

DOI: 10.26693/jmbs03.01.071

УДК 616.71-089.844:577.121

Хвісюк О. М., Павлов О. Д., Пастух В. В.

ДИНАМІКА ЛАБОРАТОРНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ У ЩУРІВ ПІСЛЯ ПІДШКІРНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ КОМПОЗИТУ НА ОСНОВІ ПОЛІЛАКТИДУ, ГІДРОКСИПАТИТУ І ТРИКАЛЬЦІЙФОСФАТУ

Харківська медична академія післядипломної освіти, Україна

slegg190887@gmail.com

У статті розглянуто питання визначення динаміки лабораторних показників крові у щурів після підшкірної імплантації композиту на основі полілактиду, гідроксилапатиту і трикальційфосфату. Експеримент було проведено на 15 білих лабораторних щурах-самцях, вік тварин – 6 місяців, маса тіла – 240 ± 25 г. На спині щура латерально від хребта нижче лопатки проводили розтин шкіри та вводили імплантат (композитний біоматеріал) у вигляді диска (діаметр – 5 мм, висота – 2 мм) у змодельований «карман» підшкірної жирової клітковини щурів, рану ушивали шовком. У тварин відбирали кров через 30, 90 та 180 діб після імплантації. Контрольну групу тварин складали інтактні щури ($n=5$). В крові тварин на 30, 90 та 180 добу після імплантації досліджували кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів, гемоглобін і лейкограму. В сироватці крові тварин досліджували наступні біохімічні показники: глікопротеїни, сіалові кислоти, ходроїтисульфати, активність АлАТ і АсАТ, кислоти та лужної фосфатази, γ -глутамілтранспептидази (ГГТП), білірубін, сечовина та креатинін. При проведенні гематологічного обстеження щурів на різних термінах спостереження (30, 90 та 180 діб) не було встановлено змін показників еритроцитопоезу. Лише на 30 добу спостереження після імплантації було відзначено зростання на 4,0% відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів, що свідчило про завершення запально-регенеративних процесів у підшкірній клітковині за місцем імплантації. Під час біохімічного дослідження сироватки крові щурів було встановлено збільшення вмісту глікопротеїнів на 13,8% порівняно з контрольною групою. Це свідчить про завершення процесу регенерації за місцем введення імплантату, адже на більш пізніх термінах спостереження вміст глікопротеїнів не відрізнявся від показника у інтактних тварин. Аналізуючи маркери функціонального стану печінки і нирок у тварин, яким було підшкірно імплантовано композитний матеріал, порушень їх функцій не спостерігали на всіх термінах дослідження. Таким

чином, введення імплантатів на основі полілактиду, гідроксилапатиту і трикальційфосфату не впливав на соматичний статус щурів в експериментів під час його підшкірної імплантації у віддалених термінах спостереження. Відсутність зростання в сироватці крові показників функціонального стану печінки (АлАТ, АсАТ, ГГТП) та нирок (креатинін, сечовина) на 30, 90 та 180 добу свідчить про відсутність нефро- та гепатотоксичності введених імплантатів.

Ключові слова: щури, імплантати, полілактид, гідроксилапатит, трикальційфосфату, глікопротеїни, маркерні ферменти, токсичність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводилося у рамках теми науково-дослідної роботи Харківської медичної академії післядипломної освіти «Клітинно-молекулярні механізми запалення, асоційованого із хронічними захворюваннями», № державної реєстрації 015U001186.

Вступ. Успішне хірургічне лікування переломів кісток залежить від технологічного забезпечення операцій, досвіду хірурга і повноцінної реабілітації пацієнтів. Особливе значення в реконструктивній хірургії мають властивості використовуваних імплантів. Висока інтенсивність резорбції імплантів, що деградує, досить часто є причиною малої ефективності реконструктивних операцій, так як вони розсмоктуються до моменту відновлення консолидації перелому. Не менш важливі і властивості імплантованих матеріалів, такі як біологічна інертність, корозійна стійкість, міцність, еластичність [1].

В даний час часто використовуються остеопластичні матеріали, такі, як демінералізований кістковий матрикс, 3D матриці з полімолочної і полігліколевої кислот, колагенові криогелі, скло-кристалеві матеріали, аналоги кісткового мінералу – гідроксилапатит, трикальційфосфат, а також полісахариди природного походження [2]. Матеріали і імплантати тимчасової дії, заповнивши дефект органу або

пошкодженої тканини в живому організмі і надавши при цьому лікувальний ефект, повинні у визначені терміни піддатися біодеградації з одночасною заміною новими тканинними структурами. Отже, деградація матеріалу і відновлення дефекту тканини повинні перебігати з узгодженими швидкостями [3]. Таким чином, можна вважати актуальним визначення впливу імплантів, що біодеградують на метаболізм експериментальних тварин для встановлення їх нешкідливості та впливу на репаративну регенерацію тканин за місцем імплантації.

Мета дослідження – визначити динаміку лабораторних показників крові у щурів після підшкірної імплантації композиту на основі полілактиду, гідроксилапатиту і трикальційфосфату.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводились з 2014 по 2017 рр. на базі кафедри травматології, анестезіології та військової хірургії Харківської медичної академії післядипломної освіти та відділу лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (свідоцтво про атестацію № 100–287/2015 від 20.11.2015 р). Експерименти на тваринах були виконані у віварії Харківської медичної академії післядипломної освіти з дотриманням правил гуманного відношення до експериментальних тварин та асептики згідно «Європейської конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». В прове-

деному нами дослідженні у якості імплантату використаний композитний матеріал на основі L-полімолочної кислоти, гідроксилапатиту та трикальційфосфату у співвідношенні 70:10:20. Експеримент було проведено на 15 білих лабораторних щурах-самцях, вік тварин – 6 місяців, маса тіла – 240±25 г. На спині щура латерально від хребта нижче лопатки проводили розтин шкіри та вводили імплантат (композитний біоматеріал) у вигляді диска (діаметр – 5 мм, висота – 2 мм) у змодельований «карман» підшкірної жирової клітковини щурів, рану ушивали шовком. У тварин відбирали кров через 30, 90 та 180 днів після імплантації. Контрольну групу тварин складали інтактні щури (n=5). В крові тварин на 30, 90 та 180 добу після імплантації досліджували кількість еритроцитів, лейкоцитів і тромбоцитів – у камері з сіткою Горяєва; гемоглобін – геміглобінціанідним методом, лейкограму – у мазках, зафарбованих за Романовським-Гімзою [4]. В сироватці крові тварин досліджували наступні біохімічні показники: глікопротеїни, сіалові кислоти, ходроїтинсульфати, активність АлАТ і АсАТ, кислоти та лужної фосфатази, γ-глутамілтранспептидази (ГГТП), білірубін, сечовина та креатинін [5–7]. Статистичний аналіз даних був здійснений за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel XP та Statsoft Statistica 6.0. Порівняння груп пацієнтів у динаміці проводилося за непараметричним критерієм Вілкоксона із визначенням медіани (Me) та процентилів (%25 – %75) [8].

Таблиця 1 – Гематологічні показники у щурів після підшкірної імплантації композиту на основі полілактиду, гідроксилапатиту і трикальційфосфату (Me, 25% – 75%)

Гематологічні показники	Контрольна група, n=5	Доба спостереження після операції		
		30	90	180
Еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	4,70 4,50–4,85	4,60 4,50 – 4,80	4,70 4,50 – 4,90	4,80 4,60 – 4,90
Гемоглобін, г/л	143,0 138,5–153,0	147,0 141,5–151,5	141,0 139,5–144,0	144,0 140,0–147,0
Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	10,3 8,6–12,0	9,4 8,2 – 10,7	9,1 8,4 – 9,7	10,2 9,0 – 10,9
Еозинофіли, %	5,0 3,0–5,0	4,0 3,0 – 5,0	5,0 4,0 – 6,0	4,0 4,0 – 5,0
Нейтрофіли, %:	–	–	–	–
Юні	0	0	0	0
Паличкоядерні	5,0 5,0–7,0	9,0 * 8,0 – 10,0	5,0 5,0 – 6,0	6,0 5,0 – 7,0
Сегментоядерні	32,0 29,0–36,0	27,0 24,0 – 34,0	30,0 27,0 – 32,0	28,0 28,0 – 33,0
Лімфоцити, %	53,0 51,0–57,0	55,0 50,0 – 57,0	54,0 52,0 – 56,0	56,0 53,0 – 57,0
Моноцити, %	5,0 3,0–7,0	5,0 4,0 – 7,0	6,0 5,0 – 7,0	5,0 4,0 – 6,0

Примітка: * – вірогідно за Вілкоксоном порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$.

Таблиця 2 – Біохімічні показники сироватки крові у щурів після підшкірної імплантації композиту на основі полілактиду, гідроксиапатиту і трикальційфосфату (Me, 25% – 75%)

Біохімічні маркери	Контрольна група, n=5	Доба після імплантації		
		30	90	180
Глікопротеїни, г/л	1,38	1,57 *	1,35	1,38
	1,27 – 1,42	1,53 – 1,70	1,31 – 1,41	1,34 – 1,43
Сіалові кислоти, ммоль/л	2,05	2,10	2,07	2,10
	1,95 – 2,23	2,08 – 2,18	1,99 – 2,11	1,99 – 2,19
Хондроїтин-сульфати, г/л	0,310	0,296	0,300	0,305
	0,278–0,333	0,283–0,308	0,288–0,320	0,292–0,318
Активність АлАТ, U/L	40,0	44,0	37,0	42,0
	34,0 – 46,0	35,0 – 46,0	35,0 – 42,0	38,0 – 35,0
Активність АсАТ, U/L	205,0	198,0	202,0	205,0
	194,0–212,5	192,0–210,5	192,5–212,5	193,0–212,5
Лужна фосфатаза, U/L	350,0	345,0	325,0	340,0
	306,0–363,0	325,0–355,0	312,5–360,0	322,5–357,5
Активність ГГТП, U/L	4,40	4,00	4,10	4,30
	3,40 – 5,10	3,70 – 4,55	3,80 – 4,60	3,75 – 4,90
Білірубін, мкмоль/л	3,30	3,10	3,15	3,30
	2,95 – 3,60	3,02 – 3,35	2,85 – 3,50	3,03 – 3,55
Сечовина, ммоль/л	4,20	4,10	4,20	4,00
	3,85 – 4,55	3,89 – 4,30	4,02 – 4,40	3,84 – 4,30
Креатинін, мкмоль/л	63,0	70,0	66,0	63,0
	54,5 – 74,0	60,0 – 72,0	63,5 – 71,0	58,0 – 70,0

Примітка: * – вірогідно за Вілкосоном порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

При проведенні гематологічного обстеження щурів на різних термінах спостереження (30, 90 та 180 діб) не було встановлено змін показників еритроцитопоезу. Лише на 30 добу спостереження після імплантації було відзначено зростання на 4,0% відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів, що свідчило про завершення запально-регенеративних процесів у підшкірній клітковині за місцем імплантації (**табл. 1**).

Під час біохімічного дослідження сироватки крові щурів було встановлено збільшення вмісту глікопротеїнів на 13,8 % порівняно з контрольною групою. Це свідчить про завершення процесу регенерації за місцем введення імплантату, адже на більш пізніх термінах спостереження вміст глікопротеїнів не відрізнявся від показника у інтактних тварин (**табл. 2**).

Аналізуючи маркери функціонального стану печінки і нирок у тварин, яким було підшкірно імплантовано композитний матеріал, порушень їх функцій не спостерігали на всіх термінах дослідження. Таким чином, введення імплантатів на основі полілактиду, гідроксиапатиту і трикальційфосфату не впливав на соматичний статус щурів в експериментів під час його підшкірної імплантації у віддалених термінах спостереження.

Висновки

1. Збільшення на 30 добу експерименту відносної кількості паличкоядерних нейтрофілів у периферичній крові щурів на 4,0% та вмісту в сироватці глікопротеїнів на 13,8% порівняно з контрольною групою тварин свідчить про завершення регенеративно-запального процесу у підшкірній клітковині за місцем введення імплантату.
2. У подальші терміни спостереження на 90 та 180 добу вміст маркерів запально-деструктивних порушень в організмі (глікопротеїни, хондроїтин-сульфати) не відрізнявся від показників контрольної групи тварин, що свідчить про завершення регенерації та відсутність реактивного запального процесу в організмі тварин після імплантації.
3. Відсутність зростання в сироватці крові показників функціонального стану печінки (АлАТ, АсАТ, ГГТП) та нирок (креатинін, сечовина) на 30, 90 та 180 добу свідчить про відсутність нефро- та гепатотоксичності введених імплантатів у віддалених термінах спостереження.

Перспективи подальших досліджень у цьому напрямку. Планується проведення оцінки клінічної ефективності застосування імплантатів з композиту на основі полілактиду, гідроксиапатиту і трикальційфосфату під час проведення оперативних втручань.

References

1. Slizovskiy GV, Kuzhelivskiy II. Reaktsiya kostnoy tkani organizma na implantatsiyu mikroporistogo nikelida titana v eksperimente. *Bulletin of Experimental and Clinical Surgery*. 2012; 2: 401-3. [Russian].

2. Iryanov YuM, Iryanova TYu, Dyuryagina OV. Issledovanie osteoplasticheskikh svoystv biominerala kostnoy tkani. *Geniy Ortopedii*. 2012; 4: 119-24. [Russian].
3. Shcheblykina AV, Mishchenko PV, Kumeiko VV. Biosovmestimye degradiruemye materialy na osnove pektinov dlya tkanevoy inzhenerii: mestnaya reaktsiya tkaney pri podkozhnoy implantatsii. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 2: 13-7. [Russian].
4. *Laboratorni metodi doslidzhen u biologiyi, tvarinnitstvi ta veterinarniy meditsini: dovidnik*. Za red VV Vlizla. Lviv: SPOLOM, 2012. 764 s. [Ukrainian].
5. Timoshenko OP, Voronina LM, Kravchenko VM, ta in. *Klinichna biokhimiya: navchalnyy posibnik*. Kharkiv: Zoloti Storinki, 2003. 239 s. [Ukrainian].
6. Kamyshnikov VS. *Kliniko-biokhimicheskaya laboratornaya diagnostika*. Spravochnik v 2-kh tomakh. Tom 1. Minsk: Interservis, 2003. 495 s. [Russian].
7. Morozenko DV, Leontyeva FS. Metodi doslidzhennya markeriv metabolizmu spoluchnoyi tkanini u suchasniy klinichniy ta eksperimentalniy meditsini. *Molodiy vcheniy: naukoviy zhurnal*. 2016; 2 (29): 168-72. [Ukrainian].
8. Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. Perevod s angl. M: Praktika, 1998. 459 s. [Russian].

УДК 616.71-089.844: 577.121

ДИНАМИКА ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ У КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ИМПЛАНТАЦИИ КОМПОЗИТА НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА, ГИДРОКСИАПАТИТА И ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА

Хвизюк А. Н., Павлов А. Д., Пастух В. В.

Резюме. В статье рассмотрены вопросы определения динамики лабораторных показателей крови у крыс после имплантации композита на основе полилактида, гидроксилатапатита и трикальцийфосфата.

Эксперимент был проведен на 15 белых лабораторных крысах-самцах, возраст животных – 6 месяцев, масса тела – 240±25 г. На спине крысы латерально от позвоночника ниже лопатки проводили вскрытие кожи и вводили имплантат (композитный биоматериал) в виде диска (диаметр – 5 мм, высота – 2 мм) в смоделированный «карман» подкожной жировой клетчатки крыс, рану ушивали шелком. У животных отбирали кровь через 30, 90 и 180 суток после имплантации. Контрольную группу животных составляли интактные крысы (n=5). В крови животных на 30, 90 и 180 сутки после имплантации исследовали количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, гемоглобина и лейкограмму. В сыворотке крови животных исследовали следующие биохимические показатели: гликопротеины, сиаловые кислоты, ходроитинсульфаты, активность АлАТ и АсАТ, кислой и щелочной фосфатазы, γ-глутамилтранспептидазы (ГГТП), билирубин, мочевины и креатинин.

При проведении гематологического обследования крыс на разных сроках наблюдения (30, 90 и 180 суток) не было установлено изменений показателей эритроцитопоза. Лишь на 30 сутки наблюдения после имплантации был отмечен рост на 4,0% относительного количества палочкоядерных нейтрофилов, что свидетельствовало о завершении воспалительно-регенеративных процессов в подкожной клетчатке в месте имплантации. Во время биохимического исследования сыворотки крови крыс было установлено увеличение содержания гликопротеинов на 13,8 % по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует об остаточном воспалении в процессе регенерации по месту введения имплантата, ведь на более поздних сроках наблюдения содержание гликопротеинов не отличалось от показателя у интактных животных.

Анализируя маркеры функционального состояния печени и почек у животных, которым был подкожно имплантирован композитный материал, нарушений их функций не наблюдали на всех сроках исследования. Таким образом, введение имплантатов на основе полилактида, гидроксилатапатита и трикальцийфосфата не влияло на соматический статус крыс в эксперименте после их подкожной имплантации в отдаленных сроках наблюдения. Отсутствие роста в сыворотке крови показателей функционального состояния печени (АлАТ, АсАТ, ГГТП) и почек (креатинин, мочевины) на 30, 90 и 180 сутки свидетельствует об отсутствии нефро- и гепатотоксичности введенных имплантатов.

Ключевые слова: крысы, имплантаты, полилактид, гидроксилатапатит, трикальцийфосфат, гликопротеины, маркерные ферменты, токсичность.

UDC 616.71-089.844: 577.121

Dynamics of Laboratory Blood Indices in Rats after Hypodermic Implantation of a Composite Based on Polylactide, Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate

Khvisyuk O. M., Pavlov O. D., Pastukh V. V.

Abstract. The article deals with the question of determining the dynamics of laboratory parameters of blood in rats after subcutaneous implantation of a composite based on polylactide, hydroxyapatite and tricalcium

phosphate. The experiment was carried out on 15 white laboratory male rats, age of animals – 6 months, body weight – 240 ± 25 g. We made a cut of the skin at the back of the rat laterally from the spine below the shoulder and input an implant (composite biomaterial) in the form of a disk (diameter – 5 mm, height – 2 mm) in the simulated "pocket" subcutaneous fat tissue of rats. The wound was sewn with silk.

These animals' blood was taken after 30, 90 and 180 days after implantation. The control group of animals consisted of intact rats ($n=5$). We examined the blood of rats at 30, 90 and 180 days after implantation, the number of red blood cells, leukocytes and platelets, hemoglobin and leukogram. The following biochemical parameters were studied in blood serum of animals: glycoproteins, sialic acids, δ -glucosidates, activity of ALT and AST, acid and alkaline phosphatase, γ -glutamyltranspeptidase (GGT), bilirubin, urea and creatinine.

During rheumatologic examination of rats at different observation periods (30, 90 and 180 days), no changes in the parameters of erythrocytopoiesis were established. Only at the 30th day of observation after implantation, there was an increase of 4.0 % relative number of band neutrophils, indicating the completion of inflammatory and regenerative processes in the subcutaneous tissue at the site of implantation. During the biochemical study of blood serum of rats, an increase in the content of glycoproteins was found to be 13.8% compared to the control group. This indicates the completion of the regeneration process at the site of the implant, because later, the content of glycoproteins did not differ from the indicator in intact animals.

When analyzing markers of the functional state of the liver and kidneys in animals subcutaneously implanted with composite material, their function impairments were not observed at all terms of the study.

Thus, the introduction of implants based on polylactide, hydroxyapatite and tricalcium phosphate did not affect the somatic status of rats in experiments during its subcutaneous implantation in long-term observation. Lack of growth blood serum indicators of the functional state of the liver (ALT, AST, GGT) and the kidneys (creatinine, urea) at 30, 90 and 180 days proves the absence of nephrotoxicity and hepatotoxicity of the implanted implants.

Keywords: rats, implants, polylactides, hydroxyapatite, tricalcium phosphate, glycoproteins, marker enzymes, toxicity.

Стаття надійшла 15.11.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування