

ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНЫХ РЕАКТАНТОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ИНТРАМЕДУЛЛЯРНОМ ОСТЕОСИНТЕЗЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ильдар Фуатович Ахтямов^{1,2*}, Фаина Владимировна Шакирова³,
Ляйли Диляверовна Зубаирова¹, Эльмира Биктемировна Гатина^{1,2}, Эльчин Ильяс-оглы Алиев^{1,2}

¹Казанский государственный медицинский университет,

²Республиканская клиническая больница, г. Казань,

³Казанская государственная академия ветеринарной медицины

Реферат

Цель. Оценка динамики белковых фракций плазмы крови как индикатора реакции организма на остеосинтез при использовании имплантатов из медицинской стали и стали с покрытием смесью нитридов титана и гафния.

Методы. На 30 кроликах проведены моделирование перелома диафиза большеберцовой кости и оценка реакции организма животных на остеосинтез спицами из медицинской стали и стали с покрытием нитридами сверхтвёрдых металлов. В качестве индикатора использована динамика изменений белковых фракций сыворотки крови, или реактантов острой фазы воспаления. Исследования проведены до и после остеосинтеза на сроках от 5 до 180 сут.

Результаты. На фоне неизменного уровня общего белка после перенесённой травмы и развития процесса регенерации авторы наблюдали диспротеинемию, свойственную острой фазе воспаления. Характерным явлением стали две «волны» реакции организма. Первая развивалась к 5-м суткам и характеризовалась снижением уровня альбуминов и повышением концентрации α - и β_2 -глобулинов, эта реакция затухала в опытной группе раньше, чем в группе сравнения. Вторая волна вновь формировалась к 180-м суткам и характеризовалась повышением содержания β_2 - и γ -глобулинов. Наблюдаемые сдвиги соответствовали фазам раннего неспецифического ответа, включающего усиление синтеза положительных и снижение образования отрицательных реактантов острой фазы печени под влиянием цитокинов, а также более позднему специфическому адаптивному иммунному ответу.

Вывод. В целом интенсивность реакций в опытной группе была меньше, чем в группе сравнения, что свидетельствует о менее выраженном повреждающем воздействии имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния.

Ключевые слова: интрамедулярный остеосинтез, имплантаты, белки острой фазы воспаления, нитриды сверхтвёрдых металлов.

CHANGE OF ACUTE STAGE REACTANTS LEVEL IN EXPERIMENTAL INTRAMEDULLARY OSTEOSYNTHESIS I.F. Akhtyamov^{1,2}, F.V. Shakirova³, L.D. Zubairova¹, E.B. Gatina^{1,2}, E.I. Aliev^{1,2}. ¹Kazan State Medical University, Kazan, Russia, ²Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia, ³Bauman Kazan State Medical Academy of Veterinary Medicine, Kazan, Russia. **Aim.** To assess the plasma protein fractions as organism's reaction to osteosynthesis by medical devices made of medical steel and of medical steel coated by titanium and hafnium nitrides mixture. **Methods.** Diaphyseal tibial fracture was modeled on 30 rabbits with further assessment of animal organism reaction to osteosynthesis by pins made of medical steel and of medical steel coated by super-hard metal nitrides mixture. The change of blood plasma protein fractions and acute phase reactants was used as an indicator. Measurements were performed before the osteosynthesis and on the 5th and 180th day after the surgery. **Results.** Together with the stable level of total blood protein, dysproteinemia characteristic for acute phase of the inflammation was observed after the trauma and reparatory process induction. Two-waved reaction was registered. The first developed at the 5th day after the surgery and was characterized by the drop of blood albumin level together with α - and β_2 -globulin levels increase, the reaction was observed in the intervention group earlier compared to control group. The second wave developed at the 180th day and was characterized by β_2 - and γ -globulin levels increase. The registered changes corresponded with the phases of acute non-specific response, which includes the overproduction of «positive» and decreased production of «negative» acute phase reactants by liver, influenced by cytokines, as well as later adaptive immune response. **Conclusion.** Overall, the intensity of acute phase reactions was lower in the intervention group, indicating less damage associated with titanium and hafnium nitrides coated implants use.

Keywords: intramedullary osteosynthesis, implants, acute phase reactants, super-hard metal nitrides.

Перелом и последующая репозиция становятся тяжелейшим стрессом для организма. Вся история развития остеосинтеза, начиная от Г. Кунчера и Г.А. Илизарова, была направлена на малую инвазивность, прочность фиксации и функциональность [1]. На протяжении последних 10 лет новое поколение погружного синтеза значительно снизило количество осложнений. В основе успехов лежит содружество травматологов и инженеров. При этом совершенствование как формы, так и принципов фиксации во многом зависит от качества материалов, используемых

для изготовления имплантатов [2]. Их механические и биологические свойства во многом определяют формирование быстрой и прочной связи с окружающей тканью. Как основа, так и покрытие фиксаторов или других погружаемых в организм человека конструкций должны обеспечивать такие физические характеристики, как поверхностная твёрдость, устойчивость к коррозии, низкий коэффициент трения, износостойкость. В то же время существенное значение для успеха или неудачи имплантации имеет взаимодействие между устройством и окружающими тканями, биологическая толерантность [3].

Реактанты (или белки) острой фазы воспа-

Содержание общего белка сыворотки крови (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	63,34±0,94	50,68±5,03	64,51±1,99	65,59±2,08	63,95±2,09	66,23±1,88	70,29±3,64
Опытная	57,12±0,79	56,20±1,04	61,74±1,30	60,21±1,75	61,27±1,09	58,84±0,68	68,80±4,13

ления (РОФ) представляют собой гетерогенную группу из более 30 белков, вовлечённых в защитные и адаптационные реакции при повреждении тканей. Стрессорные факторы, такие как ишемия, воспаление, травма, оперативное вмешательство, инициируют понижение содержания отрицательных РОФ (альбумин) и повышение положительных РОФ (глобулины), причём продолжительность ответа зависит от интенсивности и продолжительности повреждения [4]. РОФ выполняют ингибиторную, медиаторную, транспортную, иммуномодулирующую функции, большинство из них представляют собой многофункциональные белки. Мониторинг их уровня служит признанным маркёром для характеристики патологии у человека и животных [7].

Целью настоящего исследования была оценка динамики белковых фракций плазмы крови как индикатора реакции организма на остеосинтез при использовании имплантатов из медицинской стали и стали с покрытием смесью нитридов титана и гафния.

Проведение эксперимента, содержание животных и уход за ними соответствовали требованиям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (1986). Экспериментальные исследования были проведены согласно ГОСТ ИСО (P) 10 993 (п. 11, 12) и одобрены Локальным этическим комитетом при Казанском государственном медицинском университете (протокол №5 от 25 июня 2013 г.).

Исследования были проведены на 30 кроликах обоего пола в возрасте 6–7 мес с массой тела 2526,5±74,4 г. Кроликов содержали в одинаковых условиях, на одинаковом рационе, согласно рекомендациям по кормлению и содержанию лабораторных животных, а также приказу Минздрава СССР №755 от 12.08.1977.

Всем животным проводили открытую остеотомию большеберцовой кости в области средней и нижней трети диафиза с последующим ретроградным введением имплантата в костномозговой канал. В группе сравнения (15 животных) вводили спицы из медицинской стали 12X18H9T, d×2 мм, в опытной группе (15 животных) – спицы из медицинской стали 12X18H9T с биоинертным покрытием нитридами титана и гафния, d×2 мм. Для покрытия использован способ ионно-плазменного нанесения с электроннодуговым испарением (метод конденсации с ионной бомбардировкой). Поскольку толщина покрытия находилась в пределах 10⁻³ мкм, его можно отнести к разряду нанопокровтий.

Взятие крови осуществляли венепункцией до

операции, на 1-е, 5-е 10-е, 20-е, 30-е, 60-е и 180-е сутки после оперативного вмешательства. Применяли вакуумные пробирки IMPROVE с гелем-активатором свёртывания крови. Разделение белков сыворотки крови проводили методом электрофореза на ацетатцеллюлозе с использованием верналового буферного раствора (pH=8,6).

В послеоперационном периоде нами не было выявлено каких либо осложнений в зоне оперативного вмешательства, что было подтверждено морфологическими исследованиями. Реактивные морфологические преобразования определяли на 10-е, 30-е, 60-е и 180-е сутки течения опыта. Для морфологических исследований проводили изъятие подколенных лимфатических узлов, кожи и подкожной клетчатки, частично мышц в зоне непосредственного контакта со спицей в проксимальном участке большеберцовой кости и в области операционной раны (над зоной перелома). Полученный материал обрабатывается и планируется к публикации в дальнейшем.

За период исследования констатирована гибель трёх животных из группы сравнения на сроках от 160 до 180 сут эксперимента. Было проведено патологоанатомическое исследование. Патологических очагов выявлено не было.

Обработку полученных данных производили с использованием программы «Image Master 1D Gel Analysis v3.0». Статистическую обработку данных проводили с применением пакета программ «SPSS версия 13. Для наглядности использовали построение графических диаграмм статистических величин. Вычисляли среднее арифметическое выборочное значение показателя (M), стандартную ошибку среднего арифметического значения (m) по каждой из сравниваемых величин с определением достоверности различий (p) по методу Стьюдента-Фишера.

Уровень общего белка сыворотки крови в ходе эксперимента в обеих группах животных не выходил за пределы видовой физиологической нормы для кроликов (54–75 г/л, табл. 1).

Выявлено достоверное снижение содержания альбумина (по сравнению с нормой для кроликов – 23,65–38,35 г/л) у животных обеих групп на 5-е сутки после оперативного вмешательства (группа сравнения – p=0,001; опытная группа – p=0,012). Более выраженным оно было в группе сравнения (p=0,002). К 10-м суткам у животных опытной группы значения возвращались к таковым до операции, а у животных группы сравнения это происходило лишь к 30-м суткам (табл. 2).

На 5-е сутки после операции зарегистрировано достоверное повышение содержания

Таблица 2

Содержание альбумина в сыворотке крови (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	43,02±0,61***	23,77±1,46	36,56±0,90***	35,50±0,79***	39,26±1,22***	40,56±0,60***	39,35±3,12***
Опытная	38,87±0,75*	31,34±0,88	37,79±0,94	35,44±2,67	39,92±1,24**	39,27±1,06**	41,59±1,12***

Примечание. Статистическая значимость различий с показателями 5-х суток: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Таблица 3

Содержание α -глобулинов в сыворотке крови (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	4,42±0,17***	9,19±1,09	6,84±0,86	6,94±0,47	5,51±0,47*	5,81±0,56*	4,81±0,01*
Опытная	3,95±0,30***	7,34±0,28	6,49±0,61 ^с	5,05±0,18**	4,93±0,15**	4,49±0,24***	5,30±0,65*

Примечание. Статистическая значимость различий с показателями 5-х суток: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; с показателями 60-х суток: ^сp < 0,05.

Таблица 4

Содержание β_1 -глобулинов в сыворотке крови (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	5,68±0,60	6,60±1,04	8,50±0,61	8,72±1,03	7,26±0,46	7,62±0,84	7,46±0,12
Опытная	5,27±0,21	6,30±0,34	7,60±0,61	7,44±0,59	7,07±0,55	6,23±0,33	6,44±0,67

Таблица 5

Содержание β_2 -глобулинов в сыворотке крови (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	2,48±0,13	3,49±0,47	3,09±0,33	3,12±0,23	2,49±0,23	2,02±0,16*	3,10±0,14
Опытная	1,91±0,11*	3,64±0,39	3,01±0,28	2,46±0,26	2,23±0,24 ^с	1,87±0,25	3,98±0,72

Примечание. Статистическая значимость различий с показателями 5-х суток: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; с показателями 180-х суток: ^сp < 0,05.

α -глобулинов (по сравнению с нормой — 3,44–7,08 г/л) у животных обеих групп, причём в группе сравнения (p=0,001) оно было более выражено. У животных опытной группы уровень α -глобулинов достоверно снижался к 20-м суткам, а в группе сравнения — лишь к 30-м. В состав α -глобулиновой фракции входят такие РОФ, как ингибиторы протеаз α_1 -антитрипсин и α_2 -макроглобулин, антиоксиданты церулоплазмин и гаптоглобин. Каждый из них участвует в ограничении процессов вторичной альтерации на участке повреждения, и повышение их уровня свидетельствует о реализации защитного ответа организма, который в наших экспериментах оказался продолжительнее в группе сравнения (табл. 3).

Фракция β -глобулинов имеет два пика электрофорграммы: β_1 , содержащий преимущественно трансферрин, и β_2 , в состав которого входят β -липопротеины, иммуноглобулин А (IgA), IgM, иногда IgG и белки компонента [6].

В наших экспериментах мы не наблюдали статистически значимого изменения уровня β_1 -глобулинов. Отмечена лишь тенденция к повышению этой фракции на протяжении всего

опыта у животных обеих групп по сравнению со значениями до операции (табл. 4).

Что касается фракции β_2 -глобулинов, то их уровень повышался на 5-е сутки у животных обеих групп. В опытной группе рост был достоверным (p=0,044), и значения вернулись к дооперационным показателям к 60-м суткам (p=0,019). В группе сравнения также была тенденция к повышению содержания β_2 -фракции, но не имевшая статистической значимости (табл. 5).

Характерно, что мы также наблюдали вторую волну подъёма уровня β_2 -глобулинов к 180-м суткам (p=0,01) в обеих группах животных, и вновь она была статистически значима в опытной группе. Этот факт, на наш взгляд, следует рассматривать в связи с динамикой фракции γ -глобулинов, поскольку, как было указано выше, β_2 -глобулины содержат в своем составе IgA, IgM и (частично) IgG.

Уровень γ -глобулинов (норма для кроликов — 7,31–13,57 г/л) достоверно повышался к 180-м суткам в обеих группах (контрольная группа — p=0,0001, опытная группа — p=0,012; табл. 6). Подъём был более выражен в группе сравнения, значи-

Содержание γ -глобулинов (г/л)

Группы животных	До операции	5-е сутки	10-е сутки	20-е сутки	30-е сутки	60-е сутки	180-е сутки
Сравнения	7,61±0,30	7,59±1,46	9,52±0,54	10,83±0,61	8,91±0,48+	9,84±0,64	15,57±0,55***
Опытная	6,96±0,33	7,27±0,26	6,85±0,53	9,77±1,12	7,12±0,39	6,96±0,68	11,49±1,58*

Примечание. Статистическая значимость различий с дооперационными значениями: *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001.

мое различие между животными разных групп наблюдалось на 10-е (p=0,008), 30-е (p=0,02) и 60-е (p=0,015) сутки. Фракция γ -глобулинов содержит преимущественно IgG, и её повышение отражает мобилизацию специфических иммунных защитных механизмов.

ВЫВОДЫ

1. На фоне неизменного уровня общего белка после перенесённой травмы и развития процесса регенерации мы наблюдали характерную для ответа острой фазы диспротеинемию — изменение соотношения белковых фракций крови. Выявлено две «волны» реакции. Первая развивалась к 5-м суткам и характеризовалась снижением уровня альбуминов и повышением содержания α - и β_2 -глобулинов, эта реакция затухала в опытной группе раньше, чем в группе сравнения. Вторая развивалась к 180-м суткам и характеризовалась повышением концентрации β_2 - и γ -глобулинов.

2. Наблюдаемые сдвиги соответствовали фазам раннего неспецифического ответа, включающего усиление синтеза положительных и снижение образования отрицательных реактантов острой фазы воспаления печенью под влиянием цитокинов, а также более позднему специфическому адаптивному иммунному ответу.

3. В целом интенсивность реакций в опытной группе была меньше, чем в группе сравнения. Более продолжительное снижение уровня альбуминов и выраженный рост содержания γ -глобулинов в группе сравнения свидетельствуют о меньшем повреждающем стимуле при использовании имплантатов с покрытием нитридами титана и гафния.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ключевский В.В.* Хирургия повреждений. — Ярославль, Рыбинск, 2004. — 784 с.
2. *Лазарев А.Ф., Солод Э.И., Ахтямов И.Ф.* Рациональный остеосинтез. — Казань: Скрипта, 2010. — 256 с.
3. *Anderson J.M., Rodriguez A., Chang D.T.* Foreign body reaction to biomaterials // *Semin. Immunol.* — 2008. — Vol. 20, N 2. — P. 86–100.
4. *Gabay C., Kushner I.* Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation // *NEJM.* — 1999. — Vol. 340. — P. 448–454.
5. *Gruys E., Toussaint M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J.* Acute phase reaction and acute phase proteins // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* — 2005. — Vol. 6, N 11. — P. 1045–1056.
6. *O'Connell T.X., Horita T.J., Kasravi B.* Understanding and interpreting serum protein electrophoresis // *Am. Fam. Physician.* — 2005. — Vol. 71, N 1. — P. 105–112.
7. *Toussaint M.J.M.* Acute phase protein in different species measured as a tool to assess animal health // *Eur. Coll. Report.* — 2000. — Vol. 1. — P. 1–3.

УДК 612.017.1: 612.084: 616-053.3-053.1-022: 616.9-092.9

E06

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АНТИГЕНОВ *TOXOPLASMA GONDII* В ПРЕНАТАЛЬНОМ И РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДАХ

Татьяна Фёдоровна Соколова, Дмитрий Георгиевич Новиков*, Антон Васильевич Индутный

Омская государственная медицинская академия

Реферат

Цель. Определить особенности иммунного статуса в пренатальном и раннем постнатальном периодах при воздействии антигенов *Toxoplasma Gondii* (*T. gondii*).

Методы. Исследование проводили на потомстве белых крыс линии **Wistar, рождённых от самок, сенсibilизированных** в III триместре беременности корпускулярным антигеном *T. gondii*, — первая группа (n=96), а также на особях, которым данный антиген вводили в возрасте 1 день, — вторая группа (n=103). Группу контроля составили интактные крысы. На 60-е сутки после рождения проводили гематологический анализ, оценивали количество антителообразующих клеток и клеток CD3⁺ у исследуемых животных.

Результаты. Количество нейтрофилов в крови крыс первой группы было в 1,9 раза выше, чем у особей второй группы. Содержание эозинофилов было в 1,4 раза ниже в первой группе (p=0,01) и в 2 раза ниже во второй группе (по сравнению с группой контроля, p=0,002). Одновременно количество лимфоцитов у животных из первой группы было сопоставимо со значениями в группе контроля, а во второй группе значение этого показателя оказалось в 1,4 раза ниже контроля (p=0,04). Вместе с тем в обеих группах было отмечено снижение уровня лимфоцитов CD3⁺