы — ** $p<0,05$.

Табл. 3. Показатели концентрации АсАТ, АлАТ в сыворотке крови в динамике

Срок исследования	АсАТ (48–80), Ед/л		АлАТ (14–113), Ед/л	
	опытная группа	группа сравнения	опытная группа	группа сравнения
До операции	45,67±11,96	49,16±8,74	70,74±8,31	82,61±8,17
1-е сутки	28,09±5,60	38,70±3,42	78,65±10,50	78,59±9,45
5-е сутки	15,44±1,89*	30,96±8,43	63,01±6,53	59,18±8,79
10-е сутки	27,87±3,49	32,85±4,22	66,96±5,75	73,57±7,40
20-е сутки	23,10±3,21	18,88±1,39	57,87±6,80	56,16±5,81
30-е сутки	39,03±6,28	36,20±7,65	66,08±3,94	69,51±11,31
60-е сутки	19,45±2,24	26,97±7,74	75,86±8,02	69,70±11,38

Примечание. * — достоверность различий с дооперационными значениями при $p < 0,05$.

личественное падение этого критерия в обеих группах по ходу всего исследования практически в два раза на данном этапе осталось без объяснения. При этом статистическая достоверность изменений показателя была установлена лишь в опытной группе на 5-й день эксперимента. Таким образом, количественный и качественный анализ биохимических показателей крови при использовании нанопокровов имплантатов требует дополнительных исследований.

Остеотомия и остеосинтез имплантатами из медицинской стали и стали с покрытием нитридами титана и гафния сопровождаются локальной перестройкой в костной ткани. Первая фаза ремоделирования кости характеризуется преобладанием активности остеокластов, которые деминерализуют костный матрикс и подготавливают поверхность к адгезии остеобластов. Сывороточными маркерами этой фазы в нашем эксперименте явились понижение активности общей ЩФ и повышение уровня кальция в сыворотке крови. Направления сдвигов этих параметров не различались в опытной группе и группе сравнения, лишь степень повышения уровня кальция была достоверно более выраженной в опытной группе. Для решения вопроса о длительности периода восстановления костной ткани после имплантации необходимо продолжить наблюдение.

За время эксперимента мы не наблюдали существенных системных повреждающих влияний ни оперативного вмешательства, ни использованных для имплантации материалов. Не нарушалась ни глюкостатическая, ни белковосинтетическая функция печени, стабильный уровень рутинных маркерных ферментов АсАТ, АлАТ исключал признаки цитолиза.

ВЫВОДЫ

1. Использование имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния, обладающих высокой прочностью, термической и химической стабильностью, не сопровождается развитием дополнительных реактивных изменений в организме экспериментальных животных по сравнению с имплантатами из медицинской стали.

2. Результаты анализа системного ответа организма по реакции сывороточных маркеров на интрамедуллярный остеосинтез в эксперименте подтверждают перспективность использования нанотехнологичных покрытий имплантатов биоинертным сочетанием нитридов титана и гафния для профилактики возможной индивидуальной непереносимости пациента материалов, из которых изготовлены имплантаты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sovak G., Weiss A., Gotman I. Osseointegration of Ti6Al4V alloy implants coated with titanium nitride by a new method. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2000; 82 (2): 290–6.
2. Yao Chen, Tapas Laha, Kantesh Balani, Arvind Agarwal. Nanomechanical properties of hafnium nitride coating. *Scripta Materialia*. 2008; 58: 1121–4.
3. Абдуллин И.Ш., Миронов М.М., Гарипова Г.И. Бактерицидные и биологически стойкие покрытия для медицинских имплантатов и инструментов. *Медицинская техника*. 2004; 4: 20–2.
4. Ахтямов И.Ф., Гатина Э.Б., Шакирова Ф.В., Кадыров Ф.Ф. и др. Изучение костной ткани и имплантатов с покрытиями из нитридов титана и гафния на остеорегенерацию с использованием рентгенографических исследований. *Вестник Казанского технологического университета*. 2012; 15 (20): 186–7.
5. Paskalev M., Krastev S., Filipov J. Changes in some serum markers after experimental fracture and intramedullary osteosynthesis in dogs. *Trakia J. Sciences*. 2005; 3 (5): 46–50.
6. Akesson K., Käkönen S.M., Josefsson P.O., Karlsson M.K., Obrant K.J., Petersson K. Fracture-induced changes in bone turnover: a potential confounder in the use of biochemical markers in osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 2005; 23 (1): 30–5.
7. Sato Y., Kaji M., Higuchi F., Yanagida I., Oishi K., Oizumi K. Changes in bone and calcium metabolism following hip fracture in elderly patients. *Osteoporos Int.* 2001; 12 (6): 445–9.
8. Tobita K., Ohnishi I., Matsumoto T., Ohashi S., Besho M., Kaneko M., Nakamura K. Measurement of mechanical properties on gap healing in a rabbit osteotomy model until the remodeling stage. *Clin. Biomech. (Bristol, Avon)*. 2012; 27 (1): 99–104.
9. Руднов В.А. Клиническая значимость и возможные пути коррекции гипергликемии при критических состояниях. *Consilium medicum*. 2006; 8 (7): 54–61.

10. Connolly C.C., Steiner K.E., Stevenson R.W., Neal D.W., Williams P.E., Alberti K.G., Cherrington A.D. Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 1991; 261 (4 Pt 1): E466–72.

REFERENCES

1. Sovak G., Weiss A., Gotman I. Osseointegration of Ti6Al4V alloy implants coated with titanium nitride by a new method. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2000; 82 (2): 290–6.
2. Yao Chen, Tapas Laha, Kantesh Balani, Arvind Agarwal. Nanomechanical properties of hafnium nitride coating. *Scripta Materialia*. 2008; 58: 1121–4.
3. Abdulin I.Sh., Mironov M.M., Garipova G.I. Bactericidal and biologically tolerant coatings for medical implants and instruments. *Meditinskaya tekhnika*. 2004; 4: 20–2 (in Russian).
4. Akhtyamov I.F., Gatina E.B., Shakirova F.V., Kadyrov F.F. et al. Study of bone tissue and titanium nitride and hafnium coated implants upon osteoregeneration using radiologic examinations. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2012; 15 (20): 186–7 (in Russian).
5. Paskalev M., Krastev S., Filipov J. Changes in some serum markers after experimental fracture and intramedullary osteosynthesis in dogs. *Trakia J. Sciences*. 2005; 3 (5): 46–50.
6. Akesson K., Käkönen S.M., Josefsson P.O., Karlsson M.K., Obrant K.J., Petersson K. Fracture-induced changes in bone turnover: a potential confounder in the use of biochemical markers in osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.* 2005; 23 (1): 30–5.
7. Sato Y., Kaji M., Higuchi F., Yanagida I., Oishi K., Oizumi K. Changes in bone and calcium metabolism following hip fracture in elderly patients. *Osteoporos Int.* 2001; 12 (6): 445–9.
8. Tobita K., Ohnishi I., Matsumoto T., Ohashi S., Besho M., Kaneko M., Nakamura K. Measurement of mechanical properties on gap healing in a rabbit osteotomy model until the remodeling stage. *Clin. Biomech. (Bristol, Avon)*. 2012; 27 (1): 99–104.
9. Rudnov V.A. Clinical significance and possible means for hyperglycemia correction in critical states. *Consilium medicum*. 2006; 8 (7): 54–61 (in Russian).
10. Connolly C.C., Steiner K.E., Stevenson R.W., Neal D.W., Williams P.E., Alberti K.G., Cherrington A.D. Regulation of lipolysis and ketogenesis by norepinephrine in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 1991; 261 (4 Pt 1): E466–72.

Сведения об авторах: Ахтямов И.Ф. — профессор, доктор мед. наук, зав. кафедрой травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний КГМУ; Шакирова Ф.В. — доктор ветеринарных наук, доцент кафедры ветеринарной хирургии Казанской государственной академии ветеринарной медицины; Зубаирова Л.Д. — доктор мед. наук, профессор кафедры патологической физиологии КГМУ; Гатин Э.Б. — канд. мед. наук, соискатель кафедры травматологии, ортопедии и хирургии экстремальных состояний КГМУ; Алиев Э.И. — соискатель той же кафедры.

Для контактов: Ахтямов Ильдар Фуатович. 420012, Казань, ул. Бутлерова, дом 49, КГМУ. Тел.: +7 (905) 315-01-50. E-mail: yalta60@mail.ru.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статей в редакцию просим обращать особое внимание на правильность представления материала.

Все термины и определения должны быть научно достоверны, их написание (как русское, так и латинское) должно соответствовать «Энциклопедическому словарю медицинских терминов» (в 3-х томах, под ред. акад. Б.В. Петровского).

Лекарственные препараты должны быть приведены только в международных непатентованных названиях, которые употребляются первыми, затем в случае необходимости приводятся несколько торговых названий препаратов, зарегистрированных в России (в соответствии с информационно-поисковой системой «Клифар-Госреестр» [Государственный реестр лекарственных средств]).

Желательно, чтобы написание ферментов соответствовало стандарту Enzyme Classification, названия наследуемых или семейных заболеваний — международной классификации наследуемых состояний у человека (Mendelian Inheritance in Men [<http://ncbi.nlm.nih.gov/Omim>]).

Названия микроорганизмов должны быть выверены в соответствии с «Энциклопедическим словарем медицинских терминов» (в 3 томах, под ред. акад. Б.В. Петровского) или по изданию «Медицинская микробиология» (под ред. В.И. Покровского).

Написание Ф.И.О. авторов, упоминаемых в тексте, должно соответствовать списку литературы.

Помимо общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте. Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании. Не допускаются сокращения простых слов, даже если они часто повторяются.

Дозы лекарственных средств, единицы измерения и другие численные величины должны быть указаны в системе СИ.