

DOI 10.31718/2077-1096.19.3.138

УДК 617.3:616.71-089.844

Макаров В.Б., Морозенко Д.В., Глебова К.В.

## ДИНАМІКА ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ В СТЕГНОВУ КІСТКУ СТАЛЕВИХ ІМПЛАНТАТІВ ІЗ АЛМАЗОПОДІБНИМ ВУГЛЕЦЕВИМ ПОКРИТТЯМ

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», м. Харків  
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

*Вступ.* Як відомо, патологічна реакція організму пацієнтів на металеві імплантати загальновідома. Тому можна вважати актуальним напрям досліджень щодо динаміки гематологічних показників як маркерів реакції організму на введення у кістку сталевих імплантатів з алмазно-вуглецевим покриттям у щурів. Мета дослідження – провести оцінку впливу на організм щурів введення сталевих імплантатів з алмазно-вуглецевим покриттям на основі гематологічних показників. Матеріал і методи дослідження. У дослідженні було використано 61 щур-самець, з них 5 – інтактні тварини, та 2 групи щурів по 28 тварин у кожній (1 група – контрольна, якій вводили у метафіз стегнової кістки сталеві імплантати без покриття; 2 група – дослідна, якій вводили сталеві імплантати з алмазно-вуглецевим покриттям). Вік тварин на початок експерименту становив 5–6 місяців, маса тіла – 300–400 грамів. Кров для дослідження відбиралась у тварин після декапітації на 7, 14, 30 та 90 добу після імплантації. В крові щурів визначали кількість еритроцитів та лейкоцитів, вміст гемоглобіну і лейкограму, результати оброблялись статистично. Результати досліджень та висновки. У I групі щурів, яким вводили в стегнову кістку сталеві імплантати без покриття, кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну в крові не відрізнялись від показників у інтактних щурів, кількість лейкоцитів на 7 та 14 добу були знижені на 31,8 % на 39,4 % відповідно, на 7 добу відсоток лімфоцитів та моноцитів збільшились на 13,0 % та 5,0 %, що зумовлено токсичною імуносупресивною дією сталевих імплантатів на організм експериментальних тварин. У II групі щурів, яким вводили в стегнову кістку сталеві імплантати із алмазно-вуглецевим покриттям, показники еритроцитопоезу, кількість лейкоцитів та показники лейкограми не змінювались упродовж всіх термінів спостереження, окрім збільшення проценту еозинофілів на 7 добу та лімфоцитів на 90 добу спостереження на 3 %, що свідчить про менш виражену реакцію організму порівняно з I групою тварин.

Ключові слова: сталевий імплантат, алмазно-вуглецеве покриття, щурі, кістка, гематологічні показники.

Дослідження виконані у рамках науково-дослідної роботи ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» за 2017–2019 рр. «Вивчити репаративні властивості біоінженерних конструкцій на основі кісткових ало- та ксенотрансплантатів, що насичені стовбуровими клітинами та факторами росту», номер державної реєстрації 0117U001023.

### Вступ

Як відомо, патологічна реакція організму пацієнтів на металеві імплантати загальновідома. Індивідуальна непереносимість або алергія на той чи інший метал, який використовується у медицині, часто не дозволяє ефективно проводити оперативне лікування без видалення конструкції. Запобігти ускладнень або попередити їх можливо за використання спеціалізованих біоінертних покриттів [1]. За даними Е.І.-О. Алієва [2], у пацієнтів після остеосинтезу металевими конструкціями з тонкоплівковим багатшаровим покриттям на основі суміші нітридів титану та гафнію, не спостерігалось токсичної дії на еритропоез, а маркери запального процесу (ШОЕ, лейкоцитоз, ядерний зсув вліво) змінювались незначно, що свідчить про відсутність активного запального процесу у післяопераційний період. Наприклад, за експериментально відтвореного місцевого термічного фактору у щурів відбуваються зміни гематологічних показників внаслідок інтоксикації, чого зазвичай не буває за введення імплантатів у кістку [3]. Таким чином, можна вважати актуальним напрям досліджень щодо динаміки гематологічних показників як маркерів реакції організму на введення сталевих імплан-

татів з алмазно-вуглецевим покриттям у стегнову кістку щурів.

### Мета дослідження

Провести оцінку впливу на організм щурів введення сталевих імплантатів з алмазно-вуглецевим покриттям на основі гематологічних показників.

### Матеріал і методи дослідження

Дослідження виконано на базі відділів експериментального моделювання і трансплантології з експериментально-біологічної клініки і лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» у 2018 році. Всього під час експерименту було використано 61 щура-самця, з них 5 – інтактні тварини, та 2 групи щурів по 28 тварин у кожній (1 група – контрольна, 2 група – дослідна). Вік тварин на початок експерименту становив 5–6 місяців, маса тіла – 300–400 грамів. Всі дослідження були проведено з дотриманням відповідних біоетичних вимог по відношенню до експериментальних тварин згідно Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26, 31), Європейської конвенції захисту хре-

бетних тварин, яких використовують у експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986) і наказу МОНмолодьспорту України № 249 від 01.03.2012 р. «Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Робота була розглянута та ухвалена комітетом з біоетики ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», протокол № 174 від 29.01.2019 року.

Тестування *in vivo* сталевих імплантатів з алмазоподібним вуглецевим покриттям проводилось за допомогою експериментальної моделі, яка створювалась переднім латеральним доступом до дистального метафіза лівої стегнової кістки. За допомогою стоматологічного бора створювали стандартний дірчастий дефект діаметром 2 мм та глибиною 3 мм з подальшою імплантацією дослідного зразка (1–1,5 мм імплантованого зразка залишається не зануреним у дефект). Імплантати були зроблені з медичної неіржавої сталі BÖHLER INTERNATIONAL, стандарт EN 10204-2.2 / DIN 50049-2.2 (ТОВ НВП «LEO ORTHO GROUP», Україна). На поверхню дослідних зразків імплантатів нанесено алмазоподібне вуглецеве покриття (методом фільтрованої вакуумно-дугової катодної плазми, товщи-

на шару – не менше 1 мкм, виробник – лабораторія надтвердих аморфних алмазоподібних і полікристалічних алмазних покриттів ННЦ «Харківський фізико-технічний інститут», Україна). Контрольні зразки імплантатів – без покриття. Форма імплантатів – циліндрична, штифти довжиною 4 мм, діаметром 2 мм. Алмазоподібне вуглецеве покриття нанесено на поверхні однієї грані діаметра та 2,5 – 3 мм довжини штифта. Кров для дослідження відбиралась у тварин після декапітації на 7, 14, 30 та 90 добу після імплантації. В крові щурів визначали кількість еритроцитів та лейкоцитів, вміст гемоглобіну і лейкограму [4]. Статистичний аналіз даних проводили за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона із розрахунками медіани (Me) і процентилів (25 % та 75 %) [5].

### Результати досліджень та їх обговорення

Під час дослідження гематологічних показників у групі щурів, яким вводили в стегнову кістку сталеві імплантати без покриття, було встановлено, що кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну в крові щурів після введення сталевих імплантатів без покриття не відрізнялись від показників у інтактних щурів (табл. 1).

Таблиця 1  
Динаміка лабораторних маркерів крові щурів після введення сталевих імплантатів без покриття – 1 група (Me, 25%–75%)

Показники	Інтактні щури, n=5	Динаміка лабораторних маркерів			
		7 доба	14 доба	30 доба	90 доба
Еритроцити, Т/л	4,70 4,60 – 4,70	4,60 4,55 – 4,60	4,70 4,65 – 4,80	4,50 4,50 – 4,75	4,50 4,45 – 4,50
Гемоглобін, г/л	145,0 144,0–146,0	146,0 142,0 – 146,0	146,0 140,0 – 148,0	138,0 136,0 – 146,0	140,0 137,0 – 142,0
Лейкоцити, Г/л	6,60 6,50 – 6,70	4,50 * 4,30 – 4,95	4,00 * 3,80 – 5,40	7,40 5,65 – 8,35	5,40 4,60 – 6,50
Еозинофіли, %	3,0 3,0 – 4,0	2,0 2,0 – 8,0	4,0 2,0 – 6,0	4,0 3,0 – 5,0	4,0 1,0 – 5,0
Нейтрофіли, %	-	-	-	-	-
- юні	0	0	0	0	0
- паличкоядерні	1,0 1,0 – 1,0	1,0 1,0 – 2,0	1,0 1,0 – 1,0	2,0 1,0 – 3,0	1,0 1,0 – 2,0
- сегментоядерні	31,0 30,0 – 32,0	34,0 31,0 – 36,0	37,0 27,0 – 44,0	28,0 26,0 – 32,0	28,0 28,0 – 43,0
Лімфоцити, %	62,0 60,0 – 62,0	49,0 * 49,0 – 54,0	54,0 48,0 – 61,0	62,0 58,0 – 63,0	64,0 47,0 – 65,0
Моноцити, %	4,0 3,0 – 4,0	7,0 * 7,0 – 9,0	5,0 4,0 – 6,0	4,0 4,0 – 6,0	3,0 3,0 – 5,0

Примітка: \* – вірогідно за Вілкоксоном порівняно з показником у інтактних щурів ( $p < 0,05$ )

Кількість лейкоцитів на 7 та 14 добу була знижена на 31,8 % на 39,4 % відповідно порівняно з показником у інтактних щурів. На 30 та 90 добу спостереження кількість лейкоцитів не відрізнялась від показника у інтактних щурів. Це, очевидно, зумовлено розвитком токсичної імносупресивної дії сталевих імплантатів на організм експериментальних тварин, яка супроводжується лейкоцитопенією. Процент еозинофілів та нейтрофілів не змінювався, але на 7 добу спостереження збільшився відсоток лімфоцитів та моноцитів на 13,0 % та 5,0 % відповідно, що свідчить про реакції імунної системи на введен-

ня сталевих імплантатів.

За результатами дослідження гематологічних показників у групі щурів, яким вводили в стегнову кістку сталеві імплантати із алмазоподібним вуглецевим покриттям, було встановлено, що показники еритроцитопоезу не змінювались упродовж всіх термінів спостереження. Кількість лейкоцитів та показники лейкограми на всіх термінах також не відрізнялась від показників у інтактних щурів, окрім збільшення проценту еозинофілів на 7 добу та лімфоцитів на 90 добу спостереження на 3 % (табл. 2).

Таблиця 2  
Динаміка лабораторних маркерів крові щурів після введення сталевих імплантатів із покриттям – 2 група (Me, 25%–75%)

Показники	Інтактні щури, n=5	Динаміка лабораторних маркерів			
		7 доба	14 доба	30 доба	90 доба
Еритроцити, Т/л	4,70 4,60 – 4,70	4,60 4,50 – 4,85	5,00 4,55 – 5,05	4,50 4,40 – 4,70	4,60 4,50 – 4,85
Гемоглобін, г/л	145,0 144,0 – 146,0	146,0 142,0 – 148,0	150,0 144,0 – 153,0	144,0 140,0 – 145,0	144,0 140,0 – 149,5
Лейкоцити, Г/л	6,60 6,50 – 6,70	6,10 4,95 – 9,10	7,60 6,60 – 7,90	6,40 5,20 – 6,70	6,10 4,80 – 6,80
Еозинофіли, %	3,0 3,0 – 4,0	6,0 * 5,0 – 8,0	3,0 2,0 – 5,0	3,0 2,0 – 4,0	3,0 2,0 – 4,0
Нейтрофіли, %					
- юні	0	0	0	0	0
- паличкоядерні	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0
- сегментоядерні	1,0 – 1,0 31,0 30,0 – 32,0	1,0 – 1,0 34,0 20,0 – 36,0	1,0 – 2,0 28,0 25,0 – 34,0	1,0 – 3,0 34,0 32,0 – 35,0	1,0 – 1,0 25,0 25,0 – 27,0
Лімфоцити, %	62,0 60,0 – 62,0	50,0 50,0 – 66,0	63,0 56,0 – 66,0	59,0 57,0 – 61,0	65,0 * 65,0 – 67,0
Моноцити, %	4,0 3,0 – 4,0	6,0 6,0 – 8,0	4,0 3,0 – 6,0	4,0 2,0 – 5,0	4,0 4,0 – 5,0

Примітка: \* – вірогідно за Вілкоксоном порівняно з показником у інтактних щурів ( $p < 0,05$ )

У сучасній експериментальній медицині гематологічні показники щурів часто використовуються в якості маркерів стресової реакції організму на дію будь-яких факторів, в тому числі впливу різних речовин на резистентність [6]. Наприклад, за результатами досліджень М.А. Кривенцова із співавторами [7], у щурів за фотонного опромінювання не спостерігали лейкоцитозу, як це буває за стресової реакції, проте спостерігали лейкоцитопенію, яка є показником зниження опірності організму до зовнішнього впливу. Наприклад, у наших попередніх дослідженнях було встановлено, що динаміка гематологічних показників у щурів вказує на відсутність системної запальної реакції організму на введення імплантатів на основі полілактиду, який мав високу біосумісність та позитивно впливав на регенерацію [8,9,10]. Таким чином, гематологічні показники у щурів після імплантації сталевих імплантатів були змінені у більшому ступені в групі тварин, де не було застосовано алмазно-вуглецеве покриття. Це, очевидно, свідчить про менший ступінь реакції організму на імплантат з покриттям за показниками гемоцитопоезу.

### Висновки

У I групі щурів, яким вводили в стегову кістку сталеві імплантати без покриття, кількість еритроцитів та вміст гемоглобіну в крові після введення сталевих імплантатів без покриття не відрізнялись від показників у інтактних щурів, кількість лейкоцитів на 7 та 14 добу були знижені на 31,8 % на 39,4 % відповідно, на 7 добу відсоток лімфоцитів та моноцитів збільшився на 13,0 % та 5,0 %, що зумовлено розвитком токсичної імуносупресивної дії сталевих імплантатів на організм експериментальних тварин.

У II групі щурів, яким вводили в стегову кістку сталеві імплантати із алмазоподібним вуглецевим покриттям, показники еритроцитопоезу,

кількість лейкоцитів та показники лейкограми не змінювались упродовж всіх термінів спостереження, окрім збільшення проценту еозинофілів на 7 добу та лімфоцитів на 90 добу спостереження на 3 %, що свідчить про менш виражену реакцію організму порівняно з I групою тварин.

### Перспективи подальших досліджень

Планується вивчення біохімічних маркерів крові у експериментальних щурів для оцінки впливу сталевих імплантатів з алмазоподібним вуглецевим покриттям на регенеративні процеси у кістковій тканині.

### Література

1. Thomas P, Summer B, Krenn V, Thomsen M. Allergiediagnostik bei metall verdacht auf metal implant at unverträglichkeit. *Orthopäde*. 2013; 42(8): 602–6.
2. Aliyev El-O, Akhtyamov IF, Kuznetsova RG, Andreyev PS, Islamgaliyeva FM, Mityukova DZ, et al. Pokazateli krovi patsiyenta na rannikh stadiyakh posle osteosinteza implantatami s nanostrukturirovannym pokrytiyem [Patient blood counts in the early stages after osteosynthesis with nanostructured coated implants]. *Innovatsionnyye tekhnologii v meditsine*. 2016; 4(96): 29–34. [Russian]
3. Azhikova AK, Zhuravleva GF. Issledovaniye gematologicheskikh pokazateley krys v norme i v usloviyakh termicheskogo vozdeystviya [The study of hematological parameters of rats under normal conditions and under thermal exposure]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24350> [Russian]
4. Kamyshnikov VS. *Kliniko-biokhimicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical and biochemical laboratory diagnostics]. L: Interpresservis; 2003. 495 p. [Russian]
5. Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika* [Biomedical statistics]. Per s angl S Glants. M: Praktika; 1998. 459 p. [Russian]
6. Iskra RYa. Hematologichni ta imunologichni pokaznyky orhanizmu shchuriv za diyi khrom khlorodyu ta khrom tsytratu [Hematological and immunological parameters of the rat organism under the action of chromium chloride and chromium citrate]. *Visnyk Kharkivs'koho natsional'noho universytetu imeni VN Karazina. Seriya: biolohiya*. 2012; 16(1035): 174–8. [Ukrainian]
7. Kriventsov MA, Bessalova YeYu, Devyatova NV, Kunitsa VN, Voyutskiy VP, Kunitsa VV, et al. Kolichestvennyye izmeneniya perifericheskoy krovi krys posle oblucheniya [Quantitative changes in the peripheral blood of rats after irradiation]. *Zbirnyk naukovykh prats' V Vseukrayins'koyi naukovo-praktychnoyi konferentsiyi molodykh uchenykh i studentiv*. Zhytomyr: Vyd-vo ZHDU im I Franka; 2014. P. 343–6. [Ukrainian]
8. Makarov VB, Leont'yeva FS, Morozenko DV. Kliniko-laboratorna otsinka diyi na orhanizm shchuriv biopolimeru na osnovi polilaktydu pislya implantatsiyi u stehnovu kistku [Clinical and Laboratory Assessment of the Effect on the Body of Rats of Biopolymer Based on Poly lactide after Implantation in the Femur].

- Ukrayins'kyi zhurnal medytsyny, biolohiyi ta sportu. 2018; 3(12): 30–3. [Ukrainian]
9. Makarov VB, Morozenko DV, Leont'yeva FS. Biokhimichni markery spoluchnoyi tkanyny u syrovatki krovi shchuriv pislya implantatsiyi biopolimeru na osnovi polilaktydu [Biochemical markers of connective tissue in the blood serum of rats after implantation of a biopolymer based on polylactide]. *Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny*. 2018; 18(1/61): 178–80. [Ukrainian]
10. Dyedukh NV, Nikol'chenko OA, Makarov VB. Perebudova kistky navkolo polilaktydu, implantovanoho u diafiz stehnovoyi kistky [Bone remodeling around polylactide implanted in the femoral diaphysis]. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2018; 1(1). 275–9. [Ukrainian]

### Реферат

#### ДИНАМИКА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ В БЕДРЕННУЮ КОСТЬ СТАЛЬНЫХ ИМПЛАНТАТОВ С АЛМАЗНО-УГЛЕРОДНЫМ ПОКРЫТИЕМ

Макаров В.Б., Морозенко Д.В., Глебова К.В.

Ключевые слова: стальной имплантат, алмазно-углеродное покрытие, крысы, кость, гематологические показатели.

**Введение.** Как известно, патологическая реакция организма пациентов на металлические имплантаты общеизвестна. Поэтому можно считать актуальным направление исследований, посвященное динамике гематологических показателей как маркеров реакции организма на введение в кость стальных имплантатов с алмазно-углеродным покрытием у крыс. Цель исследования – провести оценку воздействия на организм крыс введения стальных имплантатов с алмазно-углеродным покрытием на основе гематологических показателей. **Материал и методы исследования.** В исследовании были использованы 61 крыса-самец, из них 5 – интактные животные, и 2 группы крыс по 28 животных в каждой (1 группа – контрольная, которой вводили в метафиз бедренной кости стальные имплантаты без покрытия, 2 группа – опытная, которой вводили стальные имплантаты с алмазно-углеродным покрытием). Возраст животных на начало эксперимента составлял 5–6 месяцев, масса тела – 300–400 граммов. Кровь для исследования отбиралась у животных после декапитации на 7, 14, 30 и 90 сутки после имплантации. В крови крыс определяли количество эритроцитов и лейкоцитов, содержание гемоглобина и лейкограмму, результаты обрабатывались статистически. **Результаты исследований и выводы.** В первой группе крыс, которым вводили в бедренную кость стальные имплантаты без покрытия, количество эритроцитов и содержание гемоглобина в крови не отличались от показателей у интактных крыс, количество лейкоцитов на 7 и 14 сутки были снижены на 31,8 % и 39,4 % соответственно, на 7 сутки процент лимфоцитов и моноцитов увеличился на 13,0 % и 5,0 %, что обусловлено токсическим иммуносупрессивным действием стальных имплантатов на организм экспериментальных животных. Во II группе крыс, которым вводили в бедренную кость стальные имплантаты с алмазно-углеродным покрытием, показатели эритроцитопоеза, количество лейкоцитов и показатели лейкограммы не изменялись на протяжении всех сроков наблюдения, кроме увеличения процента эозинофилов на 7 сутки и лимфоцитов на 90 сутки наблюдения на 3%, что свидетельствует о менее выраженной реакции организма по сравнению с I группой животных.

### Summary

#### DYNAMICS OF HEMATOLOGICAL INDICES IN RATS AFTER ADMINISTRATION OF DIAMOND-CARBON COATED STEEL IMPLANTS INTO THE FEMUR

Makarov V.B., Morozenko D.V., Gliebova K. B.

Key words: steel implant, diamond-carbon coating, rats, bone, haematological indicators.

**Introduction.** The pathological body response to metal implants is considered to be well known. There are a lot of studies devoted to this issue. This work is devoted to investigating the dynamic changes of haematological indicators as markers reflecting body response to the insertion of steel implants with diamond-carbon coating in rats. The purpose of the study is to assess the effects caused by steel implant with a diamond-coated coating on rat's body by assessing hematological parameters. **Materials and methods.** The study involved 61 male rats: five of which were intact animals, and the rest was divided into two groups (28 animals in each). The first group was the control group, in which rats were inserted non-coated steel implants into the femoral metaphysis; the second group was test group, in which rats were inserted steel diamond-coated implants). The age of animals at the beginning of the experiment was 5–6 months, the body weight was 300–400 g. Blood for research was taken from the animals after decapitation in 7, 14, 30 and 90 days following the implantation. The blood samples were measured for the red blood cell, white blood cells, haemoglobin, leukogram. The findings obtained were processed by statistical analysis methods. **Results and conclusions.** The first group of the rats with inserted steel implants without coating showed the number of erythrocytes and haemoglobin did not differ from those in the intact rats, the leukocyte count on the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days was reduced by 31.8 % to 39.4 %, respectively; on the 7<sup>th</sup> day the percentage of lymphocytes and monocytes increased by 13.0 % and 5.0 % due to the toxic immunosuppressive effect of steel implants on the body of the experimental animals. The 2nd group of rats, which were inserted diamond-coated steel implants in their femurs, the rates of erythropoiesis, the leukocyte number and leukogram characteristics remained unchanged during all the observation periods, except for an increase in the percentage of eosinophils on the 7<sup>th</sup> day and lymphocytes on the 90<sup>th</sup> day of follow- by 3 % that indicates a less pronounced body response in comparison with the animals of I group.