

7. Тихилов Р.М., Стойко Ю.М., Зиятин М.Н., Божкова С.А. Профилактика тромбоэмболических осложнений в травматологии и ортопедии: Метод. рекомендации /Под ред. Ю.Л. Шевченко. — М., 2006.
8. Тлеубаева Н.В., Агаджалин В.В., Власова И.В. и др. Особенности гемодинамики нижних конечностей у пациентов с коксартрозом при эндотелиальной дисфункции //Вестн. новых мед. технологий. — 2008. — N 1. — С. 154-156.
9. Ультразвуковая диагностика сосудистых заболеваний /Под ред. В.П. Куликова. — М., 2007. — С. 402-414.
10. Geerts W.H., Bergqvist D., Pineo G.F. et al. Prevention of venous thromboembolism: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. — 8th ed. //Chest. — 2008. — N 133. — P. 381-453.
11. Gerlach R., Raabe A., Beck J. et al. Postoperative nadroparin administration for prophylaxis of thromboembolic events is not associated with an increased risk of hemorrhage after spinal surgery //Eur. Spine J. — 2004. — Vol. 13, N 1. — P. 9-13.
12. Miric A., Lombardi P., Sculco T.P. Deep vein thrombosis prophylaxis: a comprehensive approach for total hip and total knee arthroplasty patient populations //Am. J. Orthop. — 2000. — Vol. 29, N 4. — P. 269-274.
13. Optimizing anticoagulation technology in the hospital setting—safe and cost-effective strategies for thrombosis prophylaxis and treatment: Findings and recommendations of the CLOT (Cost-lowering options for optimizing thromboprophylaxis). Clinical Consensus Panel. — 2006.

Сведения об авторах: Агаджалин В.В. — профессор, доктор мед. наук, директор НКЦ ОЗП; Власова С.В. — канд. мед. наук, врач отделения анестезиологии и реанимации; Сафронов Н.Ф. — зав. отделением анестезиологии и реанимации; Власова И.В. — канд. мед. наук, зав. отделением функциональной диагностики.

Для контактов: Власов Сергей Валерьевич. 652509, Кемеровская область, Ленинск-Кузнецкий, 7-й микрорайон, дом 1, кв. 81. Тел.: (384-56) 9-54 68; (8) 905-914-10-11. E-mail: svlasof@rambler.ru, info@gnkc.kusbass.net

© Коллектив авторов, 2010

ТРИБОХИМИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ ИСКУССТВЕННЫХ СУСТАВОВ. ЧАСТЬ 2. ПРООКИСЛИТЕЛЬНЫЙ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ЧАСТИЦ ИЗНОСА ОРТОПЕДИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

В.Г. Булгаков, В.К. Ильина, Н.С. Гаврюшенко, А.Н. Шальнев, Н.П. Омеляненко

ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова Росмедтехнологий», Москва

В модельной реакции при постоянном возникновении металлических радикалообразующих частиц износа установлена нарастающая интенсификация окислительных процессов. Образующиеся свободные радикалы способны окислять полимерные компоненты эндопротезов. Радикалообразующие частицы износа существенно снижают пролиферативную способность остеогенных клеток человека. Инертные частицы керамики оказывают антипролиферативное действие лишь при высоких концентрациях, механически препятствуя росту остеогенных клеток. Ухудшение механических свойств полимерных компонентов имплантатов и нарушение процессов ремоделирования кости под действием радикалообразующих частиц износа может быть в числе причин последующего расшатывания и нестабильности имплантатов.

Ключевые слова: ортопедические материалы, частицы износа, окисление кумола, полиэтилен, остеогенные клетки, пролиферация.

Tribochemical Component of Oxidative Stress Development when Implantating of Artificial Joints. Part 2. Oxidative and Antiproliferative Effect of Wear Debris of Orthopedic Materials

V.G. Bulgakov, V.K. Il'ina, N.S. Gavryushenko, A.N. Shal'nev, N.P. Omel'yanenko

Using modeling reaction with constant production of metal radical-generated wear debris it was determined increasing intensification of oxidative processes. Generated free radicals enabled to oxidize polymeric component of endoprotheses. Radical-generated wear debris significantly decreased the proliferative ability of human osteogenic cells. Inert ceramics particles showed antiproliferative effect only in their high concentration. Those particles prevented growth of osteogenic cells. Worsening in mechanical properties of polymeric implant components and disturbance of bone remodeling under radical-generated wear debris may be one of the causes of further development of implant loosening and its instability.

Key words: orthopedic materials, wear debris, cumol oxidation, polyethilen, osteogenic cells, proliferation.

Выявление феномена интенсивного образования радикалов частицами износа ортопедических спла-

вов дает основание считать его важным фактором развития окислительного стресса при эндопроте-

зировании суставов [1, 3]. Особая значимость трибохимического механизма образования радикалов определяется тем, что условия для его возникновения и поддержания существуют в течение всего периода присутствия имплантата в организме вследствие постоянного образования при его функционировании активной поверхности износа.

Обладая высокой реакционной способностью, радикальные интермедиаты оказывают выраженное негативное влияние на компоненты имплантата и окружающие ткани. Одним из наиболее неблагоприятных моментов является высокая подверженность остеогенных клеток негативному воздействию радикалов, что существенно ухудшает ремоделирующую способность кости [6]. Ухудшение прочностных и проявление провоспалительных свойств извлекаемых при ревизионных операциях полиэтиленовых компонентов эндопротезов также связывают с наличием в них значительного количества свободных радикалов [10].

Целью настоящей работы было изучение радикалообразующей активности частиц износа ортопедических материалов при последовательном окислении ими углеводорода кумола и при совместном окислении кумола частицами полиэтилена и кобальтового сплава. Изучено также воздействие частиц износа на морфологию культуры остеогенных клеток человека и их пролиферативную способность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методы изготовления частиц износа сплава и керамики, измерения скорости окисления кумола и определения скорости инициирования окисления в присутствии частиц износа описаны нами ранее [1, 3]. Частицы сверхвысокомолекулярного полиэтилена (СВМПЭ) в форме стружки толщиной 0,2–0,3 мм и длиной 0,3–0,5 мм были получены истиранием образца полиэтилена на металлической терке.

Учитывая, что функционирование имплантированных суставов сопровождается непрерывным образованием частиц износа и их накоплением в окружающих тканях, мы провели опыты, модели-

Изменение скорости поглощения кислорода и инициирования его окисления при трехкратном окислении кумола частицами износа кобальтового сплава ($M \pm m$)

Показатель	Спонтанное окисление (без частиц износа)	Окисление частицами износа		
		первое	второе	третье
Скорость поглощения кислорода, мм ³ /мл·мин	1,3±0,3	2,6±0,1	3,9±0,3	4,8±0,2
Скорость инициирования окисления, моль/л·с	1,2·10 ⁻⁹	4,0·10 ⁻⁹	8,6·10 ⁻⁹	13,5·10 ⁻⁹

рующие ситуацию постоянного образования частиц и сопряженные с этим реакции трибохимического окисления. В этих экспериментах использовали частицы износа кобальтового сплава для инициирования последовательного трехкратного окисления кумола при концентрации частиц 0,1 мг/мл. Анализировали скорость поглощения кислорода и рассчитанную по ней скорость инициирования окисления кумола при добавлении частиц. По окончании первого окисления взвесь частиц в кумоле центрифугировали, использованные частицы удаляли. К окисленному кумолу добавляли новые частицы в той же концентрации и вновь определяли начальную скорость поглощения кислорода при повторном окислении. Процедуру центрифугирования и удаления использованных частиц повторяли и, добавляя новые частицы, проводили окисление углеводорода еще раз.

Влияние частиц износа сплава и керамики на пролиферативную способность исследовали на стромальных остеогенных клетках-предшественниках костного мозга человека из собственной коллекции группы клинической генетики ЦИТО [2]. Культуру клеток с добавленными частицами или супернатантом инкубировали при 37 °С в течение 120 ч [5]. После снятия клеток растворами трипси-на и версена (1:1) подсчитывали их количество. Морфологическое исследование живой культуры клеток проводили в инвертированном микроскопе Nikon eclipse Ti.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В представленной таблице сведены данные опытов с трехкратным окислением кумола частицами износа кобальтового сплава. Из нее видно, что каждое последующее окисление кумола протекало с существенно большей скоростью инициирования. В ходе последовательного трехкратного окисления кумола скорость инициирования окисления возросла более чем в 3 и 10 раз по сравнению с таковой при однократном воздействии частиц износа и спонтанном окислении кумола соответственно.

Принимая во внимание негативное действие свободных радикалов на полиэтилен, представлялось интересным определить окислительные свойства комбинации частиц кобальтового сплава и СВМПЭ, смесь которых образуется при функционировании и износе пары трения этих материалов [9]. Как видно на рис. 1, добавление к кумолу частиц СВМПЭ не инициировало окисление углеводорода (прямая 1), что свидетельствует об инертности полимера, тогда как частицы сплава были очень активны (прямая 2). При совместном присутствии в реакционной смеси частиц полиэтилена и кобальтового сплава в соотношении 50:1 (по массе) скорость реакции окисления кумола оставалась на высоком уровне, характерном для частиц сплава (прямая 3). Последующее увеличение содержания частиц полиэтилена практически не влияло на скорость

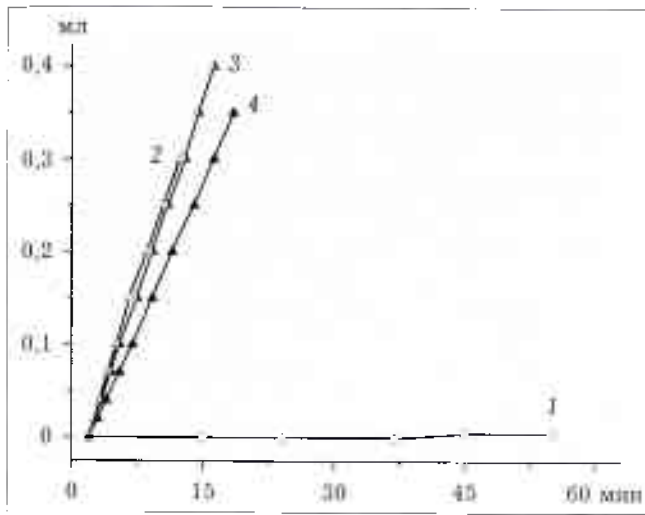


Рис. 1. Окисление кумола в присутствии частиц кобальтового сплава и СВМПЭ.

По оси абсцисс — время (в мин); по оси ординат — поглощение кислорода (в мл).

1 — в присутствии частиц СВМПЭ; 2 — в присутствии частиц кобальтового сплава; 3 — в присутствии частиц СВМПЭ и сплава в соотношении 50:1 (по массе); 4 — в присутствии частиц СВМПЭ и сплава в соотношении 250:1 (по массе).

окисления: даже при значительном преобладании в смеси СВМПЭ (250:1 по массе) наблюдалось лишь незначительное снижение скорости поглощения кислорода и отсутствие периода индукции на кинетической кривой (4).

Из полученных результатов следует, что данная смесь частиц характеризуется выраженными проокислительными свойствами.

В серии опытов было изучено влияние на морфологию культуры остеогенных клеток радикалообразующих частиц кобальтового сплава и инертных частиц керамики. В контрольные и опытные флаконы в культуральную среду помещали по $2 \cdot 10^5$ клеток. В контрольном (без частиц износа) флаконе на 5-й день образовывался равномерный тонкий монослой клеток (экспоненциальная фаза роста). Вытянутые фибробластоподобные клетки имели стандартный для данной культуры ориентированный рост, прозрачную, без включений цитоплазму (рис. 2, а). Что касается влияния частиц керамики, то при концентрации их до 0,1 мг/мл существенного нарушения роста и морфологии клеток не наблюдалось (рис. 2, б). При концентрации 0,5–1 мг/мл и выше частицы керамики покрывали дно культурального флакона и механически препятствовали росту культуры клеток.

Морфологическая картина клеток культуры с добавлением частиц кобальтового сплава резко отличалась от контроля (рис. 3). Монослой клеток к 5-му дню культивирования не сформировался. Определялись фибробластоподобные клетки культуры с короткими отростками цитоплазмы. Основная часть металлических частиц располагалась внутри клеток. Степень деструкции культуры находилась в прямой зависимости от количества металлических частиц в ней.

Количественная оценка влияния радикалообразующих частиц сплава и неактивных в этом плане частиц керамики на пролиферацию остеогенных клеток-предшественников была проведена путем их подсчета в конце срока культивирования (5 сут).

Рис. 2. Культура остеогенных клеток без частиц износа (а) и в присутствии 0,1 мг/мл частиц керамики (б). Ув. 100.

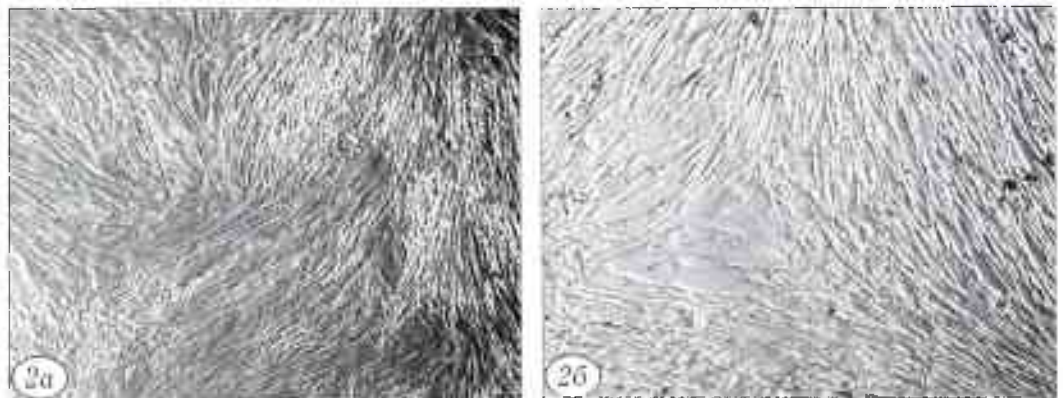
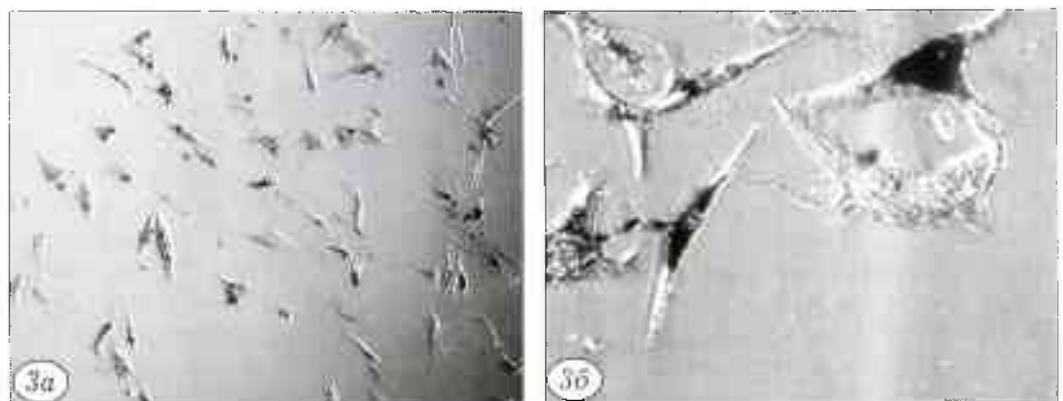


Рис. 3. Культура остеогенных клеток в присутствии частиц износа кобальтового сплава (а — ув. 100; б — ув. 400).



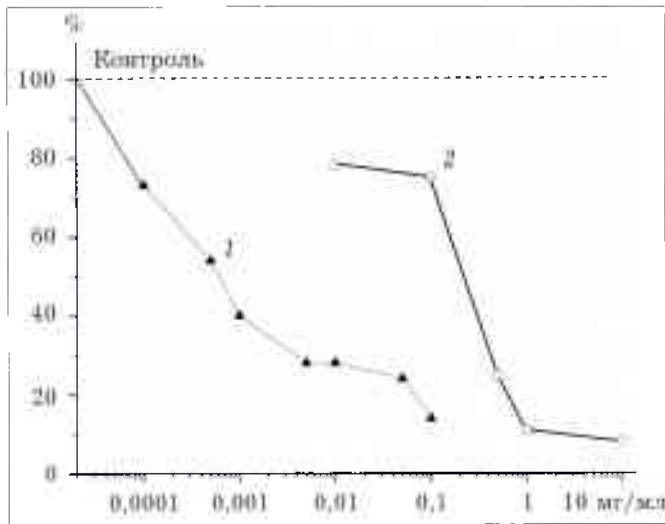


Рис. 4. Влияние различных концентраций частиц кобальтового сплава (1) и керамики (2) на пролиферативную способность остеогенных клеток человека.

По оси абсцисс — концентрация частиц (в мг/мл); по оси ординат — количество клеток (в % от контроля).

В контрольных флаконах через 5 сут культивирования насчитывалось $7,3 \cdot 10^5$ пролиферировавших клеток, что было принято за 100% (рис. 4). В присутствии частиц обоих типов происходило дозозависимое уменьшение количества клеток по сравнению с контролем. Однако негативное действие частиц сплава было значительно более выраженным и проявлялось уже при весьма низких концентрациях. Заметный ингибирующий эффект частиц керамики наблюдается лишь при их высоких концентрациях. В условиях эксперимента IK_{50} (ингибирующая концентрация, при которой количество клеток составляет 50% от контрольного показателя) для частиц кобальтового сплава и керамики равнялся соответственно $7 \cdot 10^{-3}$ и $2 \cdot 10^{-1}$ мг/мл, т.е. различался в 300 раз.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты опытов с многократным окислением кумола указывают на возможность развития самоускоряющейся свободнорадикальной реакции, инициируемой постоянным образованием частиц износа ортопедических сплавов, и способность частиц износа инициировать распад органических перекисей [4]. В экспериментах на животных установлено накопление продуктов перекисного окисления липидов в тканях, окружающих керамические и титановые имплантаты [14], в том числе продуктов окисления ненасыщенной линолевой кислоты, входящей в состав мембранных липидов [17]. Установлено, металлические частицы износа, генерируя образование перекисей липидов, способны также вызывать их распад с появлением свободных радикалов, инициирующих новые цепи окисления.

Известно, что в постимплантационном периоде происходит окислительная деградация полимер-

ных компонентов имплантатов, но точные механизмы этого процесса не выяснены [7]. Вместе с тем показано, что частицы износа полиэтилена и полимерные вкладыши содержат значительное количество ионов и частиц металлов [12, 16]. Как определено в данной работе, смесь частиц износа кобальтового сплава и СВМПЭ даже при значительном преобладании в ней полимера обладает выраженной радикалообразующей способностью. Вполне вероятно, что свежееобразованная поверхность частиц износа и ионы металлов способны инициировать окисление полимерных компонентов искусственных суставов.

В настоящее время подтвержден и изучен фагоцитоз частиц износа остеобластами и установлен цитотоксичный эффект частиц [11]. В опытах с использованием частиц титана выявлено, что их негативное действие на остеобласты обратно пропорционально концентрации частиц, а фагоцитирующие остеобласты выделяют продукты, обладающие цитотоксическим действием в отношении других, интактных остеобластов [15]. Определен также размер наиболее токсичных частиц, изучена временная зависимость их поглощения фагоцитирующими остеобластами, установлено преимущественное накопление частиц в перинуклеарной зоне клеток [13].

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют, что радикалообразующие частицы износа кобальтового сплава подавляют пролиферацию остеогенных клеток значительно сильнее, чем инертные частицы керамики. Подобно этому, сравнительное изучение влияния частиц износа кобальтохромового сплава и корундовой керамики на жизнеспособность культуры гистиоцитов У937 и фибробластов Л929 выявило, что металлические частицы в гораздо большей степени снижают их жизнеспособность, чем керамические [8]. Показано, что в окружающих имплантаты тканях, содержащих металлические частицы износа, процент апоптических клеток (24%) в несколько раз выше, чем в присутствии частиц полиэтилена (2,8%) или керамики (1,5%) [18]. Высказано мнение, что различия в радикалогенерирующей способности разных частиц лежат в основе их различной токсичности и провоспалительной способности [19].

В целом можно заключить, что генерирование свободных радикалов в ряде тканевых реакций и в процессе изнашивания ортопедических сплавов создает условия для самопотенцирования негативных свободнорадикальных реакций при эндопротезировании суставов. Образующиеся свободные радикалы способны оказывать окислительное воздействие на полимерные компоненты эндопротезов, ухудшая их механические свойства и биосовместимость. Радикалообразующие частицы износа существенно снижают пролиферативную способность остеогенных клеток человека. Нарушение вследствие этого процессов ремоделирования кости и резорбция костной ткани остеокластами, сти-

мулированными частицами износа, может быть в числе причин последующей нестабильности имплантатов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Булгаков В.Г., Гаврюшенко Н.С., Цепалов В.Ф. Количественная оценка радикалообразующей способности частиц износа ортопедических сплавов //Перспектив. матер. — 2004. — N 3. — С. 49-54.
2. Булгаков В.Г., Ильина В.К., Гаврюшенко Н.С. и др. Антипролиферативное действие радикалообразующих и инертных частиц износа ортопедических материалов и его ингибирование костным жиром //Перспектив. матер. — 2004. — N 6. — С. 36-42.
3. Булгаков В.Г., Гаврюшенко Н.С., Шальнев А.Н., Цепалов В.Ф. Трибохимический компонент развития окислительного стресса при имплантации искусственных суставов. Часть I. Определение радикалообразующей способности частиц износа различных ортопедических материалов //Вестн. трматол. ортопед. — 2010. — N 1. — С. 44-48.
4. Евмененко Н.П., Гороховатский, Цепалов В.Ф. Исследование кинетики и механизма окисления кумола на окиси хрома //Нефтехимия. — 1971. — Т. 11, N 3. — С. 400-403.
5. Фриденштейн Ф.Я. Клонирование стромальных клеток-предшественников //Методы культивирования клеток. — Л., 1988. — С. 257-265.
6. Ciapetti G., Granchi D., Savarino L. et al. In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells //Biomaterials. — 2002. — Vol. 23, N 2. — P. 617-627.
7. Costa L., Jacobson K., Brucco P., Brach del Prever E.M. Oxidation of orthopaedic UHMWPE //Biomaterials. — 2002. — Vol. 23, N 7. — P. 1613-1624.
8. Germain M.A., Hatton A., Williams S. et al. Comparison of the cytotoxicity of clinically relevant cobalt-chromium and alumina ceramic wear particles in vitro //Biomaterials. — 2003. — Vol. 24, N 3. — P. 469-479.
9. Hirakawa K., Bauer T.W., Stulberg B.N., Wilde A.H. Comparison and quantitation of wear debris of failed total hip and total knee arthroplasty //J. Biomed. Mater. Res. — 1996. — Vol. 31, N 2. — P. 257-263.
10. Jahan M.S., Wang C., Schwartz G., Davidson J.A. Combined chemical and mechanical effects on free radicals in UHMWPE joint during implantation //J. Biomed. Mater. Res. — 1991. — Vol. 25, N 8. — P. 1005-1017.
11. Kwon S.Y., Lin T., Takei H. et al. Alterations in the adhesion behavior of osteoblasts by titanium particle loading: inhibition of cell function and gene expression //Biorheology. — 2001. — Vol. 38, N 2-3. — P. 161-183.
12. Meldrum R.D., Bloebaum R.D., Dorr L.D. Metal ion concentration in retrieved polyethylene total hip inserts and implications for artifactually high readings in tissue //J. Biomed. Mater. Res. — 1993. — Vol. 27, N 11. — P. 1349-1355.
13. O'Connor D.T., Choi M.G., Kwon S.Y., Paul Sung K.L. New insight into the mechanism of hip prosthesis loosening: effect of titanium debris size on osteoblast function //J. Orthop. Res. — 2004. — Vol. 22, N 2. — P. 229-236.
14. Ozmen I., Naziroglu M., Okutan R. Comparative study of antioxidant enzymes in tissues surrounding implant in rabbits //Cell Biochem. Funct. — 2006. — Vol. 24, N 3. — P. 275-281.
15. Pioletti D.P., Takei H., Kwon S.Y. et al. The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts //J. Biomed. Mater. Res. — 1999. — Vol. 46, N 3. — P. 399-407.
16. Raimondi M.T., Vena P., Pietrabissa R. Quantitative evaluation of the prosthetic head damage induce by microscopic third-body particles in total hip replacement //J. Biomed. Mater. Res. — 2001. — Vol. 58, N 4. — P. 436-448.
17. Soloviev A., Schwarz E.M., Darowish M., O'Keefe R.J. Sphingomyelinase mediates macrophage activation by titanium particles independent of phagocytosis: a role for free radicals, NFkappaB, and TNFalpha //J. Orthop. Res. — 2005. — Vol. 23, N 6. — P. 1258-1265.
18. Stea S., Visentin M., Granchi D. et al. Apoptosis in peri-implant tissue //Biomaterials. — 2000. — Vol. 21, N 13. — P. 1393-1398.
19. Zhang Q., Kusaka Y., Sato K. et al. Differences in the extent of inflammation caused by intratracheal exposure to three ultrafine metals: role of free radicals //J. Toxicol. Environ. Health A. — 1998. — Vol. 53, N 6. — P. 423-438.

Сведения об авторах: Булгаков В.Г. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. отдела экспериментальной травматологии и ортопедии ЦИТО; Ильина В.К. — канд. мед. наук, ведущий науч. сотр. лаборатории соединительной ткани с группой клинической генетики ЦИТО; Гаврюшенко Н.С. — профессор, доктор тех. наук, руководитель испытательной лаборатории ЦИТО; Шальнев А.Н. — доктор мед. наук, руководитель отдела экспериментальной травматологии и ортопедии ЦИТО; Омеляненко Н.П. — профессор, доктор мед. наук, руководитель лаборатории соединительной ткани с группой клинической генетики ЦИТО.

Для контактов: Булгаков Валерий Георгиевич. 127299, Москва, ул. Приорова, дом 10, ЦИТО. Тел.: 450-09-38. E-mail: bulgakov_cito@mtu-net.ru

