

ДЕРЖАВНА НАУКОВА УСТАНОВА
«НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЦЕНТР ПРОФІЛАКТИЧНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ
МЕДИЦИНИ» ДЕРЖАВНОГО УПРАВЛІННЯ СПРАВАМИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ЛАЗАРЕНКО ГЛІБ ОЛЕГОВИЧ

УДК 620.3+616.7

ДИСЕРТАЦІЯ
ВИЗНАЧЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОЇ СУМІСНОСТІ ІМПЛАНТАТІВ В
ОРТОПЕДО-ТРАВМАТОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Спеціальність 222 – «Медицина»

Галузь знань 22 – «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Г.О. Лазаренко

Науковий керівник: Бойко Ігор Васильович, доктор медичних наук

Київ – 2023

АНОТАЦІЯ

Лазаренко Г.О. Визначення індивідуальної сумісності імплантатів в ортопедо-травматологічній практиці (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 22 «Охорона здоров'я» за спеціальністю 222 «Медицина» (спеціалізація «травматологія та ортопедія») – Державна наукова установа «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами, Київ, 2023.

В дисертаційній роботі проаналізовано реакції організму та тканин на ортопедичні імплантати та розглянуто різні методи діагностики та лікування, що базуються на сучасному розумінні його етіології та перебігу.

Експериментальна частина роботи складається з двох розділів.

В першому розділі дослідження була застосована модифікована модель сенсibilізації на нікель на лабораторних щурах, яка полягала у однократному внутрішньоочеревинному введенні розчину NiSO_4 у неповному ад'юванті Фрейнда та двократному внутрішньошкірному введенні бустерних доз NiSO_4 у повному ад'юванті Фрейнда для відновлення імунної відповіді. Це дозволило відтворити модель сенсibilізації на Ni.

Експеримент проведений на 25 щурах (самках), лінії Wistar. Спочатку випадковим чином тварин розподілено на три групи: 1) інтактна група – 6 щурів, яким операцію не виконували; 2) контрольна група – 6 щурів без попередньої сенсibilізацією ад'ювантом Фрейнда до Ni та встановленням Ni-вмісного імпланту; 3) дослідна група – 13 щурів з попередньою сенсibilізацією ад'ювантом Фрейнда до Ni та встановленням Ni-вмісного імпланту.

Через 2 тижні після останньої імунізації тваринам контрольної та дослідної групи виконувалась оперативне втручання – імплантація нікелевих пластин.

В день проведення імплантації, через 3 та 5 місяців тваринам проводився забір крові для проведення подальших досліджень: отримання зразків лейкоцитів з периферичної крові щурів, дослідження хемокінового профілю у сироватках крові щурів, отримання зразків сироватки крові щурів, отримання зразків IgG із сироватки крові щурів, проведення оцінки вмісту IgG специфічних до білкових комплексів (агрегатів) у сироватках крові щурів.

В другому розділі через 5 місяців від імплантації тварин виводили з експерименту. Капсулу та паракапсулярні тканини видалялись для подальшого проведення гістологічного та морфометричного досліджень. Вилучені імпланти віддавали на дослідження методом електронної мікроскопії (СЕМ). З отриманими IgG проводили тестування за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмних пакетів StatPlus 7.0. та Origin v.9.0.

Центральну тенденцію та варіацію кількісних показників позначали як $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартна похибка середнього арифметичного; або як $Me (Q1-Q3)$, де Me – медіана (50 % центиль), $Q1-Q3$ – перший і третій кuartилі (25 % і 75 % центилі), відповідно (міжквартильний інтервал).

Порівняння кількісних показників у двох незалежних вибірках здійснювали за допомогою U-критерію Mann-Whitney; у трьох незалежних вибірках – за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA з урахуванням поправки Bonferroni), чи непараметричного дисперсійного аналізу (Kruskal-Wallis), з наступними порівняннями з використанням U-критерію Mann-Whitney.

Кореляційні зв'язки аналізували за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Spearman.

Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

В дослідженні із використанням протокової цитофлуориметрії визначено концентрацію таких цитокінів, як IFN- γ , IL-4, TNF- α та MCP-1 в сироватці крові щурів за умов нікель-асоційованої сенсibilізації. Не було виявлено суттєвого підвищення показників IFN- γ , IL-4, TNF- α , але було виявлено зростання рівня MCP-1 у дослідних тварин. Таким чином, таргетування MCP-1 може бути потенційною терапевтичною стратегією визначення реакції гіперчутливості.

При проведенні імуноферментного аналізу IgG в контрольній групі та дослідній групі не спостерігається достовірної відмінності між різними термінами забору сироватки, це свідчить про неспецифічне зв'язування IgG із нікелем та сорбентом, що в подальшому потребує оптимізації методів оцінки отриманих імуноглобулінів.

Під час гістологічного дослідження доведено розвиток запальної реакції на нікелевий імплант в експерименті. Морфологічні особливості запальної реакції подібні до типу побічних місцевих тканинних реакцій (ALTR) і побічних реакцій на металеві уламки (ARMD). На тлі сенсibilізації сульфатом нікелю тканинні реакції сполучної тканини капсули на нікелеві імпланти характеризувалися достовірно більшою питомою щільністю колагену ($44,4 \pm 4,3\%$ проти $32,9 \pm 3,3\%$, $p < 0,01$) та тенденцією збільшення питомої щільності клітин з експресією віментину ($15,7 \pm 3,0\%$ проти $9,8 \pm 2,1\%$, $p = 0,05$).

Клітинно-запальна реакція навколо нікелевих імплантів після сенсibilізації та без такої мала інтенсивну інфільтрацію CD44⁺ клітин і значно меншу появу CD68⁺ макрофагів та CD3e⁺ лімфоцитів з наступною закономірністю питомої щільності у стінці капсули: CD44⁺ клітини $47,6 \pm 5,9\%$ проти $37,9 \pm 7,2\%$ ($p = 0,11$), CD68⁺ клітини $14,9 \pm 2,4\%$ проти $21,1 \pm 4,5\%$ ($p = 0,23$), CD3e⁺ клітини $4,5 \pm 0,8\%$ проти $9,2 \pm 2,7\%$ ($p = 0,11$).

Під час дослідження методом електронної мікроскопії було виявлено корозію імпланту в кожному вилученому зразку, але більш вираженою була в групі тварин

з попередньою сенсibilізацією до Ni, з'являються віддалені часточки (Ni), що можна охарактеризувати, як початок руйнації імпланту.

Після очищення та розведення до відповідної концентрації IgG наносили на зонд АСМ. Проводились дослідження сили біоадгезивних взаємодій IgG, виділених з сироватки крові реципієнтів, до імплантатів. Дослідження включали контроль нанорельєфу поверхні та спектроскопію сил адгезії чистих АСМ зондів та зондів із білком з індивідуальної проби крові реципієнта. Вимірювання проводились при нормальних умовах. В кожній серії вимірювань на 2-х різних волокнах реєструвалось по 50 силових кривих. При суттєвій відмінності отримуваних значень сил адгезії проводились додаткові вимірювання. На АСМ зонди наносилась майже однакова кількість імуноглобуліну методом занурення у мікрокраплю. Точна кількість осажденного на зонд білка відстежувалась за зсувом максимуму власного механічного резонансу зонду. При необхідності проба наносилась повторно на чистий зонд. В роботі використовувались зонд Si₃N₄ марки DNP-20 (Veeco Inc.) із V-подібним кантилевером. Усереднений радіус вістря зонду складав 30 нм, (стала пружності консолі 0,32 нН/нм). Параметри кантилеверів уточнювали перед вимірюваннями за відповідними процедурами калібрування.

Зондами з нанесеними імуноглобулінами проводили тестування на сумісність матеріалу імплантату з організмом. Значення сили відриву зонду поверхнею імплантату з імуноглобулінами реципієнта вважали за оцінку сумісності матеріалу з організмом. Чим вище було значення сили відриву тим ймовірніше був розвиток реакції на імплантат організмом.

Сама реакція організму реалізовувалась як формування сполучної тканини навколо імплантату з втратою функціональних властивостей останнього, з розвитком асептичного запалення в місці встановлення імплантату, та у руйнуванні самого імплантату.

Основним завданням, що вирішувалась в експериментальному дослідженні це можливість визначення індивідуальної біосумісності штучних матеріалів.

Проблеми, прогалини та недоліки які виникають у цій галузі підкреслюють необхідність нових, клінічно корисних діагностичних та прогностичних тестів для визначення ймовірності патологічної відповіді, викликаної імплантатом, перед імплантацією та адекватної оцінки всього спектру можливих реакцій після імплантації, зосереджені на процесах формуються на клітинному рівні.

Таким чином, одним з можливих ефективних інструментів спостереження та аналізу процесів, які діють всередині або між біомолекулами може бути проведення дослідженням методом атомно-силової мікроскопії.

Подальше дослідження дасть глибше розуміння фундаментальної запальної та імунологічної реакцій на метали, що входять до складу імплантів. Це в свою чергу полегшить ідентифікацію клінічно корисних призначень, необхідних для розробки діагностичних або прогностичних тестів для пацієнтів з металевими імплантатами.

У нашій роботі при впровадженні фізичних методів визначення біосумісності матеріалів (у тому числі спеціальних покриттів) медичного призначення були суттєво доповнені та набули подальшого розвитку теоретичні моделі, які описують вплив амплітудних та спектральних параметрів рельєфу реальних поверхонь на характер капілярних силових взаємодій зонд-поверхня.

Спираючись на результати нашого дисертаційного дослідження можна стверджувати, що запропонований метод тестування на основі атомно-силової спектроскопії при кореляції міжмолекулярної взаємодії біомолекул (на зонді АСМ) і конформаційних змін білків, адсорбованих на матеріалах імплантів, є перспективний експресним методом тестування біоматеріалів на сумісність з організмом конкретного реципієнта.

Ключові слова: експеримент, імплантати, моделювання на тваринах, переломи, остеосинтез, ендопротезування, сенсibilізація, біосумісність, клітинний і гуморальний імунітет, реакція гіперчутливості до металів, скануюча електронна мікроскопія, атомно-силова мікроскопія, діагностика, лікування.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких відображено основні наукові результати дослідження

1. **Лазаренко ГО.** Гіперчутливість до металу в ендопротезуванні: методи діагностики та лікування (огляд літератури). Літопис травматології та ортопедії 2016;1-2 (33-34):194-200. *(Дисертантом зібрано матеріал, проаналізовано літературні джерела з проблеми, сформульовані висновки, підготовлено матеріали до друку).*

2. Гришук ЯІ, Алексєєва ТА, Картель МТ, Лазаренко ОМ, **Лазаренко ГО**, Литвин ПМ, та ін. Тестування з використанням атомно силової мікроскопії індивідуальної сумісності алотрансплантатів з організмом реципієнта. Клінічна хірургія. 2016; 7: 61-63. *(Дисертантом зібрано матеріал, проаналізовано літературні джерела з проблеми, сформульовані висновки, підготовлено матеріали до друку).*

3. Boiko IV, Zaft VB, **Lazarenko GO**, Lazarenko OM, Aleksyeyeva TA, Kartel NT, Lytvyn PM. Testing the compatibility of the orthopedic implants material with recipients body in arthroplastic using atomic force microscopy (AFM). Juniper Online Journal of Orthopedic & Orthoplastic Surgery 2018; 1(5): P 86-90. *(Дисертантом зібрано матеріал, проаналізовано літературні джерела з проблеми, висновки сформульовані спільно з керівником, підготовлено матеріали до друку).*

4. **Lazarenko HO**, Boiko IV. The method of atomic force microscopy as a possible tool for testing the biocompatibility of implants in traumatology and orthopedics practice. Wiadomości Lekarskie. 2022; 75(11(1): 2614-2618. *(Дисертантом зібрано матеріал, проаналізовано літературні джерела з проблеми, висновки сформульовані спільно з керівником, підготовлено матеріали до друку).*

5. **Лазаренко ГО**, Бойко ІВ. Реакція гіперчутливості до ортопедичних імплантатів: сучасний стан проблеми (Огляд літератури). TERRA ORTHOPAEDICA. 2022;(3(114): 61-72. *(Дисертантом зібрано матеріал,*

проаналізовано літературні джерела з проблеми, висновки сформульовані спільно з керівником, підготовлено матеріали до друку).

6. **Lazarenko HO, Savosko SI, Guzyk MM, Boiko IV.** Features of using orthopedic implants on an experimental model of sensitization to nickel (Ni). Clinical and Preventive Medicine. 2023; (6(28): *(Дисертантом зібрано матеріал, проаналізовано літературні джерела з проблеми, висновки сформульовані спільно з керівником, підготовлено матеріали до друку).*

Публікації, які засвідчують апробацію результатів дослідження

1. Бойко ІВ, Зафт ВБ, **Лазаренко ГО**, Лазаренко ОМ, Алексєєва ТА, Литвин ПЛ. Індивідуальна біосумісність ортопедичних імплантів з організмом реципієнта. Перша науково-практична конференція біомедичних інженерів і технологів України «Сучасний стан та перспективи біомедичної інженерії і медичної промисловості України»; 2015 жовтень 7-8; Київ *(дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено).*

2. Бойко ІВ, Зафт ВБ, **Лазаренко ГО**, Лазаренко ОМ, Алексєєва ТА, Картель МТ, та ін. Метод тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ). Науково-практична конференція з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині»; 2017 листопада 9-10; Київ *(дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено).*

3. **Лазаренко ГО**, Зафт ВБ Тестування сумісності імплантів при ендопротезуванні великих суглобів за допомогою атомно-силової мікроскопії. Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю Національної Академії Медичних Наук; 2018 березня 23; Київ *(дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено).*

4. **Лазаренко ГО**, Лазаренко ОМ, Бойко ІВ, Алексєєва ТА, Литвин ПМ. Атомно-силовий мікроскоп, як інструмент для тестування сумісності імплантів в ортопедо-травматологічній практиці. Науково-практична конференція молодих

вчених «Перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини»; 2019 квітня 17-19; Київ (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

5. **Лазаренко ГО**, Лазаренко ОМ, Бойко ІВ, Алексеєва ТА, Литвин ПМ. Атомно-силовий мікроскоп, місце в ортопедо - травматологічній практиці. XVIII з'їзд ортопедів-травматологів України; 2019 жовтня 9-11; Івано-Франківськ (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

6. **Лазаренко ГО**. Передопераційне тестування сумісності ортопедичних імплантатів за допомогою атомно-силової мікроскопії. Конференція «BIOMED Talks 2019»; 2019 жовтень 15-16; Київ (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

7. **Лазаренко ГО**, Лазаренко ОМ, Бойко ІВ, Алексеєва ТА, Литвин ПМ. Тестування сумісності імплантатів в ортопедо-травматологічній практиці. Науково-практична конференція «Проблеми і перспективи розвитку клінічної і профілактичної медицини та громадського здоров'я: міждисциплінарні аспекти»; 2019 жовтень; Київ (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

8. **Lazarenko HO**, Boyko IV. Метод тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ). I International Scientific and Theoretical Conference The Process and Dynamics of the Scientific Path; 2021 жовтень 26; Athens (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

9. **Lazarenko HO**. Testing of the compatibility of the orthopedic implants material with the recipient's body by using atomic force microscopy (AFM). I International Scientific and Theoretical Conference Theoretical and Practical Aspects of Modern Scientific Research; 2021 квітень 30; Seoul (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

10. **Lazarenko HO.** Biocompatibility testing of the orthopedic implants material with using atomic force microscopy (AFM). I Correspondence International Scientific and Practical Conference Globalization of Scientific Knowledge: International Cooperation and Integration of Science; 2021 травень 7; Vienna (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

11. **Лазаренко ГО.** Метод передопераційного тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ). Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасні досягнення і перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини»; 2021 квітень 21; Київ (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

12. **Лазаренко ГО, Гузик ММ, Савосько СІ.** Визначення реакції гіперчутливості до ортопедичних імплантів (експериментальне дослідження). «Tissue reactions in the norm, experiment and clinic». All-Ukrainian scientific and practical conference with international participation dedicated to the memory of professor Yu. B. Chaikovsky; 2023 червень 8–9; Київ (*дисертантом підготовлено тези, зібрано матеріал та його узагальнено*).

ANNOTATION

Lazarenko H.O. Determination of individual compatibility of implants in orthopedic-traumatological practice (experimental research) – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 «Healthcare» in the specialty 222 «Medicine» (specialization «Traumatology and Orthopedics») – State Institution of Science «Research and Practical Center of Preventive and Clinical Medicine» State Administrative Department, Kyiv, 2023.

In the dissertation, the state of research on the organism's and tissues' reactions to orthopedic implants has been analyzed, and various diagnostic and treatment methods based on a modern understanding of its etiology and course have been considered.

The experimental part of the work consists of two sections.

In the first section, a modified model of sensitization to nickel was applied to laboratory rats. It involved a single intraperitoneal injection of a solution of NiSO₄ in incomplete Freund's adjuvant and a two-time intradermal injection of booster doses of NiSO₄ in complete Freund's adjuvant to restore the immune response. This allowed the reproduction of the sensitization model to nickel.

The experiment was conducted on 25 female Wistar rats. Initially, the animals were randomly divided into three groups: 1) intact group – 6 rats that did not undergo surgery; 2) control group – 6 rats without prior sensitization with Freund's adjuvant to Ni and without the installation of a Ni-containing implant; 3) experimental group – 13 rats with prior sensitization with Freund's adjuvant to Ni and the installation of a Ni-containing implant.

Two weeks after the last immunization, surgical intervention was performed on animals from the control and experimental groups – nickel plate implantation. On the day of implantation, and at 3- and 5-months post-implantation, blood samples were taken from the animals for further research. This included obtaining leukocyte samples from the peripheral blood of rats, examining the chemokine profile in rat blood sera, obtaining serum samples from rats, extracting IgG samples from rat serum, and assessing the content of IgG specific to protein complexes (aggregates) in rat blood sera.

In the second section, 5 months after implantation, animals were removed from the experiment. The capsule and paracapsular tissues were removed for subsequent histological and morphometric studies. The extracted implants were subjected to examination using scanning electron microscopy (SEM). The obtained IgG samples were tested using atomic force microscopy (AFM).

The statistical data analysis was conducted using the StatPlus 7.0 and Origin v.9.0 software programs.

The central tendency and variation of quantitative indicators were denoted as $M \pm m$, where M is the arithmetic mean, m is the standard error of the mean, or as Me ($Q1-Q3$), where Me is the median (50% percentile), and $Q1-Q3$ are the first and third quartiles (25% and 75% percentiles), respectively (interquartile range).

Comparisons of quantitative indicators in two independent samples were performed using the Mann-Whitney U test; in three independent samples, either one-way analysis of variance (ANOVA with Bonferroni correction) or non-parametric analysis of variance (Kruskal-Wallis) was used, followed by post hoc comparisons using the Mann-Whitney U test.

Correlational relationships were analyzed using the Spearman rank correlation coefficient.

Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$.

In the study using flow cytometry, the concentration of cytokines such as IFN- γ , IL-4, TNF- α , and MCP-1 in the blood serum of rats under conditions of nickel-associated allergic reactions was determined. There was no significant increase in the levels of IFN- γ , IL-4, and TNF- α , but an increase in the MCP-1 level was observed in the experimental animals. Therefore, targeting MCP-1 could be a potential therapeutic strategy for assessing hypersensitivity reactions.

In the enzyme-linked immunosorbent assay analysis of IgG in the control and experimental groups, no significant difference was observed between different serum collection times. This indicates nonspecific binding of IgG to nickel and the sorbent, which requires further optimization of the methods for assessing the obtained immunoglobulins.

During the histological examination, the development of an inflammatory reaction to the nickel implant in the experiment was confirmed. The morphological features of the inflammatory reaction were similar to the type of adverse local tissue reactions (ALTR)

and adverse reactions to metal debris (ARMD). In the context of sensitization with nickel sulfate, the connective tissue reactions of the capsule to nickel implants were characterized by a significantly higher relative density of collagen ($44.4\pm 4.3\%$ vs. $32.9\pm 3.3\%$, $p<0.01$) and a trend towards an increase in the relative density of cells expressing vimentin ($15.7\pm 3.0\%$ vs. $9.8\pm 2.1\%$, $p=0.05$).

The cell-inflammatory reaction around nickel implants, both with and without sensitization, exhibited a less intense infiltration of CD44⁺ cells and a significantly lower presence of CD68⁺ macrophages and CD3e⁺ lymphocytes, with subsequent regularities in the relative density in the capsule wall: CD44⁺ cells $47.6\pm 5.9\%$ vs. $37.9\pm 7.2\%$ ($p=0.11$), CD68⁺ cells $14.9\pm 2.4\%$ vs. $21.1\pm 4.5\%$ ($p=0.23$), CD3e⁺ cells $4.5\pm 0.8\%$ vs. $9.2\pm 2.7\%$ ($p=0.11$).

During the investigation using electron microscopy, corrosion of the implant was observed in each extracted sample, but it was more pronounced in the group of animals with prior sensitization to Ni. Distant particles (Ni) appeared, which can be characterized as the beginning of implant breakdown.

After purification and dilution to the appropriate IgG concentration, it was applied to the AFM probe. Investigations of the bioadhesive interactions strength of IgG, isolated from the blood serum of recipients, to implants, were carried out. The study included control of the nanorelief of the surface and spectroscopy of the adhesion forces of pure AFM probes and probes with protein from an individual recipient blood sample. Measurements were conducted under normal conditions. In each series of measurements, 50 force curves were recorded on 2 different fibers. In case of a significant difference in the obtained values of adhesion forces, additional measurements were carried out. Almost the same amount of immunoglobulin was applied to AFM probes by the immersion method in a microdrop. The exact amount of protein deposited on the probe was tracked by the shift of the probe's own mechanical resonance maximum. If necessary, the sample was reapplied to a clean probe. Si₃N₄ probes with a V-shaped cantilever were used in the work. The averaged radius of the probe tip was 30 nm (spring constant of the cantilever

0.32 nN/nm). The parameters of the cantilevers were refined before measurements using appropriate calibration procedures.

Probes with applied immunoglobulins were used to test the compatibility of the implant material with the organism. The value of the force of detachment of the probe from the surface of the implant with recipient immunoglobulins was considered an assessment of the compatibility of the material with the organism. The higher the value of the detachment force, the more likely the development of a reaction to the implant by the organism.

The organism's reaction itself manifested as the formation of connective tissue around the implant with the loss of its functional properties, the development of aseptic inflammation at the site of implantation, and the destruction of the implant.

The main task addressed in the experimental study was the ability to determine the individual biocompatibility of artificial materials.

The problems, gaps, and drawbacks that arise in this field underscore the necessity for new clinically useful diagnostic and prognostic tests to determine the likelihood of a pathological response caused by the implant, both before implantation and for the adequate assessment of the entire spectrum of possible reactions after implantation. These should be focused on processes forming at the cellular level.

Thus, one of the possible effective tools for monitoring and analyzing processes occurring within or between biomolecules could be conducting research using atomic force microscopy.

Further research will provide a deeper understanding of the fundamental inflammatory and immunological reactions to metals that are part of implants. This, in turn, will facilitate the identification of clinically relevant markers necessary for the development of diagnostic or prognostic tests for patients with metal implants.

In our work, when implementing physical methods for determining the biocompatibility of materials (including special coatings) for medical purposes, theoretical models describing the influence of amplitude and spectral parameters of the

relief of real surfaces on the nature of capillary force interactions probe-surface were significantly supplemented and further developed. Based on the results of our dissertation research, it can be argued that the proposed testing method based on atomic force spectroscopy for correlating the intermolecular interaction of biomolecules (on the AFM probe) and conformational changes of proteins adsorbed on implant materials is a promising rapid method for testing biomaterials for compatibility with the body of a particular recipient.

Keywords: experiment, implants, modeling on animals, fractures, osteosynthesis, endoprosthetics, sensitization, biocompatibility, cellular and humoral immunity, hypersensitivity reaction to metals, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, diagnosis, treatment.

LIST OF PUBLISHED WORKS ON THE THEME OF THE DISSERTATION

Scientific works, which reflect the main scientific results of the research

1. **Lazarenko GO.** Hypersensitivity to metal in endoprosthesis: methods of diagnosis and treatment (literature review). *Annals of Traumatology and Orthopedics* 2016;1–2 (33–34):194–200. *(The dissertation student collected material, analyzed literary sources on the problem, formulated conclusions, prepared materials for publication).*

2. Yai Hryshchuk, TA Alekseeva, MT Kartel, OM Lazarenko, **GO Lazarenko**, PM Lytvyn, etc. Testing using atomic force microscopy of individual compatibility of allografts with the recipient's body. *Clinical surgery.* 2016; 7: 61–63. *(The dissertation student collected material, analyzed literary sources on the problem, formulated conclusions, prepared materials for publication).*

3. Boiko IV, Zaft VB, **Lazarenko GO**, Lazarenko OM, Alekseyeva TA, Kartel NT, Lytvyn PM. Testing the compatibility of the orthopedic implants material with recipient body in arthroplastic using atomic force microscopy (AFM). *Juniper Online Journal of*

Orthopedic & Orthoplastic Surgery 2018; 1(5): P 86–90. *(The dissertation student collected material, analyzed literary sources on the problem, formulated conclusions together with the supervisor, prepared materials for publication).*

4. **Lazarenko HO**, Boiko IV. The method of atomic force microscopy as a possible tool for testing the biocompatibility of implants in traumatology and orthopedics practice. Wiadomości Lekarskie. 2022; 75(11(1)): 2614–2618. *(The dissertation student collected material, analyzed literary sources on the problem, formulated conclusions together with the supervisor, prepared materials for publication).*

5. **Lazarenko GO**, Boyko IV. Hypersensitivity reaction to orthopedic implants: current state of the problem (Literature review). TERRA ORTHOPAEDICA. 2022;(3(114)): 61–72. *(The dissertation student collected material, analyzed literary sources on the problem, formulated conclusions together with the supervisor, prepared materials for publication).*

6. **Lazarenko HO**, Savosko SI, Guzyk MM, Boiko IV. Features of using orthopedic implants on an experimental model of sensitization to nickel (Ni). Clinical and Preventive Medicine. 2023; (6(28)): *(The dissertation student collected material, analyzed literary sources on the problem, formulated conclusions together with the supervisor, prepared materials for publication).*

Publications certifying the approbation of research results

1. Boyko IV, Zaft VB, **Lazarenko GO**, Lazarenko OM, Alekseeva TA, Lytvyn PL. Individual biocompatibility of orthopedic implants with the recipient's body. The first scientific and practical conference of biomedical engineers and technologists of Ukraine "Current state and prospects of biomedical engineering and medical industry of Ukraine"; October 7-8, 2015; Kyiv *(The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it).*

2. IV Boyko, VB Zaft, **GO Lazarenko**, OM Lazarenko, TA Alekseeva, MT Kartel, etc. A method of testing the compatibility of the material of orthopedic implants with the recipient's body using atomic force microscopy (AFM). Scientific and practical

conference with international participation «Innovative trends in genetic and regenerative medicine»; November 9-10, 2017; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

3. **Lazarenko GO**, Zaft VB Testing the compatibility of implants during endoprosthesis of large joints using atomic force microscopy. Scientific and practical conference of young scientists dedicated to the 25th anniversary of the National Academy of Medical Sciences; March 23, 2018; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

4. **Lazarenko GO**, Lazarenko OM, Boyko IV, Alekseeva TA, Lytvyn PM. Atomic force microscope as a tool for testing the compatibility of implants in orthopedic and traumatological practice. Scientific and practical conference of young scientists «Prospects for the development of preventive and clinical medicine»; April 17-19, 2019; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

5. **Lazarenko GO**, Lazarenko OM, Boyko IV, Alekseeva TA, Lytvyn PM. Atomic force microscope, a place in orthopedic and traumatological practice. XVIII Congress of orthopedic traumatologists of Ukraine; October 9-11, 2019; Ivano-Frankivsk (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

6. **Lazarenko GO**. Preoperative compatibility testing of orthopedic implants using atomic force microscopy. Conference «BIOMED Talks 2019»; October 15-16, 2019; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

7. **Lazarenko GO**, Lazarenko OM, Boyko IV, Alekseeva TA, Lytvyn PM. Testing the compatibility of implants in orthopedic and traumatological practice. Scientific and practical conference «Problems and prospects of the development of clinical and preventive medicine and public health: interdisciplinary aspects»; October 2019; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

8. **Lazarenko HO**, Boyko IV. A method of testing the compatibility of the material of orthopedic implants with the recipient's body using atomic force microscopy (AFM). And International Scientific and Theoretical Conference The Process and Dynamics of the Scientific Path; 2021 October 26; Athens (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

9. **Lazarenko HO**. Testing of the compatibility of the orthopedic implants material with the recipient's body by using atomic force microscopy (AFM). And International Scientific and Theoretical Conference Theoretical and Practical Aspects of Modern Scientific Research; 2021 April 30; Seoul (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

10. **Lazarenko HO**. Biocompatibility testing of the orthopedic implants material using atomic force microscopy (AFM). And Correspondence International Scientific and Practical Conference Globalization of Scientific Knowledge: International Cooperation and Integration of Science; 2021 May 7; Vienna (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

11. **Lazarenko GO**. The method of preoperative testing of the compatibility of the material of orthopedic implants with the recipient's body using atomic force microscopy (AFM). Scientific and practical conference of young scientists «Modern achievements and prospects for the development of preventive and clinical medicine»; 2021 April 21; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

12. **Lazarenko GO**, Guzik MM, Savosko SI. Determination of hypersensitivity reaction to orthopedic implants (experimental study). «Tissue reactions in the norm, experiment and clinic». All-Ukrainian scientific and practical conference with international participation dedicated to the memory of professor Yu. B. Tchaikovsky; 2023 June 8–9; Kyiv (*The author of the dissertation prepared theses, collected material and summarized it*).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	19
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	25
РОЗДІЛ 1 ВИБІР ІМПЛАНТУ ДЛЯ ПАЦІЄНТА З ПІДТВЕРДЖЕНОЮ ГІПЕРЧУТЛИВІСТЮ ДО МЕТАЛІВ ПРИ ПЕРВИННОМУ ЕНДОПРОТЕЗУВАННІ СУГЛОБА (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	35
1.1. Реакції організму на чужорідні тіла.....	37
1.2. Тканинна та органна локалізація запальних реакцій.....	50
1.3. Діагностика.....	55
1.4. Наявні рішення проблеми.....	64
1.5. Висновки огляду літератури.....	67
РОЗДІЛ 2. ПРОГРАМА, ОБСЯГ ТА МЕТОДИ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НА МОДЕЛІ ТВАРИН.....	69
2.1. Матеріали та методи дослідження.....	69
2.1.1 Перший етап дослідження.....	71
2.1.2 Другий етап дослідження.....	82
2.2 Статистична обробка даних.....	91
РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЮ ОРГАНІЗМУ НА ОРТОПЕДИЧНІ ІМПЛАНТАТИ ПРИ НАЯВНОСТІ РЕАКЦІЇ ГІПЕРЧУТЛИВОСТІ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ НА ТВАРИНАХ (РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ).....	93
3.1. Імунізація тварин, імплантація нікелевих пластин та проведення лабораторних аналізів.....	98
3.1.1. Результати дослідження імунізації тварин, імплантації нікелевих пластин та проведення лабораторних аналізів.....	99

3.1.2. Висновки першого етапу дослідження.....	108
3.2. Проведення гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження тканин. Дослідження імплантатів з використанням методів скануючої електронної мікроскопії, атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії.....	109
3.2.1 Результати гістологічних, морфометричних, імуногістохімічні досліджень тканин та дослідження імплантатів з використанням методів скануючої електронної мікроскопії, атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії.....	109
3.2.2. Висновки другого етапу дослідження.....	150
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	
ДОСЛІДЖЕННЯ.....	153
ВИСНОВКИ.....	157
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	160
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	162
ДОДАТОК А.....	201
ДОДАТОК Б.....	202
ДОДАТОК В.....	203
ДОДАТОК Г.....	204
ДОДАТОК Д.....	205

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

316L	–	нержавіюча сталь
AB	–	assay buffer - аналітичний буфер
ACDS	–	the american contact dermatitis society (Американське товариство контактного дерматиту)
Ag	–	срібло
Al	–	алюміній
ALTR	–	adverse local tissue reactions, побічні реакції місцевих тканин
ALVAL	–	aseptic lymphocytic (lymphocyte-dominated) vasculitis-associated lesions, асептично лімфоцитарне (лімфоцит-домінуюче) васкуліт-асоційоване пошкодження
ARMD	–	adverse reaction to metal debris, несприятливий реакція на металеві частки
Au	–	золото
BCM	–	biotin-conjugate mixture
BeM	–	bead mixture
BSA	–	bovine serum albumin, бичачого сироваткового альбуміну
C	–	вуглевод
CASP1	–	caspase-1
Ce-Po	–	ceramic on polyethylene, пара тертя кераміка-поліетилен
Co	–	кобальт
Co-Cr	–	кобальт-хром
Co-Cr-Mo	–	кобальт-хром-молібден
Co-Cr-W-Ni	–	кобальт-хром-ванадій-нікель
CTL	–	cytotoxic t cell, цитотоксичні Т-клітин
Cu	–	мідь
DAMP	–	danger-associated molecular patterns, молекулярний фрагмент

	пов'язаний з «тривогою» або «небезпекою»
ECM	– extracellular matrix, позаклітинний матрикс
FBGC	– foreign body giant cells, гігантські клітини чужорідного тіла
FBR	– foreign body response, реакція на чужорідне тіло
FCA	– freund's complete adjuvant, повний ад'ювант Фрейнда
Fe	– залізо
FGF	– fibroblast growth factors, фактори росту фібробластів
GPMT	– guinea pig maximisation test – тест максимальної сенсибілізації морських свинок
IFN- γ	– interferon- γ , інтерферон- γ
IgA	– immunoglobulin A, імуноглобулін A
IgG	– immunoglobulin G, імуноглобулін G
IgM	– immunoglobulin M, імуноглобулін M
IgE	– immunoglobulin E, імуноглобулін E
IL	– interleukin, інтерлейкін
Ir	– іридій
LLNA	– local lymph node assay - аналіз локальних лімфатичних вузлів миші
LTT	– lymphocyte transformation test, тест трансформації лімфоцитів
LYDIA	– lymphocyte-dominated immunological answer, лімфоцит-домінуюча імунологічна відповідь
MCP-1	– monocyte chemoattractant protein 1, моноцитний хемоатрактантний пептид-1
M-CSF	– macrophage colony-stimulating factor – макрофагальний колонієстимулюючий фактор
MHC	– major histocompatibility proteins, головного комплексу гістосумісності

MHR	–	metal hypersensitivity reaction, реакції гіперчутливості до металу
MMPs	–	matrix metalloproteinases, матриксні металопротеїнази
Mo	–	молібден
MoM	–	metal-on-metal, пара тертя метал-метал
MoP	–	metal-on-polyethylene, пара тертя метал-поліетилен
Mr	–	марганець
N	–	азот
NaCl	–	хлорид натрію
NALP3	–	Nod-Like Receptor Protein 3, Nod-подібний рецептор 3
NET	–	Neutrophil extracellular traps, позаклітинні пастки
NF κ B	–	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells – ядерний фактор каппа В
Ni	–	нікель
NiSO ₄	–	сульфат нікеля
NO	–	оксид азоту
P	–	фосфор
PDGF	–	platelet-derived growth factors, фактори росту тромбоцитів
PRR	–	pattern recognition receptor, рецептор розпізнавання патернів
Pt	–	платина
RANK-L	–	Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B Ligand, рецептор активації ядерного фактора-каппа В ліганду
S	–	сірка
Si	–	кремній
Ta	–	тантал
TCR	–	T cell receptor, Т-клітинним рецептором
TGF β	–	transforming growth factor β , трансформуючий фактор росту β

Th	–	T- helper cell, Т-хелпери
Th0	–	Т-хелперні лімфоцити типу 0
Th1	–	Т-хелперні лімфоцити типу 1
Th2	–	Т-хелперні лімфоцити типу 2
Ti	–	титан
Ti-6Al-4V	–	титан-алюміній-ванадій
TNF- α	–	tumor necrosis factor- α , фактор некрозу пухлини α
Treg	–	regulatory T cells, регуляторні Т-клітини
VCAM	–	vascular cell adhesion molecule, молекул адгезії судинних клітин
VEGF	–	vascularen dothelial growth factors, фактори росту ендотелію судин
W	–	ванадій
Zn	–	цинк
АСМ	–	атомно-силова мікроскопії
АТФ	–	аденозинтрифосфорная кислота
ВСА	–	розчин біцинхонінової кислоти
ДСН	–	додецилсульфату натрію
ЕДТА	–	етилендіамінтетраоцтова кислота
ПААГ	–	поліакриламідному гелі
РКД	–	рандомізоване контрольоване дослідження
СЕМ	–	скануюча електрона мікроскопії

ВСТУП

Актуальність теми.

Тема реакції гіперчутливості до металів (РГМ) входить до переліку одних з найбільш суперечливих та складних в ортопедо-травматологічній практиці.

Більшість металів, які містяться у імплантах, є імунологічно активними та спричиняють алергічні реакції.

Реакції гіперчутливості — це функція адаптивної імунної системи. За класифікацією Gell та Coomb's вони розділяються на: Тип I, Тип II (опосередковані антитілами), Тип III і Тип IV (опосередковані клітинами, відстрочений). Переважна більшість РГМ в ортопедичних імплантатах є IV тип/реакції гіперчутливості уповільненого типу.

У закордонних публікаціях доволі часто описуються реакції організму після впливу на нього предметів, які містять метал, про схожі реакції після встановлення ортопедичних імплантатів згадується набагато рідше.

Перше згадування про РГМ, спричинену металевим ортопедичним імплантом, було опубліковано у 1966 р авторами Fousseureau and Laugier. Описувався випадок пацієнта з екзематозним дерматитом після встановлення металевої пластини.

Після цієї публікації з'явилося багато повідомлень в статтях про подібні реакції на металеві імплантати, включаючи стоматологічні, серцево-судинні, пластичні та ортопедичні.

В інших дослідженнях та огляді літератури Hallab et al. виявлено, що поширеність алергії на метали становить ~25% у пацієнтів з стабільними компонентами суглобів у порівнянні з 60% у пацієнтів з нестабільними імплантами.

Хоча зв'язок між виникненням ускладнень після встановлення металевих імплантатів та появою алергічних реакцій добре задокументований, це залишається відносно непередбачуваною, погано вивченою і обговорюваною темою.

Існує значна поширеність контактної алергії на метали, найрозповсюдженішими сенсibilізаторами серед них це нікель (24,4%), берилій, кобальт (8,8%), хром (5,9%), тантал, титан (0,2-3%) було показано, що ванадій також викликає РГМ.

Найчастіше причиною розвитку алергії на метали є контакт з ювелірними виробами, але можуть бути й інші чинники. Під час робочого процесу, наприклад такого як обробка шкіри/дублення, сантехнічних, перукарських робіт, металообробки, пломбування зубів та встановлення медичних імплантатів, у текстильній промисловості, сільському господарстві. Також через користування мобільним телефоном, застілками для одягу та інше. Нарешті, це може статися через наявність слідів металів у тютюнових, косметичних виробках, у їстівних продуктах та у питній воді.

Ортопедичні імплантати частіше складаються з нержавіючої сталі 316L (19% хрому та 14% нікелю), кобальт-хрому-молібдену (67% хрому, 30% кобальту, 2% молібдену та 1% нікелю) та титанових сплавів (91% титану, 5% алюмінію, 3,9% ванадію та 0,1% нікелю).

Найчастіше викликає РГМ нікель, який зазвичай входить до складу ортопедичних імплантатів завдяки своїй здатності надавати імпланту необхідну міцність та довговічність.

Різні іони металів, що вивільняються під час корозії, можуть спричинити різні реакції, наприклад, нікель може призвести до нестабільності імплантату, водночас хром частіше викликає шкірні прояви.

На відміну від іонів металу, частинки поліетилену та поліметилметакрилату відносно великі, та не викликають такої ж імунної відповіді. Поліетилен не викликає контактного дерматиту, та на даний момент немає даних досліджень які б свідчили про наявність алергії на полімери. Однак повідомлялося про чутливість до кісткового цементу. Компоненти цементу, які найчастіше викликають реакцію,

включають акрилат, пероксид бензоїлу (ініціатор) та N, N-диметил-п-толуїдин (активатор) та гентаміцин.

РГМ може включати в себе такі реакції, як контактний дерматит, васкуліт, кропив'янка та еритема, а також порушення загоєння післяопераційної рани, псевдоінфекцію (реакція, що імітує інфекцію), набряки, синовіти, біль, скутість або обмеження рухів та асептичну нестабільність імплантів.

У пацієнтів з РГМ також спостерігаються локалізовані або генералізовані висипання, які можуть виникати приблизно у 35% пацієнтів. Вони частіше зустрічаються при тотальних ендопротезуваннях колінного суглоба порівняно з ендопротезуванням кульшового суглобу. Висип може бути папульозним, еритематозним, сверблячим або лускатим, і зазвичай локалізується біля післяопераційного рубця. Спочатку він може виникати локально на коліні (при тотальному ендопротезуванні колінного суглоба), але потім може поширитись по всьому тілі. Рідко можуть виникнути загальні ускладнення, такі як риніт, астма або випадіння волосся (алопецію). Також пацієнти можуть скаржитись на генералізовані артралгії.

З часом при проведенні рентгенологічного дослідження після протезування суглобів можуть виникати перипротезні люмінесцентні лінії, як явище асептичної нестабільності.

Діапазон часу появи перших проявів варіюється від 4 тижнів до 2 років. Найчастіше РГМ виникає жінок в період від 2 місяців до 2 років після ендопротезування суглоба.

Жінки, як правило, мають більш високий рівень чутливості до металів порівняно з чоловіками. Хром, наприклад, єдиний метал, на який чоловіки мають більшу чутливість, аніж жінки. Вважається, що це наслідок професійного впливу. Якщо порівнювати РГМ на нікель, він становить у жінок 17 %, а у чоловіків приблизно 3 %. Разючий контраст з кобальтом та хромом, де частота реакцій в загальній популяції значно нижча (від 1 % до 2 %).

Thyssen et al. дійшли висновку, що поширеність РГМ не залежить від віку, раси чи географічного положення.

Особливу увагу розвитку РГМ приділяють при тотальному ендопротезуванні суглобів.

Частота гіперчутливості до металів вища у пацієнтів з нестабільними протезами або з суглобами з парою тертя метал-метал (MoM).

В одному з досліджень згадувалося, що поширеність реакції гіперчутливості залежить від: наявності та стану протезу (більш високі показники гіперчутливості до металів після операції та при нестабільних імплантатах), типу з'єднання/пари тертя (вищі показники в пари тертя метал-метал) та кількості знайдених гаптенів.

Розповсюдженість шкірних проявів гіперчутливості до металів у загальній популяції оцінюється в 10-15%, хоча вважається, що у пацієнтів із встановленими металевими імплантатами вона може сягати навіть 25%.

Найважливішим залишається питання: чи імпланти вийшли з ладу через руйнування компонентів у зв'язку з реакцією гіперчутливості чи нестабільні імпланти стали причиною виникнення реакції гіперчутливості.

РГМ є діагностично складними, оскільки вони є діагнозом виключення. Достеменно невідомо, які біомаркери можуть достовірно передбачити потенційну патологічну реакцію на імпланти.

У будь-якому випадку, перед тестуванням реакції на метал, що містить імплант, спочатку повинні бути виключені більш поширені фактори, включаючи: інфекцію, нестабільність, знос імплантату та/або перелом.

Наразі, існує обмежена кількість підходів передбачити або діагностувати несприятливі реакції на метал. Найбільш поширеними є такі діагностичні тести, як патч-тестування та тест на трансформацію лімфоцитів, однак немає чіткої настанови щодо того, як ці тести слід використовувати в клінічних умовах.

Кількість пацієнтів з тотальним ендопротезуванням суглобів з позитивними тестами на РГМ зростає експоненціально протягом останніх 20 років. Оскільки

число ендопротезування та використання ортопедичних імплантатів продовжує зростати, очікується, що кількість ускладнень пов'язаних з реакцією на імпланти, також зросте. Так, згідно з проведеними підрахунками приблизно 11 мільйонів людей будуть жити з тотальним ендопротезуванням кульшового або колінного суглобів до 2030 р.

Таким чином, оцінка РГМ ортопедичного імплантату стає все актуальнішою проблемою сучасної імплантології.

Подальше дослідження дасть глибше розуміння фундаментальної запальної та імунологічної реакцій на метали, що входять до складу імплантів. Це в свою чергу полегшить ідентифікацію клінічно корисних призначень, необхідних для розробки діагностичних або прогностичних тестів для пацієнтів з металевими імплантатами.

Існуючі прогалини та недоліки підкреслюють необхідність проведення нових, клінічно значимих діагностичних та прогностичних перед імплантаційних тестів для визначення ймовірності алергічної відповіді, викликаной імплантатом та адекватної оцінки всього спектру можливих реакцій після імплантації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планової науково-дослідної роботи ДНУ «НПЦ ПКМ» ДУС «Оптимізація надання спеціалізованої та високоспеціалізованої медичної допомоги хірургічного профілю на принципах «хірургії швидкого шляху» при окремих захворюваннях щитоподібної та прищитоподібних залоз, внутрішніх та репродуктивних органів, черевної стінки, судин і суглобів, зокрема з використанням атомно-силової мікроскопії та із застосуванням методу преламінації для обробки імплантів», номер державної реєстрації 0119U001046 (ДНУ «НПЦ ПКМ» ДУС).

Мета дослідження. Дослідження реакції гіперчутливості на ортопедичні імпланти, встановлення впливу реакції організму на поверхню імплантатів та

визначення індивідуальної сумісності імплантатів в ортопедо - травматологічній практиці.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз даних літератури, щодо ускладнень пов'язаних з використанням імплантатів, вивчити досвід інших країн.
2. Дослідити реакцію організму на ортопедичні імплантати при наявності реакції гіперчутливості в експериментальній моделі на тваринах.
3. Встановити впливу реакції організму на поверхню імплантатів із використанням лабораторних, гістологічних та фізичних методів дослідження.
4. Розробити та апробувати фізичний метод тестування імплантатів для досягнення оптимальної сумісності з організмом в експериментальній моделі на тваринах.
5. Визначити ефективність фізичного методу тестування шляхом досліджень поверхонь різних імплантатів при тестуванні на сумісність в експериментальній моделі на тваринах.

Об'єкт дослідження. Піддослідні (експериментальні) тварини – щури.

Предмет дослідження. Кров піддослідного (біопрепарат), імплантати (металоконструкції), які будуть встановлені (вилучені) та тканини навколо імплантатів.

Методи дослідження.

1. Антропометричні: вага, зріст;
2. Вушна проба на Ni;
3. Лабораторні:
 - клінічний аналіз: загальний аналіз крові - підрахунок загальної кількості лейкоцитів;
 - протокова цитофлуориметрія - оцінка вмісту цитокінів: IFN- γ , IL-4, TNF- α та MCP-1;
 - отримання зразків IgG;

- вимірювань концентрації IgG;
- імуноферментний аналіз - оцінка вмісту IgG специфічних до білкових комплексів з нікелем;

3. Скануюча електронна мікроскопія (SEM) поверхні інтактних та вилучених імплантатів;

4. Дослідження зразків імплантів методами стаціонарної краплі, атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії в контактному режимі як нанобіосенсор для встановлення індивідуальної сумісності поверхні імплантату з організмом;

5. Гістологічні, морфологічні та імуногістохімічні методи дослідження тканин навколо імплантату.

Експерименти на тваринах було проведено у віварію Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України згідно договору № 1/10-136

Наукова новизна дослідження. Вперше проведено дослідження реакції організму на ортопедичні імплантати на експериментальній тваринній моделі штучно викликаний реакції гіперчутливості. На розробленій модифіковану модель сенсibilізації піддослідних тварин (щурів) на Ni, в якій досліджено реакцію організму та вплив реакції організму на поверхню ортопедичного імпланта з Ni з сенсibilізацією на Ni та без неї. Розроблено та апробовано фізичний метод тестування імплантатів за допомогою методів атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії з отриманими IgG на експериментальній моделі з штучною сенсibilізацією на Ni для визначення можливості виникнення реакції на імпланта. На експериментальній тваринній моделі вперше визначено показники сумісності імплантатів за допомогою фізичного метода тестування на модифікованій моделі сенсibilізації до Ni.

Практичне значення одержаних результатів. Отриманні результати проведених закордонних літературних даних дадуть змогу поліпшити ефективність діагностику та тактику лікування ускладнень у пацієнтів пов'язаних з

використанням імплантів та з реакцією гіперчутливості до металів. Проведені експериментальні дослідження на тваринах з штучно викликаної сенсibiliзацією дозволяє на новому рівні поглянути на реакції організму та вплив організму на імпланти в ортопедо-травматологічній практиці. Проведення тестування ортопедо-травматологічних імплантів запропонованим методом за допомогою атомно-силової мікроскопії з IgG реципієнта поліпшить встановлення можливого виникнення реакції на імплант.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом разом з науковим керівником було обрано тему дисертаційного дослідження, складено план та розроблено схему й основні етапи виконання роботи.

Дисертантом проведений інформаційно-патентний пошук літератури з досліджуваної проблематики, визначено актуальність, мету та завдання дослідження. Разом з науковим керівником розроблено та складено дизайн дослідження, сформовано групи. Дисертантом здійснена експериментальна робота.

Дисертантом самостійно проаналізовані усі отримані дані та результати дослідження, написані розділи дисертації, проведений аналіз та сортування даних, сформовано висновки та практичні рекомендації.

Здобувачем підготовлено виступи на наукових конференціях та конгресах, опубліковані наукові статті та тези. Власними силами підготовлені та оформлені матеріали до друку, здійснено літературне редагування дисертації.

Дисертаційна робота виконувалась на базі Державної наукової установи «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації представлені та обговорені у доповідях та тезах доповідей, представлених автором:

а) на міжнародному рівні:

науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (м. Київ, 9-10 листопада 2017 р.);

першій міжнародній науково та теоретичній конференції «Процес та динаміка наукового шляху» (м. Афіни, 26 лютого 2021 р.);

першій міжнародній науково та теоретичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти новітніх наукових досліджень» (м. Сеул, 30 квітня 2021 р.);

першій заочній міжнародній науково-практичній конференції Глобалізація наукових знань: міжнародне співробітництво та інтеграція науки (м. Відень, 7 травня 2021 р.);

б) на національному рівні:

першій науково-практичній конференції біомедичних інженерів і технологів України «Сучасний стан та перспективи біомедичної інженерії і медичної промисловості України» (м. Київ, 7-8 жовтня 2015 р.);

науково-практичній конференції молодих вчених, присвячена 25-річчю Національної Академії Медичних Наук, (м. Київ, 23 березня 2018р.);

науково-практичній конференції молодих вчених «Перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини» (м. Київ, 17-19 квітня 2019р.);

XVIII з'їзді ортопедів-травматологів України, (м. Івано-Франківськ, 9-11 жовтня 2019р.);

конференції «BIOMED Talks 2019» (м. Київ, 15-16 жовтня 2019р.);

науково-практичній конференції молодих вчених «Сучасні досягнення і перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини» (м. Київ, 21 квітня 2021р.);

всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвячена пам'яті професора Ю. Б. Чайковського «Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці» (м. Київ, 8–9 червня 2023 р.)

Академічна доброчесність та питання текстових запозичень. Згідно статті 42 Закону України «Про освіту» від 05.09.2017 р. (№ 2145-VIII) здобувач в своїй дисертаційній роботі дотримувався академічної доброчесності, що підтвердила Комісія з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень при ДНУ «НПЦ ПКМ» ДУС (протокол № 07 від 16.11.2023 р.). Також була проведена перевірка файлу дисертації програмним забезпеченням Unicheck щодо текстових запозичень (довідка № 23 від 12.12.2023 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації в наукових спеціалізованих виданнях опубліковано 6 наукових праць, зокрема 4 – у наукових фахових виданнях, затверджених МОН України, 1 стаття у журнал держави Європейського Союзу (Польща), 1 стаття у міжнародний журнал (США), 3 з них входять до міжнародної наукометричної бази Scopus. Отримано 2 патенти України на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація викладена на 208 сторінках і складається із вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, власних досліджень, аналізу та узагальнення власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, 5-ма додатками. Дисертація ілюстрована 11-ма таблицями та 54-ма рисунками. Список використаних джерел містить 316 джерел, із них 313 латиницею та 3 кирилицею.

РОЗДІЛ 1

ВИБІР ІМПЛАНТУ ДЛЯ ПАЦІЄНТА З ПІДТВЕРДЖЕНОЮ ГІПЕРЧУТЛИВІСТЮ ДО МЕТАЛІВ ПРИ ПЕРВИННОМУ ЕНДОПРОТЕЗУВАННІ СУГЛОБА (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Імпланти регулярно використовуються для лікування багатьох захворювань майже в кожній медичній спеціальності. Під терміном імплантат розуміють широкий спектр медичних пристроїв, від твердих металевих імплантатів, таких як ортопедичні пластини/гвинти, до біоелектронних пристроїв, таких як кардіостимулятори або нейростимулятори. Деякі імпланти є тимчасовими і призначені для видалення або заміни, тоді як інші призначені для постійного використання.

Лише за останні 100 років імпантовані медичні пристрої стали звичним явищем у людському житті сфері охорони здоров'я.

Перші спроби використання металевих імплантатів, не враховуючи зубні імпланти відбулися наприкінці 19 століття з розробкою «пластини Лейна», яка була внутрішньою фіксуючою пластиною для лікування переломів кісток [1-3].

Однак ці перші пристрої, виготовлені з різних сплавів, доступних на той час, мали передумови до корозії [2, 3].

Розробка нержавіючої сталі та віталію (сплав кобальт-хром-молібден) на початок 1900-х років стала знаковою подією та відправною точкою для розробки сучасних металевих імплантатів [2, 4-6].

Звідти використання металевих імплантів продовжувало поширюватися в ортопедії, стоматології та кардіології у середині ХХ століття [3, 6-10].

Перше покоління кульшових протезів було представлено в 1950-х і 1960-х роках та включало конструкції з парою тертя «метал - метал» (metal on metal MoM) зі сплаву кобальт-хром (Co-Cr) [8].

У наступні роки технологічний прогрес дозволив використовувати імплантати з металів майже в усіх медичних спеціальностях для лікування та ведення багатьох захворювань.

Історично найпоширенішими металами, що використовувалися для імплантатів, були нержавіюча сталь (сплави на основі заліза), сплави на основі Со, чистий титан (Ti) та сплави на основі титану (Ti-6Al-4V).

Різні тугоплавкі метали (метали, які важко піддаються плавленню або корозії), такі як молібден (Mo), вольфрам (W), тантал (Ta), також використовувалися в матеріалах для імплантації.

Благородні метали, такі як золото (Au), срібло (Ag), платина (Pt) та іридій (Ir), використовуються більше в імплантатах з електронними компонентами [11].

Деякі метали, які зазвичай містяться в імплантах, наприклад такі як мідь (Cu), цинк (Zn), залізо (Fe), марганець (Mn) і кобальт (Co) є критично важливими для структури та функції багатьох білків та ферментів, які потрібні лише в невеликих кількостях.

Інші метали, що використовуються в імплантатах, наприклад нікель (Ni), титан (Ti) і алюміній (Al) не є необхідними для обмінних процесів в організмі людини. Метали які присутні у досить високих концентраціях, можуть заважати нормальній життєдіяльності організму та призводити до місцевих та системних реакцій гіперчутливості. Використання конкретного металу або сплаву залежить від мети застосування.

Наприклад, хірургічна нержавіюча сталь (316L) відома своєю високою міцністю та гарною пластичністю, але має свої недоліки [11].

Як наслідок, нержавіюча сталь зазвичай використовується в пристроях для фіксації переломів та/або тимчасових імплантатах, які планується видалити пізніше.

З іншого боку, сплави на основі Со (наприклад, Co-Cr-Mo, Co-Cr-W-Ni) є високостійкими до корозії, мають вищу міцність і твердість, але мають нижчу

пластичність та їх важче обробляти [11-13]. Тому сплави на основі Со більше використовуються в довгострокових постійних імплантатах, а також в тих імплантатах, що вимагають високої зносостійкості, таких як ендопротези кульшових та колінних суглобів [11].

Останні розробки в галузі хімії поверхні та матеріалів, металургії та виробництві продовжують стимулювати інновації в дизайні матеріалів, які використовуються в металевих імплантатах.

1.1. Реакції організму на чужорідні тіла

Реакції гіперчутливості

Тема реакції гіперчутливості до металів (РГМ) входить у перелік як одна з найбільш суперечливих та складних в ортопедо-травматологічній практиці [14].

За своєю суттю реакція гіперчутливості — це функція адаптивної імунної системи. За класифікацією Gell та Coomb's вони розділяються на: Тип I, Тип II (опосередковані антитілами), Тип III і Тип IV (опосередковані клітинами, відстрочений) [15, 16].

Реакція гіперчутливості I типу виникає коли антиген, зв'язаний з імуноглобуліном (Ig) E, викликає дегрануляцію тучних клітин з подальшим вивільненням вазоактивних біомолекул, які викликають імунну відповідь від декількох секунд до хвилин (анафілаксія) [17].

При реакції гіперчутливості I типу виявляються макрофаги та багатоядерні гігантські клітини, в яких можна виявити частинки зносу імпланту. Частинки (більше 5 μm) частіше всього, виявляються у багатоядерних гігантських клітинах, тоді як дрібні частинки (менше 1 μm) - в макрофагах.

Під час реакції гіперчутливості 2 типу антиген, розташований на мембрані клітини (який входить у її склад або абсорбований) розпізнається імуноглобуліни (Ig) класу M та G та\або білками системи комплементу після чого відбувається руйнація клітини шляхом імуноопосередкованого фагоцитозу або

комплементоопосередкованого цитолізу або антитілозалежної клітинної цитотоксичності.

Цю реакцію можна діагностувати гістологічно, шляхом виявлення та кількісного визначення нейтрофільних гранулоцитів. Це можна зробити за допомогою дослідження криозрізів або парафінових зрізів [18].

Реакції гіперчутливості III типу – це комбінація реакцій гіперчутливості I та II типу. Під час неї антитіла класів Ig G та Ig M створюють з розчинними антигенами імунні комплекси, які відкладаються на стінках судин та базальних мембранах, коли є брак комплементу, який їх лізує.

РГМ, як правило, це алергічна реакція IV типу. При ній імплантовані металеві компоненти (динамічні або статичні) зазнають певного ступеню гальванічної корозії, коли вони контактують з рідинами, які містяться в тканинах, з подальшим виділенням іонів металів.

У реакціях, пов'язаних з гіперчутливістю типу IV, іони металів, що вивільняються з імплантатів, вважаються гаптенами (хімічні компоненти, які занадто малі, щоб самі по собі викликати цей тип імуногенної відповіді, але здатні зв'язуватися з ендogenousними (внутрішніми) білками з утворенням гаптен-білкових комплексів, які діють як антиген). Після поглинання макрофагами, іони металів зв'язуються з білками, які ідентифікуються антигенпрезентуючими клітинами [19, 20].

Антигенпрезентуючі клітини демонструють метало-антигенний комплекс для Т-клітин, що призводить до подальшої активації клітин CD4 +, CD8 + та макрофагів, з подальшим вивільненням прозапальних факторів, які є ключовими медіаторами реакцій гіперчутливості. Прозапальні цитокіни такі як: фактор некрозу пухлини α (TNF- α), інтерферон- γ (IFN- γ), інтерлейкін (IL-1, IL-2, IL-6), рецептор активації ядерного фактора-каппа В ліганду (Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa B Ligand, RANK-L) призводять до імунної відповіді, яка може спричинити запалення тканин з подальшим пошкодженням навколишніх тканин.

Іони металу можуть пошкоджувати клітини та активувати специфічні імунні та запальні шляхи, що призводить до - розвитку реакції гіперчутливості. Частинки, які поглинаються макрофагами, можуть призвести до запалення та тканино-деструктивних реакцій різного ступеня.

Специфічні реакції місцевої тканини залежать від матеріалу імпланту або біоматеріалу.

Процес імплантації - це цілеспрямоване пошкодження нативної тканини, що в свою чергу, активує каскад реакцій направлених на загоєння ран.

Раннє залучення нейтрофілів протягом перших трьох днів призводить до подальшого запалення. Нейтрофіли в місці рани протягом кількох днів витісняються макрофагами, які диференціюються *in situ* здебільшого з моноцитів, які потрапили у рани з кровотоку.

Макрофаги є основними джерелами трансформуючий фактор росту β (transforming growth factor β , TGF β), сімейства цитокінів, які відіграють важливу роль в організації фіброгенезу та ремоделювання тканин [21-23].

Відповіді макрофагів на інструктивні сигнали можуть керувати профіброзними та проангіогенними транскрипційними та метаболічними програмами, описаними як «альтернативно активована» поляризація або M2 - подібні макрофаги [24, 25].

Фактори росту тромбоцитів (platelet-derived growth factors, PDGF), TGF β , фактори росту фібробластів (fibroblast growth factors, FGF) і фактори росту ендотелію судин (vascularen dothelial growth factors, VEGF) також сприяють проліферації ендотеліальних клітин, внутрішньо зв'язуючи фіброгенні сигнали з ангіогенними [26, 27].

На наступній фазі, у проміжку між 2-им та 10-им днями, утворюється грануляційна тканина шляхом створення фібробластами позаклітинного матриксу (extracellular matrix, ECM) та неоваскуляризації проліферуючим ендотелієм [28].

Вироблення фібробластами колагенів I і III типів має вирішальне значення для стабільності ЕСМ у рані, яка загоюється. Глікозаміноглікани, еластичні волокна та інші глікопротеїни, отримані з фібробластів, моделюють механічні та структурні властивості ЕСМ [29].

Міофібробласти представляють ще більш спеціалізовану групу фібробластів, збагачену для експресії активних гладких м'язів, що полегшує скорочення утвореної рубцевої тканини [30].

Передача сигналів між фібробластами та клітинами запалення, таких як M1-подібні макрофаги, також може викликати вивільнення прозапальних медіаторів, таких як IL-6 та IL-8, що посилюють запалення [31, 32].

Процеси загоєння ран можуть бути ускладнені металевими часточками, які утворюються в результаті зношування або корозії поверхні імпланту. Уповільнене загоєння може бути ознакою, пов'язаною з довгостроковими несприятливими наслідками при різних умовах імплантації [33-35].

Реакція організму на чужорідне тіло

Загоєння ран та інші відповіді організму господаря на металеві імплантати включають у себе вроджені імунні механізми, які разом описуються як реакція організму на чужорідне тіло (foreign body response, FBR).

FBR можна охарактеризувати як скоординований каскад запальних і клітинних механізмів, які є критичними на післяопераційному етапі [36].

Імунні відповіді можуть призвести до несприятливих реакцій в місцевих тканинах (adverse local tissue reaction, ALTR), включаючи остеоліз, некроз тканин, утворення псевдопухлин, грануляцію тканини та ущільнення фіброзної капсули [37].

У більшості випадків відразу після імплантації адсорбція білка господаря на поверхні імплантату ініціює FBR. Пошкодження тканин господаря швидко супроводжується активацією: коагуляції, системи комплементу та адсорбції білків, включаючи фібриноген, фібрoneктин, вітронектин та глобуліни на поверхні

імплантату. Ця гетерогенна суміш білків є реакцією на стрес. Компоненти позаклітинного матриксу утворюють матрицю на імплантаті та навколо нього [38]. З часом залучення імунних клітин (особливо макрофагів) призводить до утворення гігантських клітин чужорідного тіла (foreign body giant cells, FBGC) та фіброзної інкапсуляції імплантату [39].

Ранні зрушення у відповідь на імплантат та, як наслідок, незначні відхилення від стандартних реакцій, можуть мати значні наслідки у подальшому. Як і у випадку з іншими видами біологічних каскадних реакцій, порушення стандартної програми можуть виникати через перехресні взаємодії між кількома каскадами, та через прояви імунної відповіді, які не пов'язані з імплантатом.

Дана реакція проходить протягом одного-двох тижнів після імплантації. Неможливість усунути гостре запалення в даний період призводить до переходу у хронічний процес, який може прискорити розвиток ALTR і спричинити нестабільність імплантату [40, 41].

Вроджена імунна реакція

Механізми вродженого імунітету є критично важливими, вони першими реагують на імпланти. Численні фактори впливають на природу та прояв вродженої реакції на металеві імпланти, подальші запальні та імунні реакції та на подальший перебіг процесів імплантації. Елементний склад, фізична, хімічна, структурна форма металу може в подальшому вплинути на природу вродженої імунної відповіді, що виникає після імплантації.

Вроджене імунне розпізнавання металів

Розпізнавання та поглинання металевих часток ініціює каскад запальних реакцій включаючи утворення інфламмасоми та активацію рецептора розпізнавання патернів (pattern recognition receptor PRR) [42].

Лейкоцити гемопоетичного походження, що передають сигнали, отримані від пошкоджених негемопоетичних тканин господаря, також впливають на негайне пошкодження тканин із ранньою запальною та вродженою імунною реакцією.

Важливість сигналів, отриманих від тканин господаря, у забезпеченні початку запальних та вроджених імунних реакцій підтверджує тотожність цих сигналів до молекулярного фрагменту, пов'язаного з «тривогою» або «небезпекою» (“danger”-associated molecular patterns DAMPs) [43, 44].

Каскад запалення Nod-подібного рецептору - (Nod-Like Receptor Protein 3 NALP3) складається з мультибілкового комплексу, що містить NALP3 та ASC, який викликає активацію внутрішньоклітинних ферментів, що призводять до виробництва запальних цитокінів з імунних клітин, включаючи IL1 β та IL18 через активацію інтерлейкін-1 перетворюючого ферменту (*Caspase 1* CASP1) [45].

Завдяки механізму інфламмасоми NALP3 залишки металу, такі як іони та частки, індують секрецію прозапальних цитокінів і рекрутують клітини мієлоїдної лінії та запускає процес остеолізу [45, 46].

Металеві частинки різних розмірів та форм провокують розвиток інфламмасом NALP3, що може лежати в основі відмінностей локальних запальних проявів на різних поверхнях імплантів [47-52].

Рецептори розпізнавання патернів, прикладом яких є Toll-подібний рецептор-4 (Toll-like receptor 4 TLR4), також служать важливими тригерами запалення після розпізнавання ендогенних молекул «сигналу», що вивільняються пошкодженими тканинами, включаючи білки теплового шоку, фрагментами біглікану та гепарансульфатами [49].

Було виявлено, що іони металів та частинки безпосередньо активують TLR4, сприяючи локальне запалення та ремоделювання тканин шляхом стимулювання (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF κ B) - опосередкованого виробництва цитокінів [47, 50, 53-59].

На додаток до TLR4, надмірна реакція рецептора поглинача типу А (scavenger receptor type A SR-A), IL-33 та молекул адгезії інтегрину на клітинах мієлоїдної лінії, ще більше посилює реакцію на метал та спричинене ним пошкодження тканин [60].

Наявність сигналів запалення від пошкоджених тканин господаря провокує негайні запальні та вроджені імунні реакції в ранній період після імплантації. Однак довготривалі реакції на металеві часточки імплантатів, також можуть продовжувати продукувати запальні та імуногенні сигнали. Частинки або іони металів можуть індукувати апоптоз або некроз клітин, у тому числі реагуючих лейкоцитів [61-68].

Фізичні та хімічні характеристики металевих частинок можуть визначати апоптозний або некротичний процес в контексті інших запальних сигналів, налаштовуючи подальший перебіг запального процесу [69].

Пошкодження тканини, що проявляється як некроз у зв'язку з нестабільними або скомпрометованими імплантатами, може хронізувати ці дезадаптивні реакції [70].

Загалом ці результати підкреслюють, що рання реакція на металеві імплантати та їх частки може проходити кількома шляхами – як прямими (наприклад, розпізнавання рецептором іонів металу, частинок або поверхонь), так і непрямим (наприклад, розпізнавання сигналів, які вивільняються внаслідок пошкодження тканин) [59].

Ці численні механізми в подальшому можуть впливати на майбутній стан імпланту.

Вроджені клітинні реакції

Центральним механізмом у розвитку FBR є переважна інфільтрація періімплантатних тканин макрофагами – фагоцитуючими клітинами, що спеціалізуються на захисті від мікробних патогенів, видаленні пошкодженої тканини та загоєнні ран. Будучи вартовими вродженого імунітету, макрофаги експресують широкий спектр PRR. Запуск PRR, що експресується на макрофагах, викликає прозапальні реакції, важливі для антибактеріальної активності, профіброзного ремоделювання, індукції адаптивного імунітету, очищення та подальшого відновлення тканин [71-72].

Макрофаги постійно присутні у значній кількості в тканинах, що оточують імплантати, особливо у випадках скомпроментованості останніх [73-74]. Макрофаги та попередники моноцитів залучаються до місця імплантації хемоаттрактантами та факторами росту, включаючи трансформуючий фактор росту (TGF β), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), лейкотрієн B4 (LTB4) і фрагменти комплекменту [38].

Причиною активації макрофагів в місці імплантації можуть бути металеві залишки та DAMP, що вивільняються після пошкодження тканини та загибелі клітин. Даний процес призводить до виробництва прозапальних цитокінів, включаючи IL1 β , IL6, IL18 та TNF α , а також хемокіни CXCL8/IL8, CCL2/MCP-1 і CCL3/MIP-1 α та інші низькомолекулярні медіатори запалення, такі як оксид азоту, ліпіди, похідні від циклооксигенази-2, 4-гідроксиноненал, нітротирозин і білок B1 з високою рухливістю групи (high-mobility group protein B1HMGB1) [49, 75-78]. У взаємодії ці численні шляхи ще більше підсилюють клітинну інфільтрацію та запалення. Поглинання металевих частинок макрофагами шляхом фагоцитозу є ключовим механізмом, за допомогою якого імплантати можуть викликати запальні реакції [48, 49, 52, 79-81].

Фагоцитовані металеві частинки діаметром менше 10 мкм піддаються ендоцитозу та транспортуються до лізосом, де кисле мікрооточення цих везикул сприяє корозії частинок, стимулюючи подальше вивільнення видів іонів металу [65, 77, 78]. Оскільки металеві частинки стійкі до повної деградації лізосомами, вони не зникають після загибелі клітини, а навпаки збільшують запальний сигнал. Занадто великі частинки, які не може поглинути окрема клітина, можуть ініціювати злиття макрофагів, що призведе до утворення багатоядерних синцитованих гігантських клітин чужорідного тіла (foreign body giant cells FBGC) для секвестрування неперетравлених частинок. Цей процес, який отримав назву «розладнаний фагоцитоз», відіграє центральну роль у формуванні гранульом чужорідних тіл та в продовженні запальних реакцій пов'язаних з імплантатом [41, 82]. У пацієнтів із

нестабільними імплантатами при гістологічному дослідженні часто виявляють FBGC навколо великих металевих часток, навіть у глибоких тканинах [38, 49].

Наявність нейтрофілів також є канонічною ознакою гострої реакції на імплантовані пристрої, во непричетні до несприятливих реакцій на металеві імплантати та металеві уламки. Нейтрофіли швидко мобілізуються до місця протягом 2-3 днів після імплантації, однак їх тривалість життя *in situ* недовга. Виробництво IL-1 α , IL-1 β та TGF β макрофагами у відповідь на металеві уламки посилює залучення нейтрофілів [46, 83].

Цю швидку реакцію нейтрофілів можна охарактеризувати як гостру дуже локалізовану стресову реакцію через вивільнення протеаз, лізоцимів і реактивних радикалів у формі позаклітинних пасток (neutrophil extracellular traps NET), сприяючи опсонізації, кліренсу та видаленню в місці імплантації [84-86].

Деякі з цих механізмів залучають нейтрофіли до початкового виробництва металевих часточок через виробництво окислювачів і прозапальних хемокінів і цитокінів [87-90]. Постійне і тривале накопичення нейтрофілів після реакції на чужорідне тіло може бути індикатором неадаптивних реакцій на металевий імплант, потенційно передбачаючи несприятливі події, зокрема септичні форми несприймання імплантату [70].

Тучні клітини також беруть участь у гострих запальних реакціях на металеві імплантати та можливо бути пов'язані з нестабільністю протезу. Вивільнення гістаміну тучними клітинами, які знаходяться у тканинах, є сигналом до залучення фагоцитуючих клітин до місця імплантації, шляхом стимулювання експресії молекул адгезії на ендотеліальних клітинах [91, 92].

В гістологічних зразках перипротезних тканин також наявні дендритні клітини та еозинофіли [93]. Хоча ролі цих типів клітин у біологічних реакціях на метали менш зрозумілі, дендритні клітини дуже важливі у розвитку Т-клітинних відповідей, а саме реакцій Т-клітин пам'яті [94].

Адаптивна імунна реакція

Багато досліджень підтверджують участь адаптивного набутого імунітету в нормальних біологічних реакціях на металеві імплантати, однак більшою мірою дослідження зосереджені на ролі неадаптивних набутих імунних механізмів у патологічних реакціях на часточки металевого дебрису. Гістологічні дані демонструють спільну локалізацію лімфоцитів із макрофагами та гігантськими клітинами у фіброзних тканинах, що оточують протези та інші металеві імплантати, особливо в контексті несправних імплантатів [95-97].

Крім того, лімфоцити виділені з тканин, що оточують імплантати, реагували на стимуляцію іонами металів [98-99]. Лінії лімфоцитів, включаючи Т-клітини та В-клітини, містять властивості «пам'яті» тривалого набутого імунітету завдяки вибіркового механізму та розподілу специфічних клонів лімфоцитів. Крім того, ці клітинні лінії є центральними в організації залучення, активації та ефекторних функцій інших клітин імунної системи.

Наприклад, ектопічні лімфоїдні структури часто зустрічаються в перипротезних тканинах - у випадках нестабільності імплантів [34, 100].

Всі описані докази свідчать про те, що металеві імплантати можуть викликати певну імунну «пам'ять». Переважання лімфоцитів у деяких формах імплант-асоційованих ектопічних лімфоїдних структур призвело до класифікації цих несприятливих реакцій як асептично лімфоцитарне (лімфоцит-домінуюче) васкуліт-асоційоване пошкодження (Aseptic Lymphocytic (Lymphocyte-dominated) Vasculitis-Associated Lesions ALVAL) [33-35].

Залишаються значні прогалини в розумінні ролі адаптивного набутого імунітету в нормальних реакціях на імплантацію, нестабільність імплантату та інші побічні явища. Хоча було показано, що алергія на метал є однією з найпоширеніших форм гіперчутливості [102], причинно-наслідковий зв'язок між алергічними реакціями та побічними явищами на металеві імпланти залишається дискутабельним питанням [103-106].

Т-клітинам потрібна споріднена взаємодія між Т-клітинним рецептором (T cell receptor TCR) та антигенним пептидом, вбудованим у головні білки гістосумісності (major histocompatibility proteins МНС), які знаходяться на поверхні антигенпрезентуючих клітин. Було припущено, що іони металів діють як гаптени, утворюючи координаційні внутрішньомолекулярні комплекси з білками МНС та антигенними пептидами [107, 108]. В інших дослідженнях припускається, що іони металів можуть каталізувати перехресне зшивання комплексу TCR/МНС [109-111]. Відмічається, що у осіб із стабільними компонентами Т-клітини постійно наявні в тканинах прилеглих до імплантатів, а також у проксимальних ектопічних лімфоїдних структурах [34, 100, 112, 113].

Хоча присутність Т-клітин поблизу імплантату за своєю суттю не вказує на дезадаптивну реакцію, гістологічні дані свідчать про те, що слід враховувати кількість присутніх клітин, оскільки Т-клітин набагато більше в тканинах, що оточують нестабільні імпланти [99, 114]. А кількість циркулюючих Т-клітин у периферичній крові, навпаки не пов'язана з ALTR, [98, 111], хоча їх кількість Т-клітин зазвичай зменшується після імплантації [115, 116].

Розбіжність цих результатів свідчить про те, що патологічно дезадаптивні реакції Т-клітин можуть бути більш значущими в місцях імплантації та в сусідніх тканинах, ніж у кровообігу.

Крім того, наявність Т-клітин, що реагують на метал, не обов'язково може бути причиною несприятливої відповіді. Функціональна спеціалізація та ефекторне програмування цих типів клітин, пов'язане з диференціацією лінії, що може бути більш важливим результатом як показник скоординованих відповідей [19, 117]. Функціональна відповідь CD4⁺ Т-хелперів (Th) на металеві імпланти залежить від вмісту матеріалу та часто корелює з концентрацією металів у крові. CD4⁺ Т-клітини отримані з крові або з тканин демонструють ознаки чутливості до металевих антигенів, включаючи проліферацію, експансію та фенотипові маркери, пов'язані з активацією [113, 118-123].

Участь CD4⁺ Т-клітин у відповідях на металеві імпланти вказує на те, що цитокіни, які виробляються цими клітинами, є важливими медіаторами в загальній координації імунних відповідей на метал. Цитокіни в свою чергу пов'язані з ефекторною диференціацією CD4⁺ Т-клітин та їх функціональною координацією інших імунних ефекторів. Вони були виявлені у пацієнтів з металевими імплантами, включаючи: Th1 (наприклад, інтерферон-гамма IFN γ і фактор некрозу пухлини-альфа TNF α), Th2 (наприклад, IL-4, IL-5, IL-13), Th17 (наприклад, IL-17), Th9 (наприклад, IL-9) і регуляторні Т-клітини (Tregs, наприклад, IL-10, TGF β) [84, 98, 111, 115, 124-129].

Регуляторні Т-клітини (regulatory T cells Tregs) беруть участь у загоєнні ран через ослаблення запальної передачі сигналу IFN γ та залучення макрофагів [130]. Останні дані свідчать про те, що клітини Th17, що продукують IL-17, опосередковують локальне хронічне запалення у відповідь на металевий імплантат [131].

Важко проаналізувати всі ці дослідження, щоб зробити висновки про переважання між цими різноманітними підгрупами клітин і більше того, відмінності в патологічних результатах та методології [129].

В дослідженнях, моделювання на тваринах підтверджуються точка зору, згідно якої інструктивні сигнали від вродженого імунітету та запального розпізнавання металевих імплантів, частки або іонів металів керують ефекторною диференціацією серед CD4⁺Т-клітин, що в свою чергу, забезпечує зворотній зв'язок із вродженими та запальними ефекторними механізмами.

Загалом, ця ефекторна диференціація серед CD4⁺ Т-клітин може представляти вирішальний контрольний пункт у визначенні стійких ефекторних відповідей на металеві імпланти, від запалення лінії NLRP3/IL1/IL17 або опосередкованої IL4 алергічної гіперчутливості до опосередкованої Treg толерантності [131-135]. Залишається незрозумілим, до якої міри компартмент CD8⁺ цитотоксичних Т-клітин (Cytotoxic T cell CTL) змінюється у відповідь на

металеві імплантати. В декількох дослідженнях повідомляли про суперечливу кількість CD8+ CTL, присутніх після процедури імплантації [115, 126, 136-138].

IFN γ , продукований CD8+CTL, можливо виявити в периферичній крові реципієнтів з імплантом, але його кількість при патологічній реакції на імплант не відрізняється від нормальної реакції [111]. CD8+CTL, що реагують на гаптени нікелю, можна виявити у пацієнтів із контактною гіперчутливістю до нікелю, що підкреслює роль цієї лінії клітин у реакціях гіперчутливості уповільненого типу (тип IV) [20]. Також CD8+CTL можна виявити в перипротезних тканинах, однак залишається незрозумілим чи продукується перфорин та гранзим В у відповідях на металеві імплантати [128].

Специфічна реакція В-лімфоцитів (В-клітин) на металеві імплантати та металеві часточки невідома. Кількість В-клітин, здається залишається стабільною у осіб з наявними металевими імплантатами [115, 137].

У патологічних ситуаціях, таких як нестабільність компонентів, В-клітини присутні в тканинах прилеглих до імплантів з парою тертя МоМ [33, 74, 100, 128]. In vitro В-клітини пацієнтів з металевими імплантатами активуються у відповідь на стимуляцію металами [139].

Гістологічні дані також підтверджують ознаки активації В-клітин у тканинах, пов'язаної з нестабільністю імплантатів, зокрема коstimуючих молекул TNFSF13B/BAFF і TNFSF13/APRIL [100].

Найбільш значуща роль опосередкованого В-клітинами імунітету у відповідях на метал може полягати в ролі вироблених В-клітинами антитіл до металевих гаптенів у опосередкуванні реакцій гіперчутливості негайного типу I, II та III, на відміну від описаної дермальної гіперчутливості, зосередженої на Т-клітинах [140]. Антитіла, що реагують на гаптенізовані іони металів, можуть бути виявлені у пацієнтів при наявності стабільних компонентів з сплавом після CoCr [141].

Незважаючи на те, що антитіла IgM до металевих гаптенів були найбільш поширеними в цьому дослідженні, значну частину також мали антитіла IgG, IgA та IgE, що свідчить про те, що активні реакції В-клітин на метали є звичайними і не пов'язані з дезадаптивною патологією [142].

1.2. Тканинна та органна локалізація запальних реакцій

Прояв клінічної реакції відторгнення

Одна із найрозповсюдженіших реакцій відторгнення ортопедичних імплантатів пов'язана з перипротезним остеолізом - втратою кісткової тканини, що може призвести до нестабільності імпланту, викликаючи больовий синдром та можливу протрузію імпланту.

Резорбція кістки здійснюється остеокластами, багатоядерними клітинами, які реагують на сигнали через M-CSF і RANK-L для розвитку з мієлоїдних і ембріональних попередників [143-145]. Остеокласти експресують молекули адгезії та хемокінові рецептори, які визначають їхню локалізацію в кістках, хрящах та суглобах, а також спеціалізовані програми обміну кальцію, протеази, катепсини та матриксні металопротеїнази (matrix metalloproteinases MMPs) [146].

Вважається, що баланс остеобластами остеокластогенезу та остеогенезу є динамічним процесом, який об'єднує запальні, метаболічні та імунні фактори для підтримки кісткової системи [147]. Порушення регуляції даних сигнальних мереж є основним фактором при остеопорозі та вроджених вадах розвитку кісток [148, 149]. Як безпосередні регулятори кісткового метаболізму та ремоделювання, остеокласти інтегрують місцеві запальні сигнали та негайні реакції на імпланти [150]. Остеокласти поєднують виробництво прозапальних цитокінів (наприклад, IL1 β , IL6, TNF α) і хемокінів з корозійним окисненням і поглинанням частинок металу [151-153].

Композиція металевих ортопедичних імплантатів значно вдосконалилася, значна увага приділялася дослідженню здатності іонів та частинок титану

посилювати остеокластогенез – диференціювання остеокластів від попередників-моноцитів і набуття остеолітичних ефекторних функцій у цих клітинах [154-157]. Дані досліджень *in vitro* вказують, що багато іонів металів можуть індукувати або посилювати диференціацію остеокластів від попередників-моноцитів [158, 159]. Однак остеокластогенез не обов'язково може бути загальною реакцією на всі види металів [160].

Іони металів, отримані з кальцій-фосфатних кісткових цементів, продемонстрували плейотропну дію на диференційовані остеокласти, модулюючи їх катаболічну ферментативну активність і виживання [161]. Метали, які рідше зустрічаються в ортопедичних імплантатах, включаючи Au та Zn, можуть навіть пригнічувати остеокластогенез через свої антиоксидантні механізми [162, 163].

Додаткові доклінічні дослідження мали на меті моделювати або пригнічувати індукцію остеокластогенезу за допомогою фармакологічних додатків [164-167]. Доклінічні моделі на тваринах надали докази того, що послаблення або пригнічення передачі сигналів запальних цитокінів може мати клінічну користь для запобігання або обмеження дезадаптивних остеолітичних реакцій на металеві імплантати [168, 169]. Іони металу, що вивільняються в результаті окислювальної корозії металу, можуть не викликати остеоліз, а натомість можуть служити критичними підсилювачами реакцій запалення, які сприяють остеокластогенному розвитку, програмуванню остеокластичних функцій і взаємодіють з іншими імунними та запальними медіаторами [170].

Цільові інгібітори остеокластогенезу досліджуються для різноманітних остеолітичних розладів, включаючи остеоліз пов'язаний із протезуванням [171].

Клінічна реакція на металеві імплантати

Клінічна реакція на металеві імплантати може проявлятися різноманітними симптомами. Незважаючи на такі загальновживані терміни, як «алергія на метал» або «гіперчутливість до металу», поточні опубліковані дані припускають що самі по собі алергічні механізми не пояснюють більшості реакцій на металеві імпланти.

Повідомляється, що у одного пацієнта може бути декілька патологічних симптомів через імплант. Весь спектр місцевих та системних реакцій, пов'язаних з металевими імплантатами, включений в термін «несприятливий реакція на металеві частки» (adverse reaction to metal debris ARMD).

Як приклад, реакція на чужорідне тіло описується як «гранулематозна запальна реакція, викликана наявністю екзогенного матеріалу в тканинах, характерною ознакою якої є утворення гігантських клітин чужорідних тіл». Це визначення FBR включає підкатегорію реакції тканин господаря, яка визначається як «розростання тканини в чужорідному тілі або навколо нього як реакція організму антитілами на чужорідне тіло». Однак відповіді господаря на імплантат не обмежуються ростом тканини, і вони не обов'язково спричинені реакцією антиген-антитіло. Для діагностичної оцінки пацієнтів, яким встановлено протез MoM, можуть виявлятися ALTR такі як синовіт, бурсит, остеоліз і псевдопухлини, а їхні гістологічні ознаки можуть включати ALVAL. Опубліковані дані вказують на те, що різні ALTR можуть вказувати на різну частоту ускладнень а, отже, на унікальні потреби в подальшому обстеженні [172], що підкреслює важливість адекватної термінології та правильної інтерпретації періімплантних результатів [173]. Визначення, пов'язані з ALTR, відображають розвиток розуміння природи ALTR, починаючи з епохальної статті Willert et al [174], який вперше описав опосередковану макрофагами реакцію чужорідного тіла, а пізніше повідомив про можливість імунологічної відповіді - «домінування лімфоцитів» - відомою як LYDIA, або ALVAL [34].

У той час як термін ALTR відноситься конкретно до локальних змін навколо перипротезної тканини, весь спектр реакцій, викликаних металовмісними імплантатами, може бути охоплений терміном ARMD. Як наслідок, ARMD може включати як місцеві, так і системні реакції, у тому числі, підвищення рівня вмісту іонів металу в крові/сироватці [175], металоз (тобто залишки металу, що накопичуються у перипротезних тканинах) та різні ALTR [176], такі як

вищезгаданий ALVAL [177, 178], псевдопухлини (тобто кістозні або тверді утворення з інфільтрацією імунних клітин та включеннями металевого дебрису) [179] та остеоліз [172].

Термін «металоз» часто використовується для позначення відкладень металевих часток, але він також може включати наявність результуючих тканинних реакцій, таким чином збігаючись із терміном ALTR. Хоча терміни ARMD і ALTR найчастіше використовуються щодо імплантатів з парою тертя MoM, обидва вони можуть бути застосовані при імплантах з парою тертя метал-поліетилен (metal-on-polyethylene MoP) [172, 180, 181].

Можливість розвитку гіперчутливості до металів, що входять до складу різних імплантатів, добре встановлена [182, 183, 184]. Однак існує мало доведених клінічних випадків нестабільності імплантату через справжню алергію (тобто через опосередковану реакцію алерген-антитіло як основну причину). Терміни ALTR і ALVAL часто використовуються як взаємозамінні, що означає термінологічну неузгодженість, яка обмежує весь спектр потенційних ALTR ALVAL (який є лише одним із його підтипів) і, таким чином, надмірно підкреслює роль опосередкованих лімфоцитами тканинних відповідей ALVAL.

Побічна реакція на металеві часточки (ARMD)

Можливі – локальні та системні – ARMD можуть бути заздалегідь визначені поверхнею імплант - тканина. Ортопедичні імплантати, наприклад, частіше пов'язані з псевдопухлинами та остеолізом. На ймовірність певних ARMD також можуть впливати складові метали імплантату (наприклад, Co/Cr проти Ni або Ti), а також частинки зносу. Металеві частки, пов'язані з імплантатом, можуть спричинити системні реакції, здебільшого через дисемінацію кровоносною та лімфатичною системами. У широко цитованому метааналізі 2009 року Hallab et al., поширеність чутливості до металу в пацієнтів із нестабільними імплантатами більше у 2-3 рази, ніж у всіх обстежених пацієнтів з стабільними компонентами імплантатів [185].

Однак повідомлення про гіперчутливість, яку можна перевірити, зустрічаються відносно рідко [183], а механізми реактивності металів та відповідні клінічні прояви ще не з'ясовані [185].

Різні прояви системної гіперчутливості та запалення

РГМ може включати в себе такі реакції, як контактний дерматит, васкуліт, кропив'янка та еритема, а також порушення загоєння післяопераційної рани, псевдоінфекцію (реакція, що імітує інфекцію), набряки, синовіти, біль, скутість або обмеження рухів та асептичну нестабільність імплантів [182, 186-188].

У 35% пацієнтів з РГМ також спостерігаються локалізовані або генералізовані висипання. Частіше вони зустрічаються при тотальних ендопротезуваннях колінного суглоба порівняно з ендопротезуванням кульшового суглобу. Висип може бути папульозним, еритематозним, сверблячим або лускатим, і зазвичай локалізується біля післяопераційного рубця [182]. Спочатку він може виникати локально на коліні (при тотальному ендопротезуванні колінного суглоба), але потім може поширитись по всьому тілі.

Пацієнти з різними імплантатами можуть повідомляти про неспецифічні системні симптоми, такі як втома та дифузні болі в суглобах і тілі. У деяких випадках ці симптоми можуть нагадувати захворювання сполучної тканини.

Метали, що використовуються в імплантатах можуть викликати системну токсичність, яка може викликатися не тільки реакцією гіперчутливості, а й іншими механізмами [189, 190]. Діапазон часу появи перших проявів варіюється від 4 тижнів до 2 років [191]. Найчастіше РГМ вражає жінок в період від 2 місяців до 2 років після ендопротезування суглоба [192-194]. Жінки, як правило, мають більш високий рівень чутливості до металів порівняно з чоловіками. Хром, наприклад, єдиний метал, на який чоловіки мають більшу чутливість, а ніж жінки. Вважається, що це наслідок професійного впливу [195].

Якщо порівнювати РГМ на нікель, він становить у жінок 17%, а у чоловіків приблизно 3%. Разючий контраст з кобальтом та хромом, де частота захворюваності в загальній популяції значно нижча (від 1% до 2%) [196, 197].

1.3. Діагностика

На сьогоднішній день багато статей присвячені проблемі реакції організму на матеріал імплантату та шляхам її вирішення. Так, існує перелік тестів, заснованих на імунній реакції організму до складових матеріалу імплантатів, так звані методи для встановлення алергічної реакції.

Однією з переваг багатьох існуючих методів є їхня неінвазивність. Більшість методів не завжди мають чіткий зв'язок між результатами дослідження та статусом імплантату. Наразі існує лише кілька діагностичних тестів, які використовуються для вимірювання імунологічної відповіді пацієнта на металеві імплантати. Ці тести, як правило, спрямовані на визначення вмісту певних металів в організмі пацієнта та оцінку його чутливості до металевих уламків.

Алергічний анамнез

Першим найважливішим діагностичним етапом у виявленні можливої РГМ є ретельний збір алергологічного анамнезу — сімейний анамнез, попередні випадки алергії, наявність алергії, що пов'язана з професією. Проведення анкетування пацієнтів на доопераційному етапі показує 60% позитивної прогностичної цінності. Особи, які повідомляли про попередні реакції на метал до імплантації, мали в чотири рази більший ризик розвитку ускладнень з приводу імпланта [198]. Пацієнтам, які повідомляють про виражені шкірні або системні реакції, необхідно обов'язково проходити діагностику на РГМ на передопераційному етапі [199].

Методи діагностики

В літературі описується достатньо великий перелік методів діагностики як на до-, так і на післяімплантаційному етапі. Зокрема виділяють такі методи: визначення вмісту іонів металу, патч-тестування шкіри, тест трансформації

лімфоцитів (Lymphocyte Transformation Test LTT) - (збільшення поглинання [3H]-тимідину лімфоцитами після контакту зі специфічними алергенами), модифіковане тестування стимуляції лімфоцитів (оцінка експресії специфічних рецепторів циркулюючих мононуклеарних клітин після стимуляції металами), тест на пригнічення міграції лейкоцитів (вимірювання швидкості міграції лейкоцитів після контакту з сенсibiliзуючими алергенами), конфокальна мікроскопія (оцінка внутрішньоклітинних аномалій після контакту з металами) та ІФА-тестування (вимірювання концентрації цитокінів, що продукуються стимульованими клітинами). Найбільш розповсюдженими методами дослідження для виявлення РГМ є патч-тестування шкіри (in vivo) та тест трансформації лімфоцитів (in vitro). Усі тести мають свої переваги та недоліки, і жоден з них не вважається еталоном.

Вимірювання іонів металів

Хоча явна токсичність металу імплантата зустрічається рідко, підвищення рівня іонів металу в сироватці є однією з найбільш часто зареєстрованих побічних реакцій із потенційними системними реакціями. Навіть якісне ендопротезування МоМ може призвести до підвищення рівня Co та Cr у сироватці [178, 189]. Систематичний огляд 11 рандомізованих контрольованих досліджень (РКД) та 93 епідеміологічних досліджень рівнів іонів металів (Co, Cr, Ti, Ni, Mo) у 9957 пацієнтів з металовмісними протезами кульшових суглобів виявив підвищені рівні іонів металів (цільна кров, сироватка, плазма крові, еритроцити, сеча) у пацієнтів з МоМ [200]. Реакції у відповідь на ортопедичні імплантати часто приписують Co та називають кобальтизмом [189, 190, 201].

Відповідно до Європейського міждисциплінарного консенсусу, показник вмісту Co <2 мкг/л, не викликає клінічного занепокоєння, діапазон 2-7 мкг/л є пороговим значенням для клінічних проявів [202]. Надмірну кількість часток Co пов'язують із транніозом, тобто явищем, коли частинки зносу утворюються внаслідок корозії [203-207]. Як було запропоновано навіть у звітах про можливі

кореляції з ALTR [181], підвищені рівні іонів металу не слід використовувати окремо для прийняття клінічних рішень.

Патч-тестування шкіри

Це тест *in vivo*, при якому на шкіру пацієнта розміщуються пластирні маркери з алергенами і після їх видалення оцінюється шкірна реакція за шкалою на наявність еритеми, набряку, папул і везикул [208]. Патчі зазвичай видаляють через 48 годин після їх розміщення, потім визначається еритематозна реакція на алерген, вона оцінюється через 48, 72 та 96 годин або більше. Реакції класифікуються як 1+, 2+ або 3+. Реакції з оцінками 2+ або 3+ частіше викликають реакції до імплантатів, ніж результат 1+. Патч-тестування можна виконати не лише для металів, а й для цементних компонентів.

Патч-тестування — простий, недорогий, ефективний початковий варіант при чутливості до металів та має низький ризик ускладнень для пацієнта. Існують недоліки методу, які включають в себе ймовірність неспецифічної реакції при інших механізмах реактивності, час необхідний для проведення тесту, труднощі з оцінкою результатів та варіанти хибно-позитивної відповіді.

Американське товариство контактного дерматиту (ACDS - The American Contact Dermatitis Society) [209] і багато дослідників історично використовували патч-тестування для виявлення системних реакцій гіперчутливості IV типу на металеві імплантати [210]. ACDS оцінює реакцію патч-тесту не як стандартну реакцію гіперчутливості типу IV, а використовує термін «реакції гіперчутливості до металу» (MHR), щоб «наблизити вроджені та адаптивні імунні реакції, тому що в ньому зазначено: «хоча патч-тест не повністю оцінює всі механізми гіперчутливості, патч-тест на шкірі є найкращим тестом для оцінки потенційних реакцій металу як до, так і після імплантації». Незважаючи на попереднє твердження, імунологічний зв'язок між патч-тестуванням і системною та/або місцевою імунологічною відповіддю є незрозумілим, а дані досліджень щодо цього зв'язку суперечливі [209, 210]. Згідно з попередніми звітами, патч-тестування має

чутливість до 100%, а специфічність — до 64%. Однак існують суперечки щодо обґрунтованості використання патч-тестування для визначення РГМ у товщі тканин та суглобах [211].

Тест трансформації лімфоцитів - LTT

При LTT тесті *in vitro* порівнюється проліферація лімфоцитів периферичної крові після 7-денної інкубації з додаванням металевого антигену та без нього. У порівнянні з патч-тестами, було встановлено, що LTT має більшу чутливість — від 55% до 95%, але меншу специфічність [212, 213]. На відміну від патч-тестування, тест трансформації лімфоцитів не може викликати реакцію гіперчутливості (дослідження проводиться *in vitro*). На жаль, тест трансформації лімфоцитів не завжди доступний і дає змогу перевірити тільки на обмежену кількість алергенів. Хоча патч-тести та LTT корисні для оцінки у пацієнтів ризику розвитку специфічних реакцій гіперчутливості, вони не виявились надійними для прогнозування розвитку РГМ після протезування суглобів [214].

Наразі жоден метод не є загальноприйнятим або рекомендованим для клінічного визначення гіперчутливості імплантатів. Наразі бракує надійних діагностичних або скринінгових інструментів для оцінки повного спектру реакцій пацієнта на металевий імплант. Існує обмежена кількість способів передбачити або діагностувати несподівані прояви реакції на метал. Існує кілька діагностичних тестів, які оцінюють відповідь, але немає чіткого консенсусу щодо того, як ці тести слід використовувати в клінічних умовах.

Ці прогалини підкреслюють потребу в нових, клінічно корисних діагностичних та прогностичних тестах для визначення ймовірності індукованої імплантатом патологічної відповіді до імплантації та адекватної оцінки всього спектру можливих реакцій після імплантації.

Передімплантаційне обстеження

Стандартні тести, такі як визначення рівня іонів металу в крові або патч-тестування на метали погано корелюють з побічними реакціями. У деяких випадках

пацієнти з позитивними результатами діагностики не мають симптомів. З цієї причини ведення пацієнтів з металевими імплантатами поділяються на проактивний моніторинг для безсимптомних пацієнтів і більш агресивні діагностичні та терапевтичні підходи для пацієнтів з клінічними симптомами.

Існує суперечливе питання, чи слід проводити обстеження пацієнтів перед імплантацією. Наприклад, Lachiewicz et al. стверджував, що передімплантаційний скринінг перед протезуванням не є необхідним, та пропонував діагностувати алергію на метал після імплантації лише після виключення всіх інших можливих факторів [215]. В проведеному когортному дослідженні Wawrzynski et al. 2016 року виявлено, що у пацієнтів, які мали позитивний патч-тест до оперативного втручання, спостерігалася така сама частота ревізій, як у пацієнтів з негативним результатом патч-тестування [216].



Рисунок 1.1 –Алгоритм передопераційний скринінг пацієнтів з можливим РГМ

На даний час існує єдина думка, що передопераційний скринінг слід проводити тільки у пацієнтів, у яких в анамнезі є виражена алергія на метал, запропонований діагностичний алгоритм представлено на рисунку 1.1.

Американське товариство контактного дерматиту (American Contact Dermatitis Society) у 2016 році опублікувало заяву про недоречність проведення рутинного планового передопераційного обстеження пацієнтів без алергії на метал в анамнезі [217-218]. Якщо хірург вирішив провести передімплантаційне тестування, то слід перевіряти на всі складові запропонованого імплантату та на цемент. У випадку позитивного патч-тесту, пацієнта слід проконсультувати передопераційно щодо альтернативних варіантів стандартних складових компонентів імпланту та ознайомити з існуючою доказовою базою, яка свідчить про гарні результати при використанні гіпоалергенних компонентів [219, 220].

Важливо розуміти, що позитивний результат передопераційного скринінгу не обов'язково означатиме, що у пацієнтів виникне РГМ після ендопротезування, а також немає великої доказової бази, яка свідчила б про успішність використання гіпоалергенних компонентів у пацієнтів з позитивним тестом на РГМ [217, 220, 221]. Передімплантаційне використання патч-тестування є розумним вибором через його низьку вартість та доступність, але як було наведено вище, специфічність даного методу лише 64%. Незважаючи на відсутність загальних клінічних рекомендацій, рутинне передопераційне обстеження пацієнтів, які повідомляють про відсутність в анамнезі шкірних реакцій на метали або побічних явищ, пов'язаних із попередньою імплантацією металевих пристроїв, не є необхідним, і тому не рекомендується.

Постімплантаційне обстеження

У першу чергу, пацієнт з підозрою на РГМ повинен бути ретельно обстежений, тому що існує багато причин для виникнення схожих симптомів: болю, набряку та зменшення об'єму рухів після оперативного втручання (інфекція, нестабільність імпланту, рецидивуючий гемартроз).

Schalock та Thyssen провели опитування 119 дерматологів на з'їздах Європейського товариства контактного дерматиту в 2012 році та Американського товариства контактного дерматиту в 2013 році та встановили чотири великих та п'ять малих діагностичних критеріїв реакції гіперчутливості до металевих імплантів [222]. В 2016 році Schalock et al. оновили критерії для діагностики РГМ після імплантації [218, 223] наведено на таблиці 1.1.

Таблиця 1.1

Діагностичні критерії для постімплантаційного обстеження пацієнтів з реакцією гіперчутливості на метал

Великі критерії
висипання на шкірі над імплантатом
хронічний дерматит, який виникає впродовж декількох тижнів і тримає декілька місяців після операції
повне одужання після видалення імплантату
позитивний патч-тест на метал, що містить імплант
Малі критерії
незрозумілий біль і/або нестабільність імпланта
дерматит стійкий до лікування
морфологічна картина дерматиту (еритема, індурація, папули, везикули)
системна алергічна реакція
гістологічна картина, що відповідає алергічному контактному дерматиту
позитивний тест <i>in vitro</i> на метали (наприклад, тест на трансформацію лімфоцитів)

Нами було визначено *великі критерії* (названі приблизно 80% дерматологів), що включають: висип над металевим імплантом, позитивний результат патч-тесту на метал, що використовується в імплантаті, повне одужання після видалення

імплантату та хронічний дерматит, який виникає впродовж декількох тижнів і тримає декілька місяців після імплантації.

Характеристики, визначені як *малі критерії* (названі 60% або меншою кількістю опитаних дерматологів), включають в себе: незрозумілий біль і/або нестабільність імпланта, дерматит стійкий до терапії, морфологічну картину дерматиту (еритема, індурація, папули, везикули), системна алергічна реакція, гістологічна картина, що відповідає алергічному контактному дерматиту та позитивний тест *in vitro* на метали (наприклад, тест на трансформацію лімфоцитів) [220, 224, 225].

Обстеження пацієнтів з підозрою на РГМ повинно включати в себе повний збір алергологічного анамнезу, даних загального аналізу крові, показники С-реактивного білка, прокальцитоніна та обстеження аспірату з суглобу на наявність клітин з диференціацією. Необхідно проводити забір якнайменше двох аспіратів у різний час, для дослідження на анаеробну та аеробну флору та культивувати її протягом 14-21 днів. Дослідження другого аспірату проводиться, якщо перший аспірат дав негативний результат. Обстеження на виявлення іонів металів у крові не слід проводити рутинно, вони можуть бути підвищені навіть при наявності стабільних компонентів [215].

Інтраопераційні біопсії та гістопатологічне дослідження залишаються золотим стандартом підтвердження гіперчутливості, пов'язаної з імплантом.

Гістологічна діагностика реакції на метал або цемент виконується за допомогою класифікації за Krenn, який в своїх наукових працях описав чотири типи перипротезних мембран [193, 226, 227].

Деякі клініцисти пропонують проводити артроскопічне обстеження (проведення інтраопераційної біопсії) задля отримання матеріалу для встановлення патогістологічної картини та проведення бактеріологічного дослідження [18]. Артроскопічна біопсія неосиновії (шару навколо протезу) може допомогти визначити стан перипротезної мембрани (шар тонкої сполучної тканини між

кісткою та імплантом) і відтак відігравати важливу роль при передревізійній діагностиці. Єдиним альтернативним методом отримання зразка перипротезної мембрани є видалення компонентів протезу [18, 228].

На рисунку (схемі) 1.2 вказано приблизний алгоритм діагностики та лікування для пацієнтів у постімплантаційному періоді.

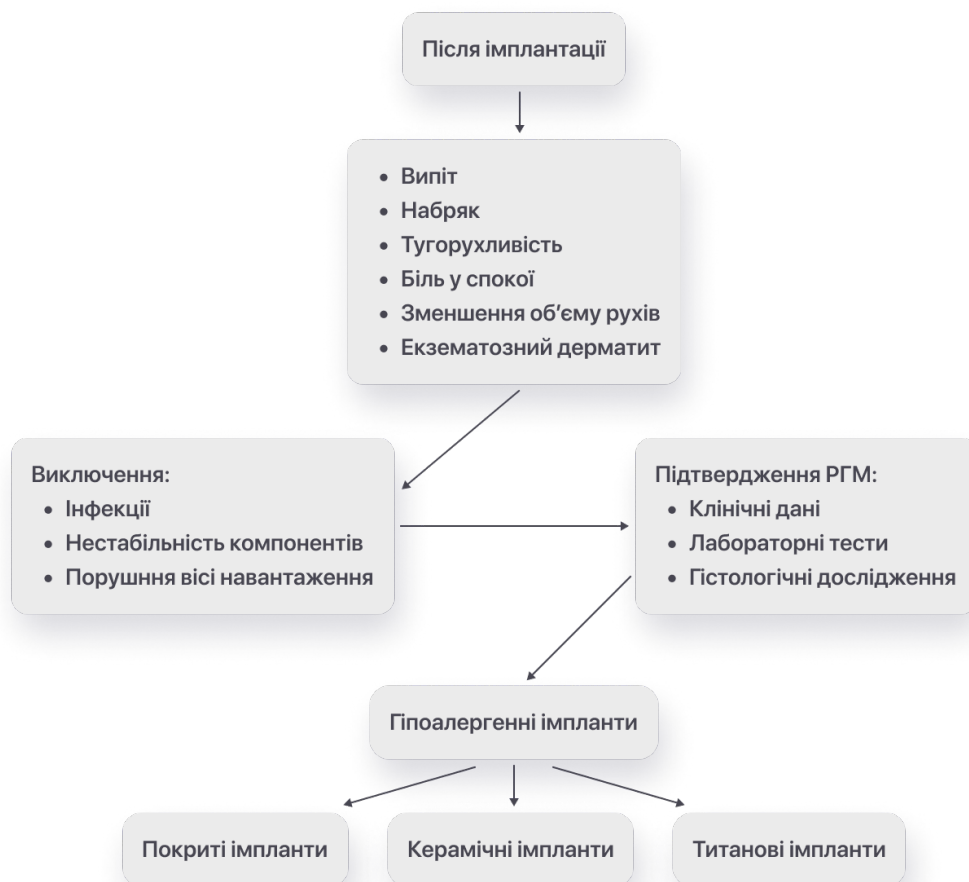


Рисунок 1.2 – Алгоритм діагностики та лікування для пацієнтів з реакцією гіперчутливості на метал

Рутинне проведення патч-тестування в постімплантаційний період вважається досить дискусійним питанням. За даними багатьох досліджень, у довгострокових результатах не було виявлено значної різниці в реакції на метал серед пацієнтів з позитивним патч-тестом на Ni, яким були встановлені нікелевмістні компоненти [220, 229-231]. В інших дослідженнях пацієнтам, яким

проводилось 2 або більше ревізійних втручань, було виявлено меншу витривалість імпланту або більш виражену реакцію на метал [220, 232, 233].

У пацієнтів з дерматологічними проявами та які мають явища остеолізу на рентгенограмах спостерігаються високі показники (від 47% до 67%) позитивних патч-тестів та ЛТТ в постімплантаційний період [219]. Atanaskova Mesinkovska et al. припускають, що всі пацієнти з гіперчутливістю до металів в анамнезі повинні пройти передопераційне патч-тестування [199].

Деякі дослідження вказують на те, що серед пацієнтів з ендопротезами суглобів та без них не було різниці в частоті позитивного результату патч-тесту [234]. В інших дослідженнях у пацієнтів з позитивним патч-тестом після імплантації не було виявлено жодних ознак нестабільності імпланту [235].

Серед теорій про те, чому відсоток позитивних тестів збільшується після ендопротезування суглоба є припущення, що тривалий контакт з іонами металів (з протезу), можуть викликати РГМ. Обстеження на РГМ після протезування рекомендується пацієнтам з хронічними ускладненнями після імплантації або зі стійкими ознаками та симптомами реакції гіперчутливості незважаючи на проведення медикаментозної терапії [220].

Дуже важливо проводити обстеження на всі компоненти, які входять до складу встановленого протезу та включно на кістковий цемент [236]. А також, важливо пам'ятати, що проведення патч-тестів після імплантації в свою чергу можуть підсилювати реакцію організму на сам імплант [237, 238].

Постімплантаційне обстеження має проводитись тільки у пацієнтів з хронічними ускладненнями, коли всі інші причини були виключені або коли не допомагає проведене симптоматичне лікування гіперчутливості до металів.

На жаль, сьогодні не існує міжнародного, загальноприйнятого алгоритму діагностики реакції гіперчутливості до металів [215].

1.4 Найвні рішення проблеми

Як було зазначено вище, перед проведенням лікуванням реакції гіперчутливості необхідно виключити всі інші можливі причини. Запропоновані рекомендації лікування відрізняються, але традиційно поділяються на варіанти для симптомних та безсимптомних пацієнтів. З цієї причини ведення пацієнтів з металевими імплантатами поділяються на проактивний моніторинг для безсимптомних пацієнтів і більш агресивні діагностичні та терапевтичні підходи для пацієнтів з клінічними симптомами [239].

На сьогоднішній день, немає достатньої доказової бази доказів, яка б допомогла хірургові прийняти рішення про оптимальне лікування. Якщо пацієнту проводиться тотальне ендопротезування суглобу та з'являються ознаки РГМ, йому проводять симптоматичне лікування (місцеві стероїди при висипаннях та нестероїдні протизапальні препарати при болях у суглобах та набряку).

Пацієнти з тривалим дерматитом (локалізованим чи системним) повинні звернутись до дерматолога для призначення системних стероїдів. При призначенні довготривалої гормональної терапії необхідно мати на увазі, що стероїдні препарати можуть призвести до затримки, погіршення загоєння рани та реакції імунної супресії. Наразі відносно мало доказів щодо безпеки та ефективності використання препаратів атропіну сульфату та антигістамінних засобів для симптоматичного лікування РГМ, тому вважається не доцільно рекомендувати таке лікування [240-242].

Якщо причиною реакцій гіперчутливості виступає металевий імплант, найефективнішим методом лікування зазвичай є видалення останнього або його заміна [216, 243-246]. Thyssen et al. описали випадок коли у 12-річної дитини з переломом нижньої кінцівки розвинувся системний алергічний дерматит через 3 місяці після імплантації пластини зі сплаву (NiCo). Прояви швидко зникли після вилучення імпланту. Stejskal представили дані п'яťох пацієнтів з явищами фіброміалгією та з синдромом хронічної втоми, у яких зникли всі симптоми після видалення металевого імпланту [247]. Lachiewicz et al. зазначає що проведення

ревізії компонентів протезу тільки через біль без ознак нестабільності компонентів не полегшить симптоми і не піде на користь пацієнту [215]. Basko-Pluska et al. погоджуються з цими рекомендаціями, додаючи, що ревізію не слід розглядати у пацієнтів з функціонуючими протезом, який не викликає болю, хоча має позитивний результат патч-тестування [216, 248].

Але при виникненні у пацієнта хронічного рецидивуючого синовіта або ознак руйнування компонентів протезу, основним видом лікування буде проведення ревізійного оперативного втручання з заміною компонентів, що викликали реакцію [249, 250]. При ревізійних операціях деякі хірурги зазвичай використовують гіпоалергенні компоненти, у той же самий час, інші хірурги наполягають на використанні стандартних імплантів у зв'язку з недостатністю доказів ефективності гіпоалергенних компонентів (є тільки короткострокові та середньострокові результати) та важкістю чіткої діагностики алергії на метали.

Гіпоалергенні компоненти виготовлені з інертних матеріалів, які не мають імуногенної активності. Зазвичай використовуються компоненти виготовлені з кобальт-хрому, які покриті одним або декількома шарами імуногенноінертної речовини [250]. Також варіанти лікування включають використання керамічних компонентів, які не містять металу або імплантів з покриттям [251].

Керамічні імпланти (Al_2O_3 або ZrO_2) є біологічно неактивним матеріалом, який використовується понад 30 років при тотальному ендопротезуванні кульшового суглоба і не викликає реакції гіперчутливості. Bergschmidt et al. в трьох дослідженнях показали свій досвід використання керамічних компонентів при ревізійних операціях [251-253].

Покриті імпланти, є альтернативою керамічним компонентам, покриті оксидом цирконію (Oxinium®, Smith&Nephew) у поєднанні з титановою базою. Компоненти Oxinium® містять менше 0,0035% нікелю і мають чудові трибологічні властивості, включаючи зносостійкість, твердість та змочуваність [254-256]. Hofer et al. спостерігали за 109 пацієнтами з компонентами Oxinium® і клінічні

результати були такі самі як при використанні звичайних компонентів CoCr [257]. Innocenti et al. використовували компоненти Oxinium® у 25 пацієнтів з підозрою на розвиток РГМ та отримали позитивний досвід без виникнення ускладнень [258].

Титанові імпланти, є додатковим варіантом - спеціальне покриття з нітриду титану ніобію (TiNbN) або нітриду титану (TiN) [259]. Титанову або Co-Cr поверхню компонента можна покрити за допомогою азоту дифузійного зміцнення киснем, алмазоподібного вуглецевого наплавленого або фізичного осадження з пари титаном (ніобієм) нітрид (Ti(Nb)N) [259-262]. Lutzner et al. порівняли 60 імплантатів CoCr з покриттям і 60 без покриття і не отримали показників підвищення концентрації іонів металу в плазмі в жодній з груп пацієнтів [263].

Однак, навіть після вилучення компонентів імпланту у перипротезних тканинах виявляється вміст нікелю. Це може бути обумовлено також з тим, що під час ревізійної операції використовуються інструменти з нержавіючої сталі, які містять в своєму складі нікель (вміст нікелю може варіюватися від 10% до 14%) [215].

Як раніше було вказано, сліди нікелю також присутні у сплавах титану [219, 264]. Слід пам'ятати, що оперативне втручання проводиться тільки якщо існують чіткі показання. При проведенні операцій пацієнтам з обтяженим алергічним анамнезом повинні надати належну інформацію про обмежені дані щодо гіперчутливості до металів та використання гіпоалергенних компонентів.

Питання вибору імпланту для пацієнта з підтвердженою гіперчутливістю до металів при первинному ендопротезуванні суглоба дуже суперечлива тема і потребує проведення подальших досліджень.

1.5 Висновки за розділом

1. Імплантація металевих протезів вже на перших етапах впливає на роботу організму. Наявність чужорідного тіла активує цілий каскад місцевих та системних реакцій імунної системи, направлених на його знищення. Розвиток

реакції гіперчутливості як однієї із багатьох відповідей імунної системи призводить до появи симптомів, які значно погіршують якість життя пацієнта і до нестабільності імплантата.

2. Можливість розвитку гіперчутливості до металів, що входять до складу різних імплантатів, добре встановлена. Однак існує мало доведених клінічних випадків нестабільності імплантату через справжню алергію (тобто через опосередковану реакцію алерген-антитіло як основну причину).

3. Стандартні тести, такі як визначення рівня іонів металу в крові або патч-тестування на метали погано корелюють з побічними реакціями. Так, у деяких випадках пацієнти з позитивними результатами діагностики взагалі не мають симптомів. Тому сучасні рекомендації пропонують поділ ведення пацієнтів з металевими імплантатами на проактивний моніторинг для безсимптомних пацієнтів і більш агресивні діагностичні та терапевтичні підходи для пацієнтів з клінічними симптомами.

4. Потрібні подальші дослідження, щоб зрозуміти базові клітинні та молекулярні механізми, які можуть виявляти сигнали, що передбачають реакцію на імплантат, оскільки дезадаптивні реакції, які призводять до відторгнення або несприятливих процесів, можуть виглядати як нормальні реакції.

Матеріали розділу висвітлені в наступних наукових роботах:

1. Лазаренко ГО. Гіперчутливість до металу в ендопротезуванні: методи діагностики та лікування (огляд літератури). Літопис травматології та ортопедії 2016;1-2 (33-34):194-200.

2. Лазаренко ГО, Бойко ІВ. Реакція гіперчутливості до ортопедичних імплантатів: сучасний стан проблеми (Огляд літератури). TERRA ORTHOPAEDICA. 2022;(3(114): 61-72.

РОЗДІЛ 2

ПРОГРАМА, ОБСЯГ ТА МЕТОДИ НАУКОВОГО ДОСЛІДЖЕННЯ. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НА МОДЕЛІ ТВАРИН

2.1. Матеріали та методи дослідження

Як відомо алергенні властивості нікелевих імплантатів зумовлені перш за все тим, що нікель в організмі призводить до формуванні білкових комплексів (агрегатів), опосередкованих зв'язуванням гістидин-вмісних протеїнів із нікелем [265]. Ці нікель-вмісні агрегати є високоімуногенними та призводять до випадків алергізації до нікелевих імплантатів [266-271] за умов підшкірної імплантації нікелевих пластин.

Станом на сьогодні на тваринах застосовуються три тести, які використовуються для оцінки потенціалу сенсibilізації (гіперчутливість IV типу) імплантатами, які включають металеві компоненти:

- тест максимальної сенсibilізації морських свинок - Guinea pig maximisation test (GPMT);
- закритий сенсibilізуєчий тест на морських свинках (тест Buehler);
- аналіз локальних лімфатичних вузлів миші - Local lymph node assay (LLNA).

GPMT вважається найбільш чутливим із наведених тестів через використання повного ад'юванта Фрейнда (Freund's Complete Adjuvant, FCA) для стимуляції імунної системи та є найпоширенішим методом, який використовується для оцінки сенсibilізації на матеріал імпланту, у тому числі виготовлених із металу.

Тест Buehler зазвичай використовується для оцінки сенсibilізації імплантів без пошкодження шкіри, у тому числі виготовлених із металу або інших матеріалів.

Тест LLNA полягає у тому, що сенсibilізатори шкіри викликають зростання кількості лімфоцитів у лімфатичних вузлах, дренуючих місце нанесення. Проліферацію можна виміряти за допомогою радіоактивної мітки (кількісне

визначення тритіадированого тімідіна), біолюмінесценції (кількісне визначення вмісту АТФ у лімфоцитах) або імуноаналіз.

LLNA можна використовувати для тестування сполук металів (за винятком нікелю та нікель-вмісних металів).

Сенсибілізація шкіри людини іонами нікелю включає пряму активацію людського Toll-подібного рецептора 4 (TLR4) іонами нікелю. Однак цього не відбувається в аналізі LLNA. Пряма активація TLR4 іоном нікелю не викликає реакції сенсибілізації шкіри у мишей в аналізі LLNA, оскільки структура TLR4 у здорових мишей дикої типу, використаних в аналізі LLNA, не така ж, як у людини TLR4 [53].

Експериментальні дослідження проведено з виконанням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447–IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Європейського Парламенту та Ради (2010 р.) та Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986) [272-274].

Проведення наукового дослідження схвалено та надано дозвіл комісією з питань біоетики ДНУ НІЦ ПКМ ДУС – (протокол засідання №11 від 19.11.2018 р).

Робота на тваринах була проведена у віварію Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України згідно договору № 1/10-136.

В дослідженні приймало участь 25 щурів, самки, лінії Wistar, масою 150-165 гр. Вік тварин до початку експерименту був 3 місяці.

Для отримання доказових результатів тварин випадковим чином було розподілено на 3 групи:

Група №1 – інтактна група (ІТ), 6 щурів - операцію не виконували;

Група №2 – контрольна група (К), 6 щурів без попередньої сенсибілізацією ад'ювантом Фрейнда до Ni та встановленням Ni-вмісного імпланту

Група №3 – дослідна група (Д), 13 щурів з попередньою сенсibilізацією ад'ювантом Фрейнда до Ni та встановленням Ni-вмісного імпланту.

2.1.1 Перший етап дослідження

Імунізація тварин

Дослідження було проведено на щурам лінії Wistar (самки), масою тіла 150-165 гр. дані наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Зважування тварин на початку дослідження

Група	Інтактні	Контрольна	Дослідна
Вага, гр	155,8±4,5	158,8±2,5	159,8±3,4

Сенсibilізацію на нікель викликали за допомогою модифікації описаного методу [275]. Для цього тваринам внутрішньоочеревинно (в/о) вводили по 50 мкл розчину NiSO₄ (CAS 10101-97-0, Sigma-Aldrich, США) у концентрації 10 мкмоль/л, у неповному ад'юванті Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) для початкової імунізації.

Через 2 та 4 тижні щурам вводили бустерні дози Ni, шляхом внутрішньошкірних (в/ш) ін'єкцій по 50 мкл 2 мкмоль/мл NiSO₄ у повному ад'юванті Фрейнда (Sigma-Aldrich, США) з використанням голки 28G1/2 для відновлення імунної відповіді.

Через 3 дні тваринам робили проби на Ni [277]. У ділянку вушної раковини вводили 0,01-0,02 мл розчину Ni на фізіологічному розчині (0,9% розчину NaCl) голкою 30G, як контроль вводили 0,9% розчину NaCl у тому ж об'ємі. Впродовж 10-15 хв спостерігали за реакцією на введений розчин.

Через 10 днів після третьої імунізації була проведена оцінка сенсibilізації до Ni за допомогою «вушної проби». Для цього щурам вводили голкою 30G по 50 мкл розчину NiSO₄ у концентрації 1 мкмоль/л у вушні раковини вуха. Для контролю

вводили по 50 мкл розчинника 0,9% розчину NaCl в вушні раковини другого вуха (Рис.2.1).



Рисунок 2.1 – Проведення вушної проби.

Через 48 годин після ін'єкцій визначали реакції гіперчутливості уповільненого типу шляхом вимірювання збільшення товщини вуха, у яке вводили Ni порівняно зі значенням після введення 0,9% розчину NaCl (рис. 2.2). Вимірювання проводили за допомогою мікрометра [277]. Результати вимірювання товщини стінки вуха вказані в таблиці 2.2.

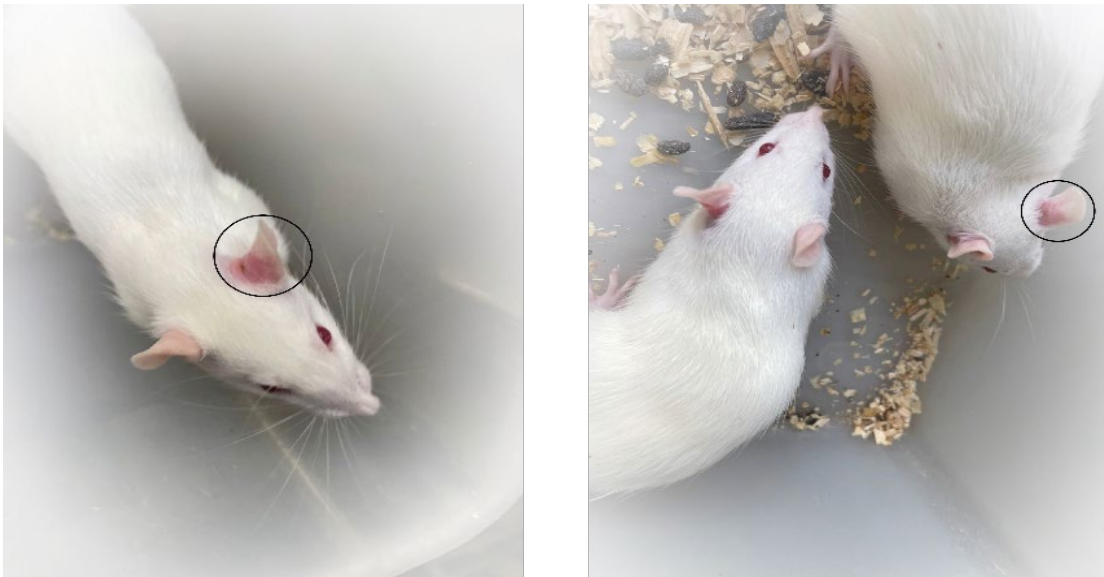


Рисунок 2.2 - Визначення реакції шляхом вимірювання збільшення товщини вуха.

Таблиця 2.2

Результати вимірювання товщини стінки вуха через 24 години після введення у вуха 0,02 мл нікелю NiSO₄

Група	Товщина стінки вуха, мм	U-критерій Манна-Уїтні
Інтактна	1,0±0,08	-
Контрольна	2,0±0,08	P(i-к)=0,01
Дослідна	2,0±0,09	P(i-д)=0,01 P(к-д)=0,47

Імплантація нікелевих пластин

Імпланти для дослідження (рис. 2.3) були надані ТОВ «ОРТОСІНТЕЗ» LLC «ORTOSYNTEZ», умови передачі та використання наведено у Додатку А.

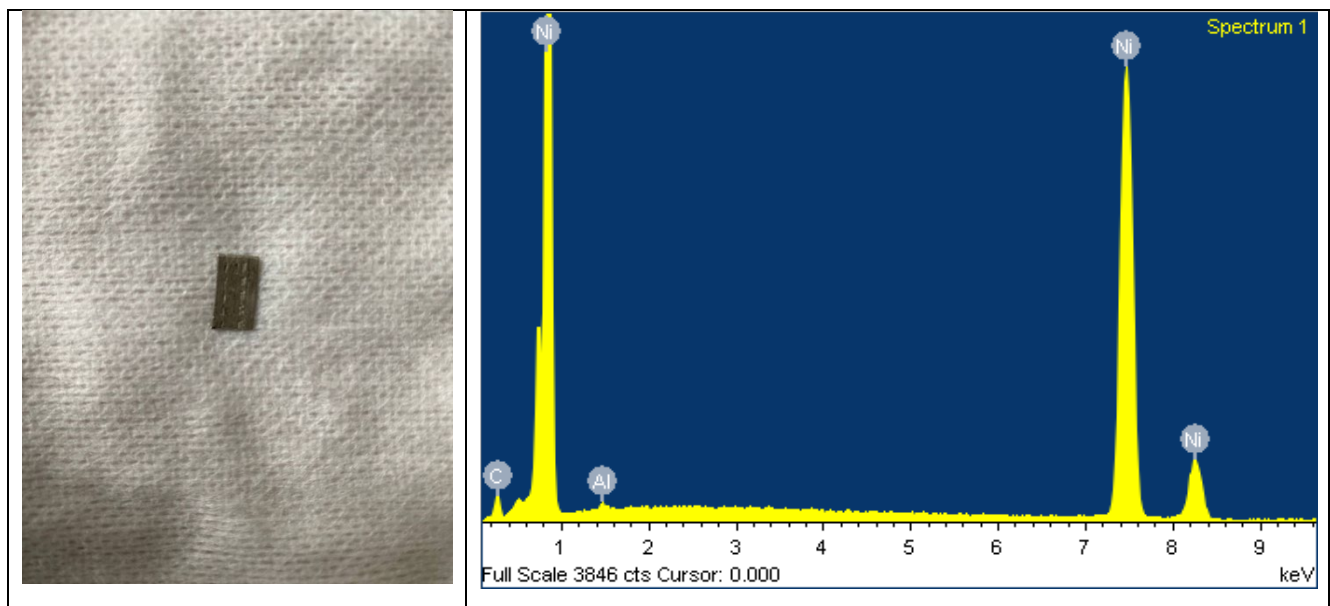


Рисунок 2.3 – Дані спектроскопії щодо вмісту елементів в досліджуваних імплантах

Усі зразки попередньо пройшли спектроскопію на оцінку локального елементного складу у досліджуваному матеріалі (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

Елементний склад застосованих імплантів

Елементи	Al	C	Ni
Відсотковий вміст елементів	0,40%	0,70%	98,90%

Хірургічне втручання

Хірургічні втручання виконано в умовах асептики й антисептики на території віварію Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, під загальною анестезією тіопенталом натрію (ПАТ «Київмедпрепарат») у дозі 50 мг/кг маси тіла, в/о.

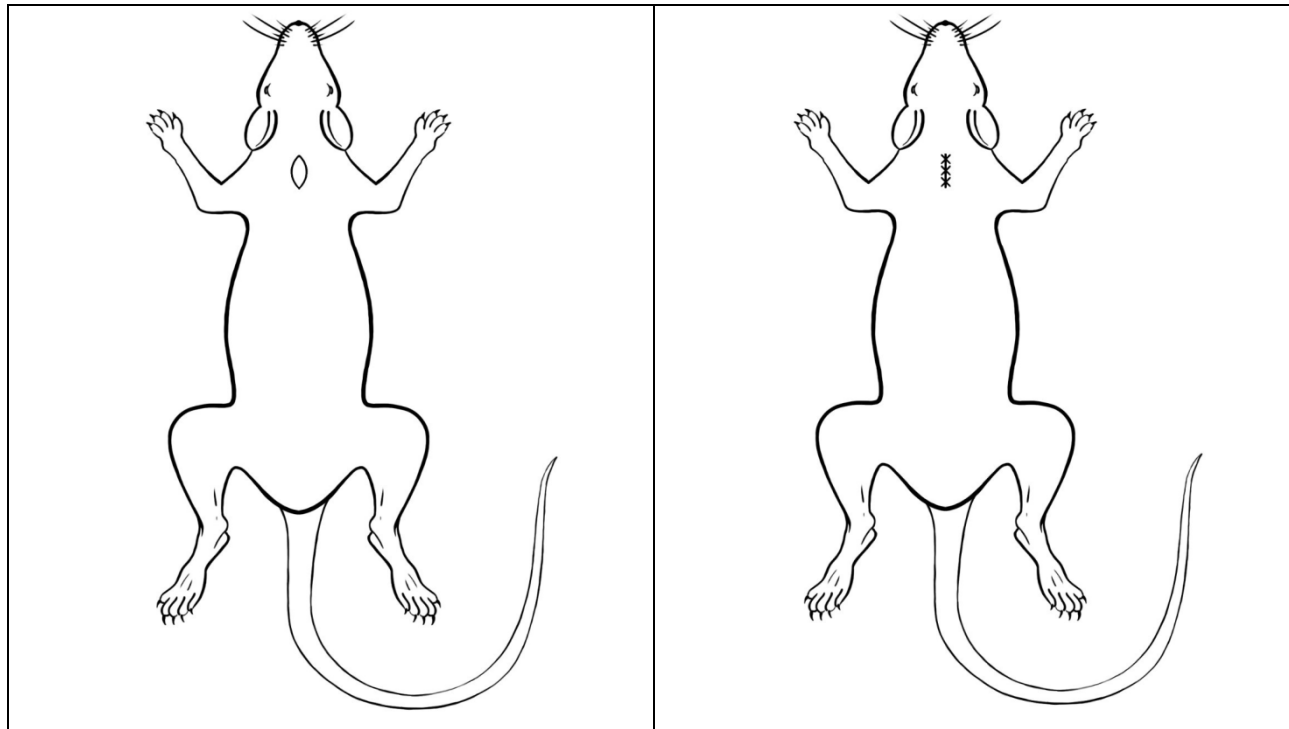


Рисунок 2.4 – Схема проведення оперативного втручання

За вказаною схемою (Рис. 2.4) заднім лінійним доступом по вертебральній лінії розсічено шкіру, в міжлопатковому проміжку субфасціально сформовано кишеню, в яку було імплантовано пластинку з Ni, розміром 6,0 x 4,0 x 1,0 мм. Після оперативного втручання, рану пошарово зашивали нитками Prolene 3-0 (Ethicon Inc, Johnson & Johnson, США) та обробляли антисептичним засобом Повідон-йод (Betadine, Угорщина), інтраопераційні етапи зображено на рис. 2.5.

Для запобігання бактеріальних інфекційних станів, тваринам вводили антибіотик Цефтріаксон (Arterium, Україна), у дозі 20 мг/кг маси тіла, в/о.

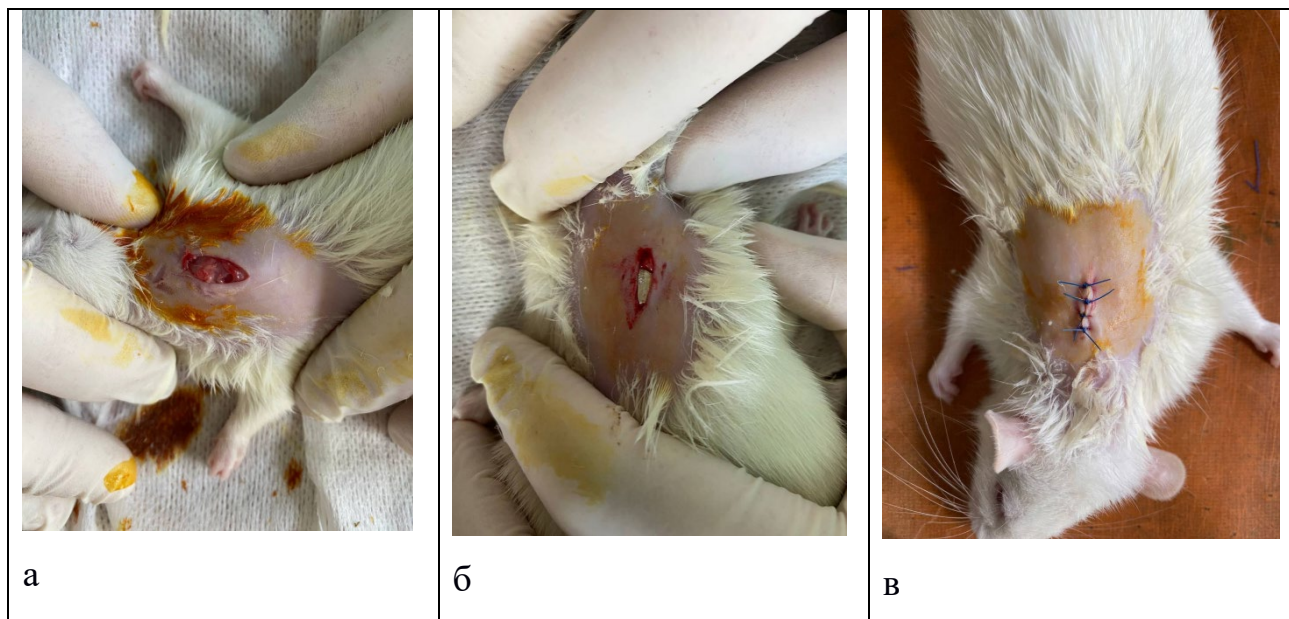


Рисунок 2.5 - Інтраопераційні етапи

(а – доступ, б – імплантація пластини, в – зашивання рани)

Тварини були розміщені в окремі клітки, розміром (60x40x50 см) та спостереження за ними проводили протягом 5 місяців. Інфекційних чи інших післяопераційних ускладнень не виявлено.

В цей період кожен місяць проводилась загальна оцінка стану здоров'я та поведінки, вимірювання маси тіла та обстеження шкіри (з особливою увагою до

післяопераційного рубця і шкіри над імплантатом). Результати були відзначені в індивідуальних картках оцінки тварин.

В день проведення імплантації, через 3 та 5 місяців тваринам проводився забір крові для проведення подальших досліджень: отримання зразків лейкоцитів з периферичної крові щурів, дослідження хемокінового профілю у сироватках крові щурів, отримання зразків сироватки крові щурів, отримання зразків IgG із сироватки крові щурів, проведення оцінки вмісту IgG специфічних до білкових комплексів (агрегатів) у сироватках крові щурів.

Отримання зразків лейкоцитів периферичної крові щурів

Забір крові у щурів здійснювали вранці після голодування (12 год) за допомогою скляної пастерівської піпетки із ретробульбарного венозного синусу ока (рис. 2.6), під легким ефірним наркозом [278].

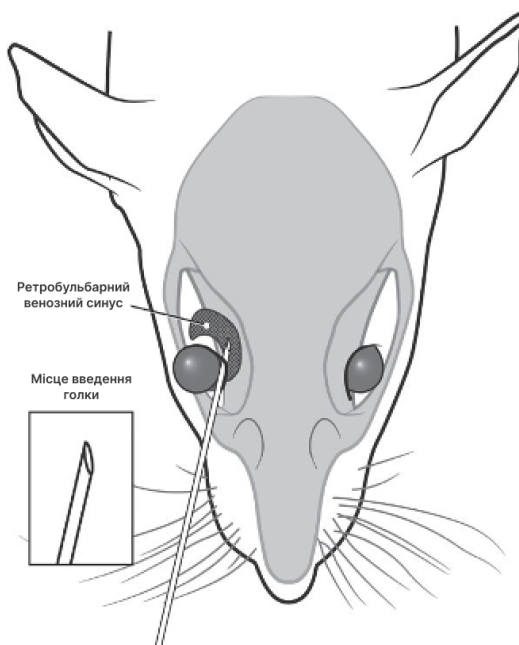


Рисунок 2.6 – Схема проведення забір крові у щурів з ретробульбарного венозного синусу

Для запобігання процесу згортання крові використовували гепарин (50 МО). Лейкоцити отримували в день експерименту шляхом гемолізу еритроцитів. Для

цього у пронумеровані пробірки на 15 мл вносили по 100 мкл гепаринізованої венозної крові, додавали по 5 мл дистильованої води та через 25 сек вносили по 5 мл 1,8% розчину NaCl.

Клітини осаджували на центрифугу Eppendorf 5810R при 400g (R18, 1410 об/хв) протягом 5 хв при +12°C.

Надалі, надосад зливали, а осад клітин ресуспендували та повторювали процедуру лізису залишкових еритроцитів. Надалі клітини ресуспендували та промивали, додаючи 10 мл 0,9% розчину NaCl. Після осадження, відбирали надосад, а осад клітин (фракція лейкоцитів) ресуспендували в 100 мкл 0,9% розчину NaCl та використовували для аналізу.

Кількість лейкоцитів вимірювали у нативній крові з додавання гепарину у камері Горяєва.

Отримання зразків сироватки крові щурів

Забір крові у щурів здійснювали вранці після голодування (12 год) із ретробульбарного венозного синусу ока, під легким ефірним наркозом у пронумеровані пробірки на 1,5 мл, у кількості 500-600 мкл із кожної тварини.

Зразки залишали при 37 °C на 30 хв, після цього центрифугували на центрифугу Eppendorf 5810R (США) при 1300 g протягом 15 хв при +18°C. Обережно відбирали сироватку крові щурів у кількості 100-250 мкл у пронумеровані пробірки на 0,5 мл та поміщали їх на зберігання при -80°C.

Отримання зразків IgG із сироватки крові щурів

Імуноглобуліни осаджували з відповідних сироваток шляхом їх висолювання у сульфаті амонію згідно методики [279].

Для цього, сироватка змішували із насиченим розчином сульфату амонію та центрифугували 10 хв при 5 000 g, +4 °C. Надосад зливали, осад розчиняли в 0,05 мкмоль/л Трис*HCl з 0,15 мкмоль/л NaCl рН 7,2 (далі ТБС). Надалі проводили діаліз за допомогою діалізного мішка (#D0655-100FT, Millipore) проти ТБС, протягом ночі при +4 °C.

Оцінка вмісту IgG специфічних до білкових комплексів (агрегатів) у сироватках крові щурів

Дослідження було проведено із метою оцінки вмісту IgG специфічних до білкових комплексів (агрегатів), опосередкованих зв'язуванням гістидин-вмісних протеїнів із нікелем за умов підшкірної імплантації нікелевих пластин (основа імплантів нікелевих пластинок ТОВ «ОРТОСІНТЕЗ» LLC «ORTOSYNTEZ») щурам контрольної та дослідної групи.

Були протестовані отримані IgG із сироваток крові щурів отриманих на 85 добу експерименту.

Виділення та очищення імуноглобулінів класу G із сироваток імунізованих щурів проводили шляхом афінної хроматографії на сорбенті Protein G Sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare, США). Сорбент промивали від спирту 3 об'ємами деіонізованої води та урівноважували 5 об'ємами буфера А: 20 ммоль/л натрій-форсфатного буферний розчин, рН 7.0. Далі на сорбент наносили розведені в 10 разів буфером А, попередньо відцентрифуговані при 13000 g, 10 хв сироватки щурів. Сорбенти відмивали від неспецифічно зв'язаних білків 10 об'ємами буфера А та проводили елюцію очищених IgG, буфером 0,1 М гліцин-HCl, рН 2.5. Отримані елюати одразу нейтралізували додавання розчину 1 М Трис, рН 9.0. Далі проводили заміну буфера для елюції на 1xPBS на гельфільтраційній колонці HiTrap Desalting (GE Healthcare, США) проводили діаліз за допомогою діалізного мішка (№D0655-100FT, Millipore) проти ТБС, протягом ночі при +4 °С.

Для цього, у пробірки на 1,5 мл відбирали на аналіз по 100 мкл Ni-сефарози Ni Sepharose® 6Fast Flow Cytiva (GE17-5318-01, GE Healthcare) та відмивали їх водою від залишків спирту, після чого урівноважували сорбент буфером (100 ммоль/л Трис, 200 ммоль/л NaCl, 0,05 % Твін-20, рН 8.0). Надалі, наносили по 1 мл розведеної в 200 разів нормальної сироватки щурів, яким не проводили встановлення імплантів та інкубували 1 годину при постійному перемішуванні за кімнатної температури.

Промивку проведено сорбент-буфером, протягом 5 разів. Після цього наносили по 1 мл розведених в 200 разів отриманих імуноглобулінів від піддослідних тварин, осаджених у сульфаті амонію з відповідних сироваток. Інкубацію проводили 1 годину при постійному перемішуванні за кімнатної температури. Промивку проведено сорбент-буфером, протягом 5 разів та половину сорбенту відібрано на білкових електрофорез.

Чистоту отриманих імуноглобулінів G оцінювали шляхом електрофоретичного розділення зразків, згідно стандартної методики використовуючи для їхнього розділення 15 %-й ДСН-ПААГ [280].

Для цього зразки прогрівали при 95°C впродовж 5 хв в буфері Леммлі наступного складу: 62,5 ммоль/л Трис-НСІ рН 6.8, 10 % гліцерин, 5 % β -меркаптоетанол, 1 ммоль/л ЕДТА, 2 % додецилсульфат натрію та 0,4 % бромфеноловий синій). Вертикальний електрофорез проводили в 12 % поліакриламідному гелі (ПААГ), за присутності додецилсульфату натрію (ДСН) у Трис-гліциновому буфері, що містив 25 ммоль/л Трис-НСІ (рН 8.2), 192 ммоль/л гліцину та 0,1 % ДСН.

Оцінку кількості та вмісту білків проводили методом денситометрії електрофореграм з наступним аналізом їх програмою TotalLab. Як стандарт для побудови калібрувальної кривої використовували рекомбінантний інтерферон а2b людини (rhIFN-a2b) з відомою концентрацією.

Для визначення концентрації IgG проводили набором Pierce™ BCA Protein Assay Kit (№ 23225, Thermo Scientific).

Метод ґрунтуються на утворенні Cu^{2+} -білкового комплексу в лужних умовах з наступним відновленням наступним відновленням Cu^{2+} до Cu^{1+} (біуретова реакція), із використанням розчину біцинхонінової кислоти (BCA). Фіолетовий продукт реакції утворюється шляхом хелатування двох молекул BCA з одним іоном купруму. Цей водорозчинний комплекс має поглинання при 562 нм, яке є лінійним

зі збільшенням концентрації білка в широкому робочому діапазоні (20–2000 мкг/мл).

Для цього, робили серію розведень із однієї ампули стандарту 2 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA) у стерильній дистильованій воді, отримавши робочі розчини BSA із концентрацією 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 та 2000 мкг/мл. Надалі у лунки 96-лункового планшету (Thermo Scientific) вносили у двох повторях по 25 мкл кожного стандартного або невідомого зразка, додавали по 200 мкл робочого розчину із набору та ретельно перемішували планшет на шейкері протягом 30 секунд. Проводили інкубацію при 37°C протягом 30 хвилин. Після цього, вимірювали оптичне поглинання розчинів при 562 нм на мультипланшетному рідері Labsystems titertek multiskan plus MKII Type 314 microplate reader (Titertek-Berthold).

На другу половину сорбенту наносили вторинні противидові антитіла кон'юговані з пероксидазою (Sigma-Aldrich, США) у розведення 1: 60 000 та інкубували 1 годину при постійному перемішуванні за кімнатної температури. Промивку проведено сорбент-буфером, протягом 5 разів та сорбент-буфером без твіну (100 ммоль/л Трис, 200 ммоль/л NaCl, рН 8.0), також 5 разів. Проявку імунних комплексів проведено за допомогою хромогенного субстрату ТМВ (Sigma-Aldrich, США). Реакцію зупиняли додаванням 0,1 мкмоль/л H₂SO₄. Вимірювання проводили за довжини хвилі 450 нм на приладі Labsystems titertek multiskan plus MKII Type 314 microplate reader (Titertek-Berthold) у планшетах на 96 лунок.

Для аналізу взаємодії очищених з сироваток крові щурів IgG з нікелем, використовували Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva, США) та власну модифікацію імуноферментного аналізу [281].

Для проведення оцінки та порівняння потенційного зв'язування IgG з нікелем у дослідних групах. Сорбент відмивали від спирту 3 рази деіонізованою водою та урівноважували буфером 100 ммоль/л Трис, 200 ммоль/л NaCl, 0,1 % Твін 20 рН 8.0. Далі наносили очищені IgG, розведені в 100 разів буфером 100 ммоль/л Трис, 200

ммоль/л NaCl, 0,1 % Tween 20 рН 8.0 інкубували протягом години при постійному перемішуванні за кімнатної температури, відмивали 5 разів буфером та наносили вторинні противидові антитіла кон'юговані з пероксидазою (Sigma-Aldrich, США) у розведення 1: 50 000 та інкубували 1 годину при постійному перемішуванні за кімнатної температури. Проводили промивку сорбент-буфером 5 разів та сорбент-буфером без Твін-20 (100 ммоль/л Трис, 200 ммоль/л NaCl, рН 8.0), також 5 разів. Проявку імунних комплексів проведено за допомогою хромогенного субстрату ТМВ (Sigma-Aldrich, США). Реакцію зупиняли додаванням 0,1 ммоль/л H₂SO₄. Вимірювання проводили за довжини хвилі 450 нм на приладі Labsystems titertek multiskan plus MKII Type 314 microplate reader (Titertek-Berthold) у планшетах на 96 лунок.

Дослідження хемокінового профілю у сироватках крові щурів

Оцінку вмісту цитокінів (IFN- γ , IL-4, TNF- α та MCP-1) в сироватці крові щурів проводили з використанням мультиплексного набору Rat Cytokine multiplex Kit FlowCytomix (BMS826FF, eBioscience, США) згідно інструкції виробника, за допомогою протокового цитофлуориметру DxFlex (Beckman Coulter), який оснащений аргонним лазером (λ збудж. = 488 нм). Подальшу обробку результатів проводили за допомогою програми CytExpert for DxFLEX 2.0.2.18.

Для дослідження хемокінового профілю слідували даним протоколом:

1. Assay Buffer (AB) - відібрали 20 мл буферу Assay buffer Concentrate (10x) та додали 180 мл дистильованої води (без струшування та вспінювання). Буфер зберігали при температурі від +2°C до +8°C.

2. Приготування стандартних розчинів (S) - розчинили ліофілізовані стандартизовані зразки у дистильованій воді в об'ємі, що зазначено на етикетці пробірки. Осадили розчини та через 10-30 хв перемішали піпетуванням. Відібрали по 10 мкл отриманих розчинів та внесли їх до 140 мкл АВ (розведення 1:20, стандарт – S1). Зробили серію розведень стандартних розчинів, шляхом 3х розведення S1. Для цього у пробірки S2- S7 внесли по 100 мкл АВ, внесли 50 мкл зразку S1 у

пробірку S2, після цього 50 мкл зразку S2 у пробірку S3 та аналогічно зробили серію розведень до S7.

3. Приготування Bead Mixture (BeM) - відібрали по 20 мкл кожного Bead Set та внесли до 280 мкл АВ (розведення 1:20). Перемішали отриманий розчин та осадили при 3000 x g протягом 5 хвилин. Відібрали 350 мкл надосаду, внесли 350 мкл АВ та перемішали на вортексі 5 сек.

4. Приготування Biotin-Conjugate Mixture (BCM) - відібрали по 40 мкл кожного Biotin-Conjugate, внесли до 560 мкл АВ (розведення 1:20) та перемішали.

5. Приготування робочого розчину Streptavidin-PE (S-PE) - відібрали по 25 мкл розчину Streptavidin-PE та внесли до 730 мкл АВ (розведення 1:30,25) та перемішали.

Покроковий хід роботи (першого етапу дослідження) описано в Додатку Б.

2.1.2 Другий етап дослідження

На другому етапі дослідження через 5 місяців після імплантації в умовах виварію Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України тварин (щурів) виводили з експерименту шляхом введення летальної дози тіопенталу натрію (в/о 150-200 мг/кг) (ПАТ «Київмедпрепарат»).

Після видалення інкапсульованих імплантів для подальшого проведення гістологічного, морфометричного та імуногістологічного дослідження, зразки тканин фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну.

Вилучені імпланти віддавали на дослідження методом електронної мікроскопії (SEM).

З отриманими IgG проводили дослідження зразків імплантів методом стаціонарної краплі та методами атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії.

Гістологічне та імуногістохімічне дослідження зразків капсули

Гістологічне та імуногістохімічне дослідження отриманих зразків була проведено на кафедрі гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця згідно договору № 86.

Для гістологічного дослідження, зразки тканин фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну.

Через методику зневоднення у ізопропанолі матеріал ущільнювали у парапласті Leica Surgipath Paraplast Regular (Leica, США). Із парафінових блоків виготовляли зрізи товщиною 4 мкм. Отримані мікропрепарати забарвлювали гематоксиліном та еозином для дослідження морфологічних особливостей капсули, сіріусом червоним з пікриною кислотою для виявлення колагену [282], альціановим синім (рН=2,5) і ШИК-реакції для виявлення кислих та нейтральних глікопротеїнів.

Для імуногістохімічного дослідження парафінові зрізи товщиною 4 мкм фіксували на предметних скельцях Superfrost Plus (Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH, Німеччина). Демаскування антигенів та реакції проведено за протоколом виробника антитіл.

У роботі застосовано первинні антитіла проти: CD44 (Abcam, ab238464, США), CD68 (Abcam, ab201340, США), CD3e (Invitrogen, MA1-90582, США), GRP78 (Invitrogen, PA5-34941, США), Veclin-1 (Invitrogen, PA5-20171, США). Первинні антитіла розводили у співвідношенні 1:200. Візуалізацію продукту реакції здійснювали за використання системи детекції на основі діамінобензидину (EnVision FLEX; Dako, Glostrup, Данія). Час інкубації зрізів з первинними антитілами 60 хв при 24°C, час інкубації з вторинними антитілами 20 хв при 24°C. Гематоксилін Gill I було використано для забарвлення ядер клітин.

Мікропрепарати досліджували та мікроскопі Olympus BX51 (Olympus, Японія), мікрофотографії отримано за допомогою цифрової камери Olympus C3040ZOOM. Кількісне визначення колагену здійснювали денситометричним методом. Для цього були відібрані подібні зразки стінки капсули, які були

забарвлені сіріусом червоним, одержані мікрофотографії трансформували з RGB-типу у 8-бітне зображення, визначали поріг чутливості до позитивно забарвлених регіонів, визначали питому площу позитивних регіонів, які були рівні локалізації колагену у зразках тканин. Технічні процедури виконано за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

Кількісну оцінку імуногістохімічної реакції проведено з урахуванням інтенсивності та локалізації імунопозитивних клітин. Питому площу vimentin-імунопозитивної реакції визначали за методикою, яку описано для визначення колагену. Кількість клітин у досліджуваних полях підраховували на мікрофотографіях площею 2272×1704 px, що рівне $0,08 \text{ мм}^2$.

Дослідження вилучених імплантів методом електронної мікроскопії (SEM)

Дослідження отриманих зразків методом електронної мікроскопії була проведено в Інституті хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України згідно договору № 218.

Імпланти, які були вилучені досліджувались методом електронної мікроскопії (SEM), з використанням скануючого мікроскопу Tescan Mira 3 LMU (Tescan, Чехія), що обладнано енергодисперсійним спектрометром Oxford Instruments X-Max 80 (Oxford Instruments, Великобританія) для виявлення стану поверхні імплантату.

Зразки досліджували у режимі детекції вторинних (вибитих електронів з атомів; SE) та зворотньорозсіяних (BSE) електронів. Локальний елементний склад імплантів аналізували за допомогою енергодисперсійного спектрометра Oxford Instruments X-Max 80 (Oxford Instruments, Великобританія) [283, 284].

Дослідження зразків імплантів методом стаціонарної краплі та методами атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії була проведено в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України згідно договору № 82.

Проведення дослідження поверхні методом стаціонарної краплі (кут змочування в точці контакту трьох фаз (метал-вода-повітря))

Контактний кут – це вимірювання, яке кількісно визначає змочування твердого тіла рідиною. Геометрично він визначається як кут, утворений рідиною в точці трьох фаз, де перетинаються рідина, газ та тверде тіло.

Поверхневу енергію матеріалу можна приблизно оцінити за допомогою методу змочування (розтікання рідини). Адсорбція, адгезія, вільна енергія поверхні, шорсткість поверхні та інші фактори впливають на контактний кут стаціонарної краплі на поверхні твердого тіла [285, 286].

Змочуваність, величина, обернена контактного кута рідини (water contact angle WCA), може бути використана для оцінки біоадгезії. Значення WCA безперервно контролювалися саморобним аналізатором форми краплі на основі цифрового визначення профілю краплі. В роботі кут змочування вимірювався за оптичними зображеннями з використанням безкоштовного програмного пакету ImageJ та плагіну Drop analysis [287]. Покроковий хід роботи вказано в Додатку В.

Відтворюваність вимірювань WCA була приблизно $\pm 0,2^\circ$. Для запобігання інтенсивному випаровуванню, дослідження проводились в закритій камері з високою вологістю. Фіксований об'єм крапель складав 4 мкл. Такий, відносно, малий об'єм краплі зводить до мінімуму вплив гравітації на її форму.

Контактний кут α на макромасштабі може бути визначений за допомогою добре відомого рівняння Юнга, заснованого на мінімізації вільної енергії системи тверде тіло-рідина-пара. Його можна записати в термінах поверхневих енергій і для випадку плоскої поверхні та неактивного змочування:

$$\cos\alpha = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}$$

де γ_{SV} , γ_{LV} , γ_{SL} – поверхнева енергія вільної поверхневої енергії твердого тіла, рідини та міжфазної енергії межі розділу фаз тверде тіло - рідина, відповідно.

Робота адгезії (W_a) являє собою роботу, необхідну для розділення двох зчеплених конденсованих фаз, тобто енергію двох нових поверхонь, які створюються мінус енергію межі розділу, яка вираховується як:

$$W_a = \gamma SV + \gamma LV - \gamma SL$$

Це означає, що адгезійні властивості поверхні можна оцінити за допомогою WCA на макромасштабі.

Роботу адгезії (енергію адгезії) було оцінено шляхом підстановки γLV (72,7 мДж/м²) [288] і вимірних значень WCA за допомогою рівняння:

$$W_a = \gamma LV(1 + \cos\alpha)$$

Проведення дослідження властивості матеріалів імплантів на нанорівні з використанням методів атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії.

Роботу адгезії можна виміряти безпосередньо методом АСМ спектроскопії на нанорівні. Ця методика забезпечує реєстрацію сили взаємодії зонда з поверхнею залежно від відстані (крива сила-відстань) [289].

Дослідження за запропонованою методикою за допомогою за допомогою атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії проведено за наступним протоколом:

Підготовка АСМ зондів. Поверхня зонда Si₃N₄ (VEECO Corp.) функціонували шляхом нанесення IgG (щурячий) за описаною методикою [290, 291] покровока схема проведення функціоналізації зонду наведена на рис. 2.7, концентрація IgG у розчині 0,9% NaCl становила 0,1 мкг/мл.

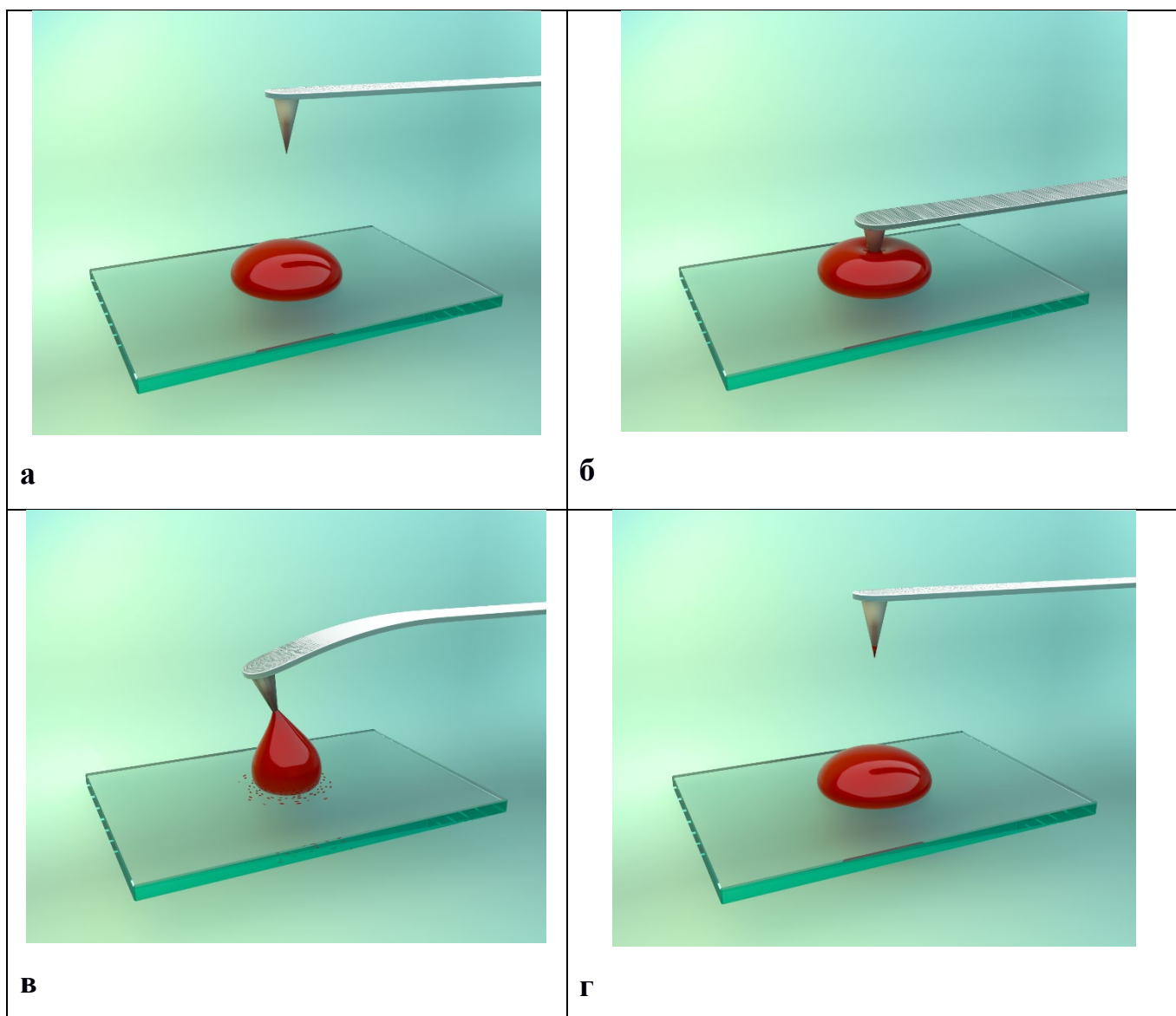


Рисунок 2.7 – Покрокова схема етапів проведення функціоналізації зонду IgG

Підготовка тестових поверхонь. Для отримання достовірних даних вимірювання, необхідно забезпечити максимально наближені до організму умови адгезії білків на поверхні. Тому оптимальним для адгезії біомолекул на поверхні, що досліджується є її обробка сумішшю Нікіфорова (сірчаний ефір та спирт у співвідношенні 1:1).

Для підтвердження достовірності отримуваних результатів вимірювання силових взаємодій між функціоналізованим АСМ зондом до поверхні, проводили порівняння зі значеннями сили адгезії чистого зонду АСМ до цієї ж поверхні.

Експеримент був параметризований за допомогою ймовірності від'єднання, яка визначається як відношення між кількістю АСМ-вимірювань адгезивних властивостей, досліджених за допомогою АСМ-від'єднання подій до загальної кількості записаних силових кривих. Ця величина (показник) пропорційна числу сайтів зв'язування молекули рецептора (або числу рецепторів, якщо на його поверхні присутній тільки один сайт зв'язування).

Для достовірності даних дослідження використовувались різні поверхні, які попередньо проходили спектроскопію для визначення вмісту елементів: нікелеві пластини (Ni) – аналогічної яку імплантували піддослідним тваринам, пластинки що містять (Fe+Cr+Ni+Mo+Mn) та пластинки що містять (Ti+2%Al).

Запис силових кривих.

Класифікація адгезивних властивостей за допомогою АСМ проводиться в режимі силової спектроскопії де записуються силові криві.

Для дослідження властивостей зразків методом АСМ широко застосовують режим силової спектроскопії [292-294].

Дослідження біоадгезивної сили відриву проводилися на скануючому зондовому мікроскопі NANOSCOPE IIIa (VEECO Corp.) з зондом Si₃N₄ (VEECO Corp.) при температурі 22°C та відносній вологості 40%, методами атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії. Швидкість вертикального переміщення зонду вибиралась в діапазоні від 20 до 20000 нм/сек. Для вимірювань використовувались контактні зонди із Si₃N₄ марки DNP-20 (Veeco Inc.) із V-подібним кантилевером. Усереднений радіус вістря зонду складав 30 нм, (стала пружності консолі 0,32 нН/нм). Контроль форми вістря проводився перед та після вимірювань за методом «сліпої реконструкції» із використанням тестової ґратки TGT-1 (NT-MDT).

Уточнення значення жорсткості кантилевера проводилось за аналізом спектру його температурного шуму. Схема вимірювань представлена на рис. 2.8.

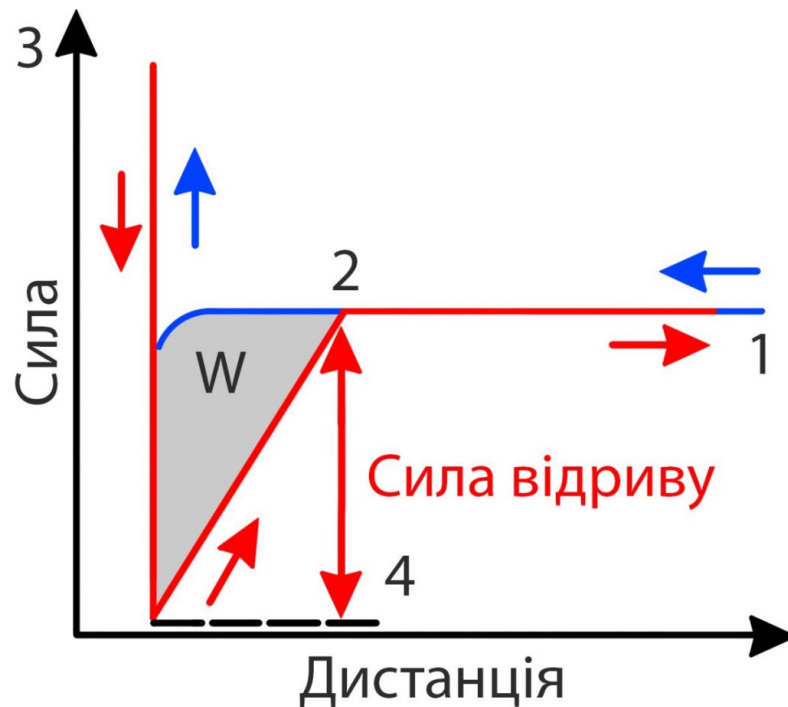


Рисунок 2.8 – Схема запису кривої сила – відстань.

У початковий момент функціоналізований зонд, знаходиться далеко від поверхні зразка (точка 1) і сила взаємодії поверхня- функціоналізований зонд дорівнює нулю.

Далі АСМ система вертикального переміщення зонда підводить, наближається до поверхні, контролюючи відстань з ангстремною точністю. При деякій мінімальній відстані «зонд-поверхня» відбувається захоплення функціоналізованого зонда поверхнею під дією сил тяжіння (точка 2). При подальшому зближенні зонда і поверхні починають діяти сили відштовхування, що перешкоджають проникненню зонду в поверхню.

Після досягнення максимального значення сили відштовхування (задається оператором виходячи з умов експерименту) – (точка 3) починається зворотне вертикальне переміщення зонда - відводиться від поверхні. Для того, щоб від'єднати зонд від поверхні, необхідно докласти деяку силу відриву. При цьому,

рівнодіюча всіх сил, що утримують функціоналізований зонд біля поверхні врівноважується силою пружної деформації консолі зонда в точці 4, в якій і відбувається відрив від поверхні.

Таким чином, максимальна величина сили біoadгезивної взаємодії відповідає величині сили відриву зонда від поверхні (точка 4), що дорівнює силі пружної деформації консолі зонда, вимірювальною системою детектування АСМ. Для кожного зразка було виміряно сотні кривих сила-відстань. Покрокова модель проведення вимірювання сили біоагезії наведено на рис. 2.9.

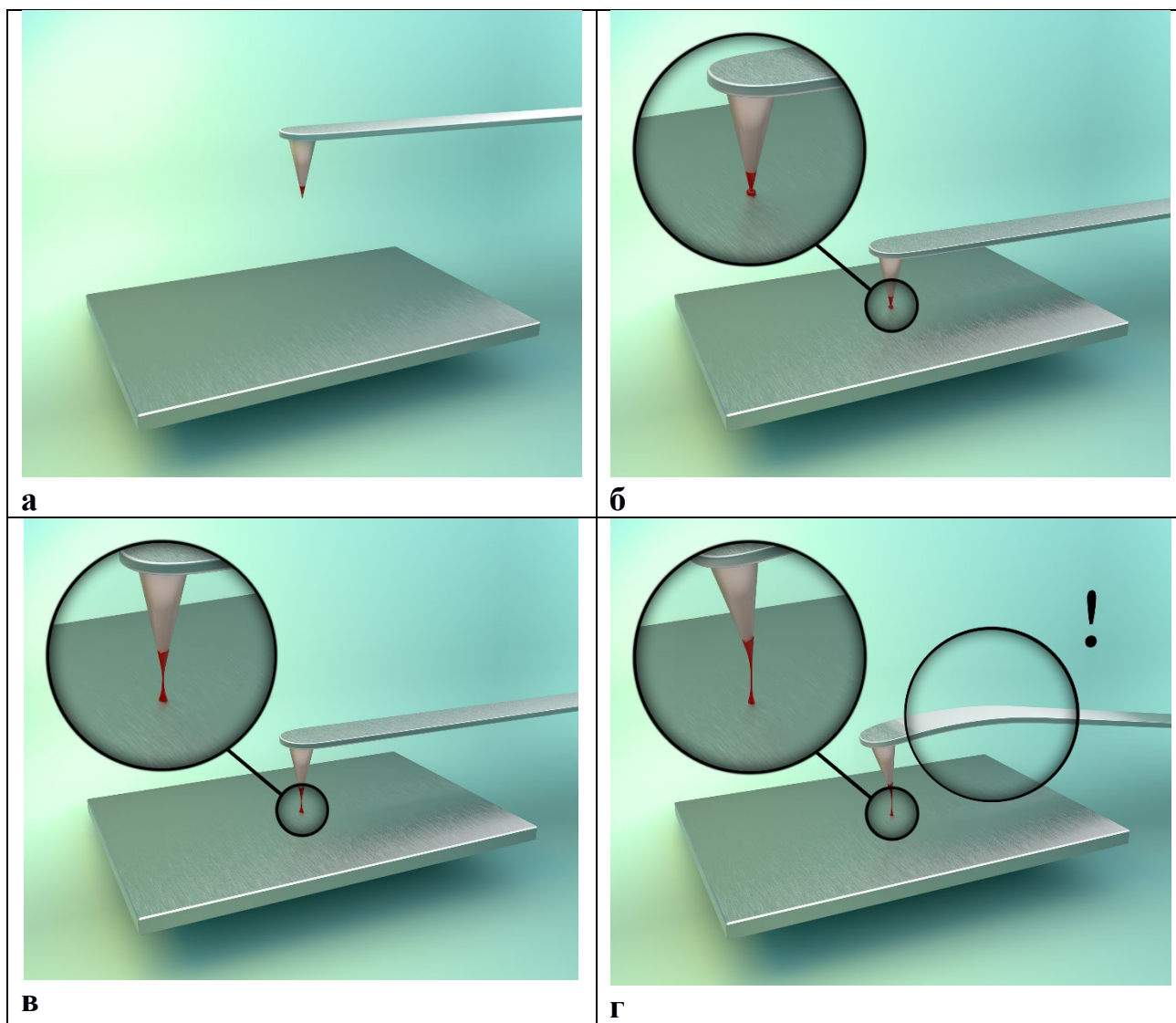


Рисунок 2.9 – Схематична модель проведення вимірювання сили біоагезії

Вимірювання проводяться як на повітрі, так і у водному розчині з метою перевірити різницю між отриманими даними, чи є вона суттєвою для проведення оцінок сил біoadгезії.

Під час вимірювань в атмосфері на поверхні зразка через присутність капілярних сил утворюється так званий капілярний місток, який дає значний внесок у величину адгезивних сил.

Таким чином, значення сили відриву при вимірюваннях на повітрі є більшими, ніж під час вимірювань у водному розчині. Однак, якісні співвідношення між значеннями сил відриву для різних зразків зберігаються.

Зонд можна від'єднати від поверхні на більшій висоті, ніж він був захоплений (трикутник зі знаком W). Цей гістерезис зумовлений поверхневою адгезією, а робота адгезії дорівнює площі трикутника. Форма петлі гістерезису може бути складнішою у випадку багатоетапного відриву, однак у наших вимірюваннях була виявлена лише трикутна зона. Абсолютна робота адгезії дорівнює:

$$W_a = F_{\text{pull-off}}^2 / 2k$$

де k — постійна пружини кантилевера АСМ-зонда.

Енергію адгезії оцінюють за значенням критичної сили моделі Джонсона Кендалла-Робертса (JKR) [295, 296]:

$$W_{\text{adh}} = F_{\text{pull-off}} / 1,5\pi R$$

де R – радіус вершини АСМ.

Вимірювання адгезія зонда зумовлена головним чином біoadгезивними/капілярними силами. Капілярна сила, достатня для розриву водяного містка між зондом та поверхнею, може бути використана для оцінки W_{CA} на наномасштабі [297].

2.2 Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмних пакетів StatPlus 7.0. та Origin v.9.0.

Центральну тенденцію та варіацію кількісних показників позначали як $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартна похибка середнього арифметичного; або як $Me (Q_1-Q_3)$, де Me – медіана (50 % центиль), Q_1-Q_3 – перший і третій квартилі (25 % і 75 % центилі), відповідно (міжквартильний інтервал).

Порівняння кількісних показників у двох незалежних вибірках здійснювали за допомогою U-критерію Mann-Whitney; у трьох незалежних вибірках – за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA з урахуванням поправки Bonferroni), чи непараметричного дисперсійного аналізу (Kruskal-Wallis), з наступними порівняннями з використанням U-критерію Mann-Whitney.

Кореляційні зв'язки ми аналізували за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Spearman.

Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Статистичну обробку даних проведено відповідно до вимог ДФУ [298].

Матеріали розділу висвітлені в наступних наукових роботах:

1. Лазаренко Г.О., Гузик М.М., Савосько С.І. Визначення реакції гіперчутливості до ортопедичних імплантатів (експериментальне дослідження) *«Тканинні реакції в нормі, експерименті та клініці»*: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченій пам'яті членкор. НАМН України, д.мед. н., проф. Ю.Б. Чайковського, 08-09.06.2023 р. Київ

2. Lazarenko HO, Savosko SI, Guzyk MM, Boiko IV. Features of using orthopedic implants on an experimental model of sensitization to nickel (Ni). *Clinical and Preventive Medicine*. 2023; (6(28))

3. Лазаренко Г.О., Литвин П.М. Спосіб визначення сумісності імплантата з організмом реципієнта *Патент України на корисну модель № 147875*, 17.06.2021

4. Лазаренко Г.О., Литвин П.М. Спосіб визначення сумісності імплантата з організмом реципієнта *Патент України на корисну модель № 147582*, 20.05.2021

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЮ ОРГАНІЗМУ НА ОРТОПЕДИЧНІ ІМПЛАНТАТИ ПРИ НАЯВНОСТІ РЕАКЦІЇ ГІПЕРЧУТЛИВОСТІ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ НА ТВАРИНАХ (РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ)

Тема реакції гіперчутливості до металів (РГМ) входить у перелік найбільш суперечливих та складних в ортопедо-травматологічній практиці. Наразі бракує надійних діагностичних або скринінгових інструментів для оцінки повного спектру реакцій пацієнта на металевий імплант. Більшість металів які використовуються є імунологічно активними та спричиняють алергічні реакції.

Реакції гіперчутливості — це функція адаптивної імунної системи. За класифікацією Gell та Coomb's вони розділяються на: Тип I, Тип II (опосередковані антитілами), Тип III і Тип IV (опосередковані клітинами, відстрочений) [15].

Переважає більшість РГМ в ортопедичних імплантатах є IV тип/реакції гіперчутливості уповільненого типу.

Відсутність загальних рекомендацій щодо діагностики та лікування призводить більш індивідуального підходу до лікування та у зв'язку з цим можливої непослідовності в тактиці діагностики та лікування, що у свою чергу, ускладнює розробку рекомендацій.

РГМ є діагностично складними, оскільки вони є діагнозом виключення. Достеменно невідомо, які біомаркери можуть достовірно передбачити потенційну патологічну реакцію на імплантати.

Наразі, існує обмежена кількість підходів передбачити або діагностувати несподівані прояви реакції на метал. Найбільш поширеними є такі діагностичних тести, як патч-тестування та тест на трансформацію лімфоцитів, однак немає чіткої настанови щодо того, як ці тести слід використовувати в клінічних умовах.

Кількість пацієнтів з тотальним ендопротезуванням суглобів з позитивними тестами на РГМ зростає експоненціально протягом останніх 20 років.

Оскільки число ендопротезування та використання ортопедичних імплантатів продовжує зростати, очікується, що кількість ускладнень пов'язаних з реакцією на імпланти, також зростає. Так, згідно з проведеними підрахунками приблизно 11 мільйонів людей будуть жити з тотальним ендопротезуванням кульшового або колінного суглобів до 2030 р.

Таким чином, оцінка РГМ ортопедичного імплантату стає все актуальнішою проблемою сучасної імплантології.

Існуючі прогалини та недоліки підкреслюють необхідність проведення нових, клінічно значимих діагностичних та прогностичних передімплантаційних тестів для визначення ймовірності алергічної відповіді, викликаной імплантатом та адекватної оцінки всього спектру можливих реакцій після імплантації.

Клінічно значущі функціональні дослідження на тваринах часто використовуються для оцінки реакції місцевої тканини у відповідній анатомічній ділянці в імітованих умовах клінічного використання.

Дослідження імплантації можуть допомогти оцінити реакцію місцевої тканини на металеві компоненти в імплантах.

Добре відомо, що існують відмінності в анатомії та фізіології між моделями людей та тварин [299].

Ці відмінності часто перешкоджають адекватній *in vivo* оцінці біологічної реакції спричиненні імплантатами.

Імунна система - сукупність органів, тканин, клітин, які забезпечують захист організму. При всіх процедурах пов'язаних з імплантацією в біологічну субстанцію виникає контакт поверхні імплантату з органічними речовинами.

Цей процес включає, перш за все, адсорбцію захисних білків, на поверхню імплантів, який надалі може викликати реакцію запалення. Адсорбований шар протеїну залежить від характеристик поверхні та утворюється впродовж декількох

секунд після імплантації. Адсорбція білків на цій стадії відбувається випадково. Цей адсорбований шар визначає реакцію організму на імплантат та може контролювати сприйняття його тканинами реципієнта.

Як було раніше зазначено швидкість адсорбції (зворотної або незворотної) та її характер залежать від властивості поверхні матеріалу.

Таким чином, для вивчення реакції організму на імплантат можна використовувати антитіла, виділені з крові реципієнта, в якості сенсора активних центрів на поверхні чужорідного матеріалу, який реагує на сили біoadгезії, що виникають при їх контакті.

Реакції імунної системи підлягає генетично чужорідне. В будь-якому стані організму імунна система постійно працює, хоч і з різним ступенем активності.

Антитіла (АТ) володіють здатністю специфічно зв'язувати відповідні антигени (АГ). Зв'язування АТ з АГ - вирішальна ланка в системі захисту організму від позаклітинних вірусів і бактерій. В результаті такої взаємодії останні розпізнаються як чужорідні тіла і надалі запускається каскад їх елімінації.

"Пам'ять" імунної системи представлена так званими "клітинами пам'яті". Це найбільш довгоіснуючі клітини для кожного типу імунних клітин. Реакція «АГ» - «АТ» - специфічна взаємодія АТ з відповідними АГ, в результаті якого утворюються комплекси «АГ/АТ» (імунні комплекси). Антигензв'язувальні центри молекули АТ можуть зв'язувати декілька неспоріднених АГ.

Реакцію системи неспецифічного захисту умовно можна поділити на реакцію, яка забезпечується "локальними силами" природного захисту, що знаходяться у місці проникнення антигену, та реакцію, яка потребує додаткового залучення "допоміжних сил" з кровотоку.

В першому випадку реакція включає три етапи: розпізнавання антигену (I етап), взаємодія факторів природного захисту з антигеном (II етап) та елімінація антигену (III етап).

У другому випадку неспецифічна реакція складається з таких етапів: розпізнавання антигену (I етап), формування осередку запалення та залучення додаткових лейкоцитів у осередок запалення (II етап), активація лейкоцитів під час взаємодії з антигеном (III етап) та елімінація антигену (IV етап).

Специфічна реакція на антиген складається з більшого ряду послідовних етапів: транспортування антигену в лімфоїдні органи (I етап), розпізнавання антигену лімфоцитами та активація (II етап), проліферація і клональна експансія цих лімфоцитів (III етап), диференціювання активованих антигеном клітин, кількість яких збільшилася внаслідок проліферації (IV етап), утворення ефektorних клітин та розвиток реакцій за їх участю (V етап).

Тому умовно імунну відповідь можна поділити на індуктивну (I і II етапи), продуктивну (III і IV етапи) й ефektorну (V етап) фази. Вдалим завершенням специфічної реакції є повна елімінація антигену з організму.

Здатність АТ зв'язувати антигенні частинки у великі конгломерати (аглотинація бактеріальних та інших клітин, преципітація розчинених антигенів) обумовлюється наявністю принаймні двох активних центрів в молекулі АТ. Одна специфічна група з'єднується з однією антигенною детермінантою, інша - з аналогічною детермінантою іншої антигенної частинки. Бівалентність АТ забезпечує можливість з'єднання необмеженого числа антигенних частинок в конгломерати. При різному числі антигенних детермінант на молекулі АГ характер структури конгломератів комплексу «АГ/АТ» може бути різним. При надлишку АГ або АТ великі конгломерати взагалі не виникають внаслідок заповнення реагуючих ділянок молекул надмірною кількістю другого компоненту.

Тільки два класи антитіл (IgG і IgM) забезпечують активацію системи комплементу. Залежно від специфічності АТ, типу «клітин-мішеней», числа і природи компонентів комплементу, що беруть участь в реакції, можуть спостерігатися незворотні пошкодження клітинної мембрани, збільшуватися

сприйнятливість до фагоцитозу, вивільнятися фармакологічні агенти типу гістаміну, відбуватися направлені міграції клітин (хемотаксис).

При проведенні експерименту з АГ та АТ ми спостерігаємо утворення міжмолекулярних зв'язків, які можливо розірвати дією певної зовнішньої сили.

Специфічність взаємодії антиген – антитіло можна охарактеризувати через такий показник як афінність антитіл.

Афінністю або спорідненістю антитіл до антигену називають результуючу силу їх взаємодій, яка визначається сукупністю сил притягання та відштовхування, що діють між активним центром АТ і епітопом АГ. При контакті специфічних антитіл з антигеном між амінокислотними залишками антигензв'язуючого центру АТ та епітопами АГ виникають усі можливі нековалентні зв'язки, зокрема:

- Іонні,
- Водневі зв'язки,
- Сили Ван дер Ваальса,
- Неполлярні гідрофобні взаємодії, утворення яких обумовлене енергетичною перевагою контакту гідрофобних ділянок молекул між собою у порівнянні із їх взаємодією з водою.

Саме гідрофобні зв'язки забезпечують до 50% усієї спорідненості між антигенами і антитілами.

Враховуючи все вищевикладене, було ухвалено рішення провести експериментальне дослідження на тваринній моделі для вивчення реакції організму на ортопедичні імплантати з нікелем при штучній сенсibiliзації на цей матеріал та без неї.

3.1. Імунізація тварин, імплантація нікелевих пластин та проведення лабораторних аналізів.

Дослідження було проведено на 25 тваринах, щурах, самках лінії Wistar, масою 150-165 гр., початкові та наступні етапи взваження під час експерименту наведені в таблиці 3.1. Вік тварин до початку експерименту був 3 місяці.

Таблиця 3.1

Зважування тварин на початку дослідження

Група / термін спостереження	Початок експерименту	Екватор експерименту	Виведення з експерименту
Інтактні	155,8±4,5	186,6±7,2	247,3±11,1
Контрольна	158,8±2,5	192,3±4,1	252,2±16,1
Дослідна	159,8±3,4	192,5±4,5	268,7±5,0

Для отримання доказових результатів тварин випадковим чином було розподілено на 3 групи: група №1 – інтактні тварини (ІТ), 6 щурів – яким не виконувалось оперативне втручання; група №2 – контрольні (К), 6 щурів без попередньою сенсibilізацією ад'ювантом Фрейнда до Ni та встановленням Ni-вмісного імпланту; група №3 – дослідні (Д), 13 щурів з попередньою сенсibilізацією ад'ювантом Фрейнда до Ni та встановленням Ni-вмісного імпланту.

Покрокове проведення сенсibilізації на Ni, докладно описана у розділі 2. Через тиждень після проведення останньої вушної проби, тваринам з групи 2 (контрольні) та групи 3 (дослідні) нами було виконано оперативне втручання по встановленню імплантів (пластинки з Ni) більш детально дана процедура описано у розділі 2. В день проведення імплантації, через 3 та 5 місяців тваринам проводився забір крові для проведення подальших досліджень.

3.1.1. Результати дослідження

Через 3 місяці після проведеної імплантації піддослідним тваринам нами було проведено загальний аналіз крові для визначення загальної кількості лейкоцитів, дані представлені в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Результати аналізу загальної кількості лейкоцитів у крові щурів через 3 місяці після імплантації

Група	Кількість лейкоцитів, од×10 ⁹	U-критерій Манна-Уїтні
Інтактна	19,7±3,6	-
Контрольна	24,4±3,2	P(іт-к)=0,26
Дослідна	27,3±2,1	P(іт-д)=0,06 P(к-д)=0,10

За результатами дослідження аналізу було виявлено, що у тварин дослідної групи в порівнянні з контрольною групою більш високий показник кількості лейкоцитів, що вказує наявність запального процесу. Показник у дослідній групі порняні з контрольною достовірно вищий за U-критерієм Манна-Уїтні (p=0,10).

Дослідження хемокінового профілю у сироватках крові щурів

Низка експериментальних досліджень переконливо підтверджують ідею про те, що патогенез алергічних захворювань пов'язаний з дисбалансом між імунними відповідями Th1/Th2 [300].

За останні кілька років було продемонстровано, що алергічне запалення пов'язане з посиленою імунною відповіддю Th2. Хемокіни, або хемоаттрактанти, відіграють важливу роль при алергії не тільки через їхню участь у регуляції рекрутингу лейкоцитів (головним чином базофілів, еозинофілів і тучних клітин), але також тому, що вони можуть регулювати клітинну активацію та вивільнення медіаторів запалення, синтез IgE, і рекрутинг клітин Th2 до місця алергічного запалення [301].

Цитокіни можуть бути як причиною деяких початкових ознак запалення так і вирішальними факторами патогенезу алергічних захворювань [302].

У нашій роботі нами було використано комерційний набір для визначення вмісту таких цитокінів, як IFN- γ , IL-4, TNF- α та MCP-1 в сироватці крові щурів, із використанням протокової цитофлуориметрії та комерційного набору Rat Cytokine multiplex Kit FlowCytomix.

Даний мультиплексний підхід дозволив кількісно оцінити концентрацію різних цитокінів в одному і тому ж зразку сироватки. Типові діаграми детекції цитокінів наведено на рис. 3.1.

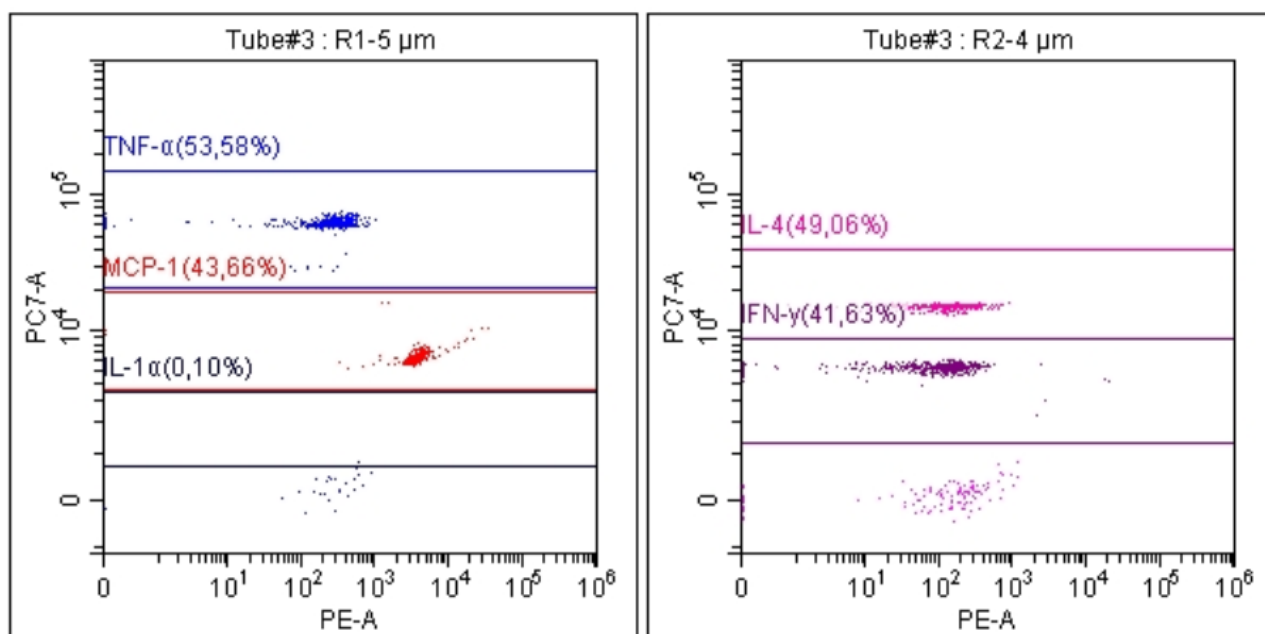


Рисунок 3.1 – Типові діаграми отримані під час вимірювання вмісту цитокінів у зразках сироватки крові щурів із використанням протокової цитометрії.

Як відомо, IFN- γ належить до родини інтерферонів, володіють здатністю захищати клітини від вірусних інфекцій. IFN- γ також відіграє важливу роль при алергічних захворюваннях. Так, було показано, що вплив IFN- γ на алергічні захворювання опосередковується різними механізмами, такими як регуляція представлення алергену Т-лімфоцитам, (диференціація наївних Т-клітин у бік фенотипу Th1 та/або інгібування крутингу/диференціації клітин Th2, пригнічення

вивільнення цитокінів Th2 з активованих Т-клітин, інгібування залучення ефektorних клітин до вогнища запалення, індукція апоптозу в Т-клітинах і еозинофілах, блокування перемикавання ізо типу IgE у В-клітинах, індукція продукування оксиду азоту (NO) тощо [300].

При алергічному контактному дерматиті, активовані CD8⁺ Т-клітини вивільняють *IFN-γ* і *TNF-α*, ці цитокіни є потужним активаторами кератиноцитів [303].

TNF-α разом з іншими цитокінами індукує дозрівання дендритних клітин та їх міграцію зі шкіри до дренуючих лімфатичних вузлів [304].

В отриманими нами результатах дослідження було визначено, що концентрація *IFN-γ* та *TNF-α* у зразках сироватки інтактних тварин становить 42,2 [41,5-43,6] пг/мл та 442,2 [441,6-460,3] пг/мл, відповідно (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Концентрація цитокінів у зразках сироватки крові щурів, визначена за допомогою Rat Cytokine multiplex Kit FlowCytomix

Групи	IFN-γ, пк/мл			IL-4, пк/мл		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
Інтактні	42,8	41,5	43,6	66,4	65,6	68,1
Контрольні	40,4	40,0	42,1	66,7	64,1	68,1
Дослідні	41,9	40,8	43,4	67,7	64,9	70,0
	TNF-α, пк/мл			MCP-1, пк/мл		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
Інтактні	442,2	441,6	460,3	8275,2	8143,0	8366,4
Контрольні	442,2	435,7	444,9	9024,2	8968,1	9737,2
Дослідні	440,0	444,0	444,0	9335,9*	8643,4	10839,4

Примітка: * – дані представлені у вигляді медіани та інтерквартильного інтервалу Me [LQ-UQ], де Me — медіана (50-й процентиль), LQ – 25-й процентиль, UQ – 75-й процентиль

Достовірних відмінностей у рівні даних цитокінів у сироватці крові досліджуваних груп не було виявлено ($p > 0,05$).

Так, концентрація IFN- γ у сироватці крові тварин контрольної та дослідної груп становила 40,4 [40,0-42,2] пг/мл та 41,9 [40,8-43,4] пг/мл, відповідно.

Концентрація ж TNF- α у сироватці крові тварин контрольної та дослідної груп становила 442,2 [435,7-444,9] пг/мл та 440,0 [434,2-444,0] пг/мл, відповідно.

Інтерлейкін (IL) 4 є ключовим цитокіном у розвитку алергічного запалення. Це пов'язано з індукцією перемикання ізотипу ϵ та секрецією IgE В-лімфоцитами [305].

Імунні відповіді, опосередковані IgE, додатково посилюються IL-4 через його здатність активізувати рецептори IgE на поверхні клітини: рецептор IgE з низькою спорідненістю (Fc ϵ RII; CD23) на В-лімфоцитах і мононуклеарних фагоцитуючих клітинах і рецептор IgE з високою спорідненістю (Fc ϵ RI) на тучних клітинах і базофілах [306].

IgE-залежна активація тучних клітин, індукована IL-4, відіграє ключову роль у розвитку алергічних реакцій негайного типу. IL-4 збільшує експресію еотаксину та інших запальних цитокінів з фібробластів, які можуть сприяти запаленню та ремоделюванню тканин при хронічній астмі [307].

Завдяки взаємодії молекул адгезії судинних клітин (VCAM)-1 та IL-4 здатний спрямовувати міграцію Т-лімфоцитів, моноцитів, базофілів і еозинофілів до запальних локусів.

Окрім того, IL-4 пригнічує апоптоз еозинофілів і сприяє еозинофільному запаленню, індукуючи хемотаксис еозинофілів і активацію через підвищену експресію еотаксину [308]. Важливою біологічною активністю IL-4 у розвитку алергічного запалення є здатність керувати диференціюванням наївних Т-хелперних лімфоцитів типу 0 (Th0) у лімфоцити Th2 [309, 310]. Клітини Th2 здатні секретувати IL-4, IL-5, IL-9 та IL-13, але втрачають здатність виробляти IFN- γ [311].

За даних експериментальних умов, достовірних відмінностей у рівні прозапального цитокіну IL-4 у сироватці крові досліджуваних груп не виявлено ($p > 0,05$).

Значення концентрації IL-4 у сироватці крові тварин інтактної, контрольної та дослідної груп становили 66,4 [65,6-68,1] пг/мл, 66,7 [64,1-68,1] пг/мл та 67,4 [64,9-70,0] пг/мл, відповідно (таблиця 3.3).

Моноцитний хемоатрактантний пептид-1 (MCP-1) є потужним хемокіном для багатьох типів лейкоцитів, включаючи моноцити та Т-клітини. Він може секретуватися фібробластами, ендотеліальними клітинами, тучними клітинами та кератиноцитами під впливом запальних подразників [312].

Відомо, що MCP-1 є важливим медіатором у різних патологічних станах, включаючи алергічний риніт, астму та псоріаз. Було показано, що експресії MCP-1, індукована впливом нікелю, була пов'язана з міграцією моноцитів і лімфоцитів під час контактної гіперчутливості, що свідчить про початкове залучення неспецифічного MCP-1-індукованого прозапального сигналу під час нікелю-індукованого алергічного контактного дерматиту, при цьому основний внесок у вивільненні MCP-1 внесли кератиноцити [313].

Згідно отриманими нами результатах дослідження було виявлено тенденцію до зростання рівня MCP-1 у контрольних тварин (9024,2 [8968,1-9737,2] пг/мл) у порівнянні із інтактною (8275,2 [8143,0-8366,4] пг/мл), таблиці 3.3. У той же час, у дослідної групи концентрація MCP-1 у сироватці крові становила 9335,9 [8643,4-10839,4] пг/мл та була достовірно більшою ($p = 0,0364$) у порівнянні із значенням у інтактній групі.

Отже, із використанням протокової цитофлуориметрії визначено концентрацію таких цитокінів, як IFN- γ , IL-4, TNF- α та MCP-1 в сироватці крові щурів за умов нікель-асоційованої алергічного стану. Було виявлено зростання рівня MCP-1 у дослідних тварин. Таким чином, таргетування MCP-1 може бути

потенційною терапевтичною стратегією визначення реакції гіперчутливості на Ni [313].

Виділення імуноглобулінів класу G із сироватках крові щурів та їх характеристика

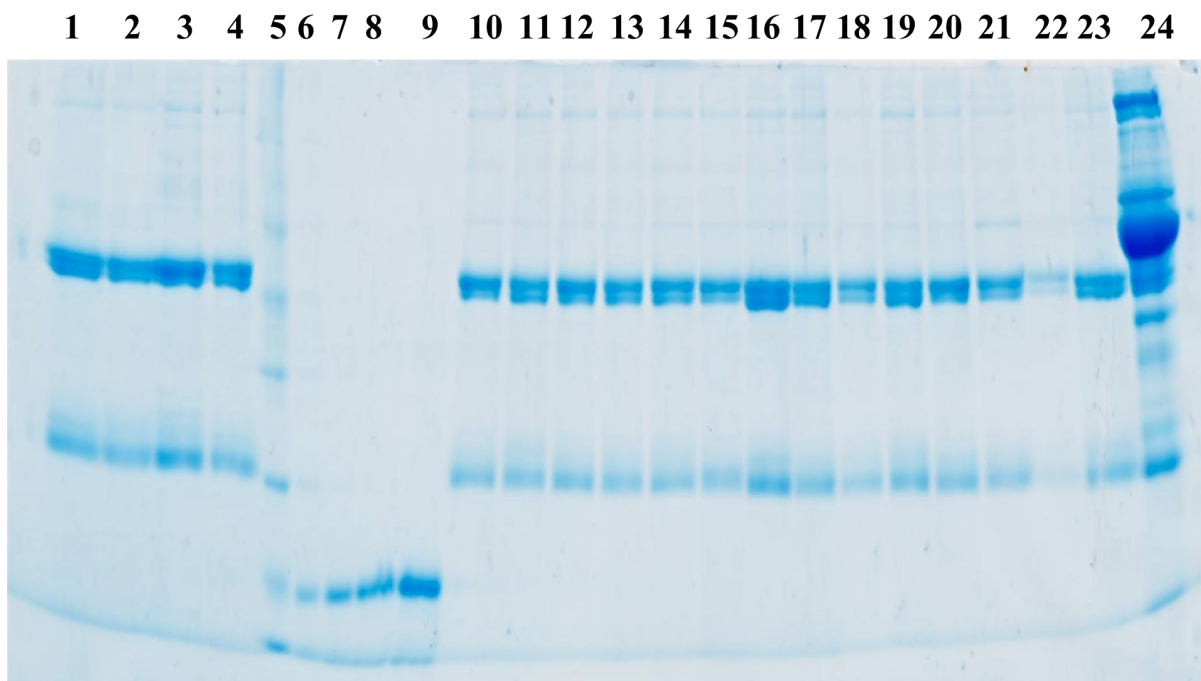


Рисунок 3.2 – Електрофореграма розділення білків у 12 % ДСН-ПААГ, IgG з сироваток крові щурів, отриманих після їх очищення на протеїн G Sepharose

Умовні позначення до рис. 3.2: 1 – Інтакт №2 (термін 1); 2 – Інтакт №2 (термін 2); 3 – Інтакт №3 (термін 1); 4 – Інтакт №3 (термін 2); 5 – білкові маркери (№26610, Thermo Sci.); 6, 7, 8 та 9 – маркер концентрації IFNa2b 0.25, 0.5, 1 та 2 мкг, відповідно; 10 – Контроль №10 (термін 1); 11 – Контроль №10 (термін 2); 12 – Контроль №11 (термін 1); 13 – Контроль №11 (термін 2); 14 – Дослід №13 (термін 1); 15 – Дослід №13 (термін 2); 16 – Дослід №15 (термін 1); 17 – Дослід №15 (термін 2); 18 – Дослід №16 (термін 1); 19 – Дослід №16 (термін 2); 20 – Дослід №17 (термін 1); 21 – Дослід №17 (термін 2); 22 – Дослід №19 (термін 1); 23 – Дослід №19 (термін 2); 24 – зразок сироватки до зв'язування із протеїн G сефарозою, Контроль №3 (термін 1), 2 мкл. *Термін 1 – 11.08.2023 р., термін 2 – 07.11.2023 р.

Імуноглобуліни осаджували з відповідних сироваток шляхом їх висолювання у сульфаті амонію згідно методики [279]. Оскільки електрофорез проведено за денатуруючих умов, на електрофореграмах імуноглобуліни класу IgG, отримані із

сироватки крові щурів, представлені у вигляді важких (50 кДа) та легких ланцюгів IgG (25 кДа). Різницю між білковими зразками на електрофореграмі візуально не спостерігали (Рис.3.2 та 3.3).

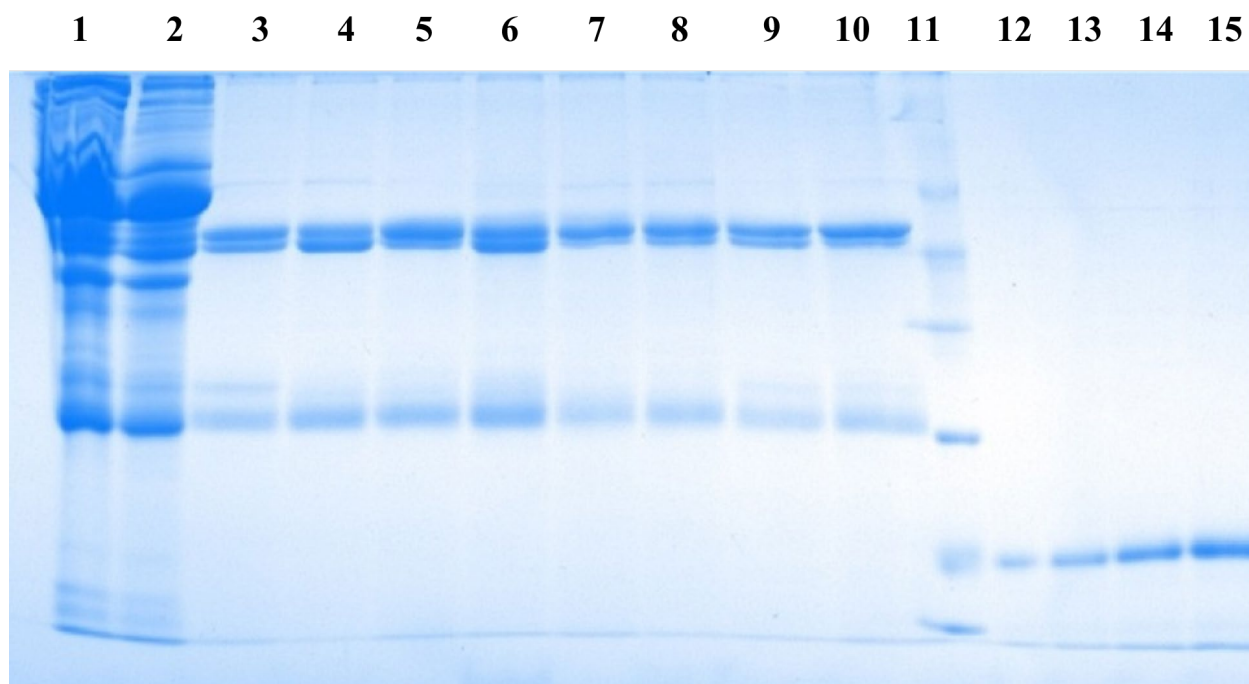


Рисунок 3.3 – Електрофореграма розділення білків у 12 % ДСН-ПААГ, IgG з сироваток крові щурів, отриманих після їх очищення на протеїн G Sepharose

Умовні позначення до рис. 3.3: 1 – зразок сироватки до зв'язування із протеїн G Sepharose, Контроль №1 (термін 1), 2 мкл; 2 – зразок сироватки до зв'язування із протеїн G Sepharose, Контроль №1 (термін 2), 2 мкл; 3 – Інтакт №1 (термін 1); 4 – Інтакт №1 (термін 2); 5 – Контроль №9 (термін 1); 6 – Контроль №9 (термін 2); 7 – Дослід №14 (термін 1); 8 – Дослід №14 (термін 2); 9 – Дослід №23 (термін 1); 10 – Дослід №23 (термін 2); 11 – білкові маркери (№26610, Thermo Sci.); 12, 13, 14 та 15 – маркер концентрації IFNa2b 0.25, 0.5, 1 та 2 мкг, відповідно. *Термін 1 – 11.08.2023 р., термін 2 – 07.11.2023 р.

Надалі нами проведено оцінювання в отриманих зразках концентрації IgG. Визначення концентрації IgG проводили набором Pierce™ BCA Protein Assay Kit (№ 23225, Thermo Scientific). Результати вимірювань концентрації IgG у зразках наведено у таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Концентрація IgG у зразках сироватки крові щурів,
визначена за допомогою набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit

№ підослідної тварини (сироватка)	Концентрація, мг/мл (I термін)	Концентрація, мг/мл (II термін)
<i>Інтактна група</i>		
<i>1</i>	0,95	0,95
<i>2</i>	0,97	0,94
<i>3</i>	0,94	0,92
<i>Контрольна група</i>		
<i>9</i>	0,95	1,02
<i>10</i>	0,91	0,94
<i>11</i>	0,95	0,95
<i>Дослідна група</i>		
<i>13</i>	0,95	0,89
<i>14</i>	0,8	0,86
<i>15</i>	1,1	0,9
<i>16</i>	0,85	0,91
<i>17</i>	0,89	0,87
<i>19</i>	0,6	0,88
<i>23</i>	0,9	0,91

Для аналізу взаємодії очищених з сироваток крові щурів IgG з нікелем, використовували Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva, США) та власну модифікацію імуноферментного аналізу [281].

Наша ідея полягала у тому, щоб оцінити та порівняти потенційне зв'язування IgG з нікелем у дослідних групах. Результати проведеного імуноферментного аналізу представлені на рис. 3.4.

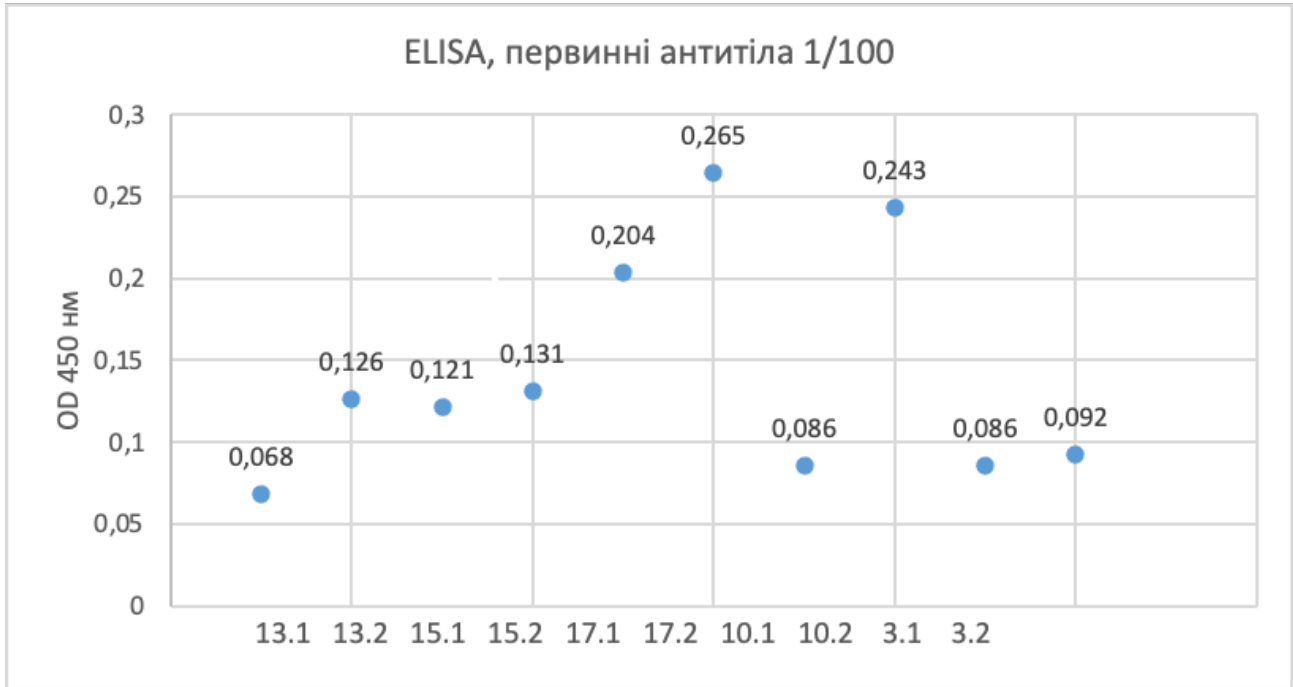


Рисунок 3.4 – Результати імуноферментного аналізу під час оцінки взаємодії очищених з сироваток крові щурів IgG з нікелем на Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva, США).

Умовні позначення до рис. 3.4: тварини №1-6 – інтактна група, №7-12 – контрольна група, №13-28 – дослідна група; № 1 – перший термін та № 2 – другий термін.

Згідно представлених даних на (Рис. 3.4), інтактні IgG (№ 3.1 та 3.2) при розведенні у 100 разів, практично не зв'язувалися із нікелем та значення оптичного поглинання при 450 нм були на рівні негативного контролю (blank) – 0,83, у випадку якого на сорбент наносили анти-щурячі імуноглобуліни кон'югованих з ферментом-міткою (пероксидазою хрому) у розведенні 1 : 50000 (Sigma-Aldrich, США).

У контрольних зразках, після імплантації нікелевих пластин спостерігали появу позитивних подій, зв'язування IgG із нікелем (№ 10.2). Значення оптичного поглинання при 450 нм були на рівні 0,243.

У той же час, у сенсibilізованих нікелем тварин (№13, 15 та 17) значення оптичного поглинання заходилися у межах 0,151-0,348. Проте, достовірної відмінності між різними термінами забору сироватки не спостерігали.

Це свідчить про неспецифічне зв'язування IgG із нікелем та сорбентом, що потребує подальшої оптимізації методів оцінки отриманих імуноглобулінів.

3.1.2 Висновки дослідження

1. Розроблена модифікована модель сенсibilізації піддослідних тварин (щурів) на Ni.

2. Встановлено нечутливість вушної проби на Ni в експериментальних моделях на тваринах для оцінки реакції на Ni.

3. Встановлено відсутність достовірної різниці показників при дослідженні із використанням протокової цитофлуориметрії для визначення концентрації IFN- γ , IL-4, TNF- α в сироватці крові щурів за умов нікель-асоційованої сенсibilізації.

4. Виявлено зростання рівня MCP-1 у дослідних тварин при дослідженні із використанням протокової цитофлуориметрії для визначення концентрації MCP-1 в сироватці крові щурів за умов нікель-асоційованої сенсibilізації. Встановлено, що таргетування MCP-1 може бути потенційною терапевтичною стратегією для визначення реакції гіперчутливості на Ni.

5. Відсутня достовірна відмінність між різними термінами забору сироватки при проведенні імуноферментного аналізу IgG в контрольній групі та дослідній групі, що свідчить про неспецифічне зв'язування IgG із нікелем та сорбентом, що в подальшому потребує в подальшому оптимізації методів оцінки отриманих імуноглобулінів.

6. Визначено наявність специфічних до Ni антитіл в сироватці крові щурів через 4 місяців після сенсibilізації сульфатом нікелю та імплантацією нікелевих імплантів.

3.2 Проведення гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження тканин. Дослідження імплантатів з використанням методів скануючої електронної мікроскопії, атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії.

Через 5 місяців після імплантації в умовах віварію Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України тварин (щурів) виводили з експерименту шляхом введення летальної дози тіопенталу натрію (в/о 150-200 мг/кг) (ПАТ «Київмедпрепарат»).

Після видалення інкапсульованих імплантів для гістологічного дослідження, зразки капсул фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Гістологічні, морфометричні та імуногістохімічні дослідження отриманих зразків була проведено на кафедрі гістології та ембріології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Імпланти вилучені з капсули віддавали в Інституті хімії поверхні імені О.О. Чуйка НАН України на подальші дослідження стану поверхні за допомогою методу електронної мікроскопії (СЕМ), з використанням скануючого мікроскопу.

Дослідження зразків імплантів методом стаціонарної краплі та методом атомно-силової мікроскопії з отриманими з сироватки піддослідних тварин IgG було проведено в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України.

3.2.1 Результати дослідження

Гістологічне та морфометричне дослідження

При проведенні гістологічної характеристики капсули навколо імпланту, на мікроскопічному рівні виявлено значну варіабельність гістологічної картини стінки капсули, яка утворилась навколо імплантатів.

Основними морфологічними рисами цих тканин були: утворена волокниста сполучна тканина з чисельними колагеновими волокнами, ангиогенез, інфільтрація макрофагів і нейтрофілів.

Тактика гістологічних досліджень полягала у наступним етапах:

- 1) гістохімічне виявлення колагену у сполучнотканинній капсулі навколо імпланту і встановлення його питомого вмісту у капсулі;
- 2) оцінка товщини капсули морфометричним методом;
- 3) гістохімічне виявлення глікозаміногліканів та протеогліканів у стінці капсули, як показників розвитку сполучної тканини, позаклітинного матриксу;
- 4) імуногістохімічне виявлення віментину (vimentin) як компоненту проміжних філаментів у клітинах тканини, яка розвивається навколо імпланту.

Для аналізу гістологічного матеріалу, в який не імплантували метал, було досліджено зразки інтактних тварин (рис. 3.5).

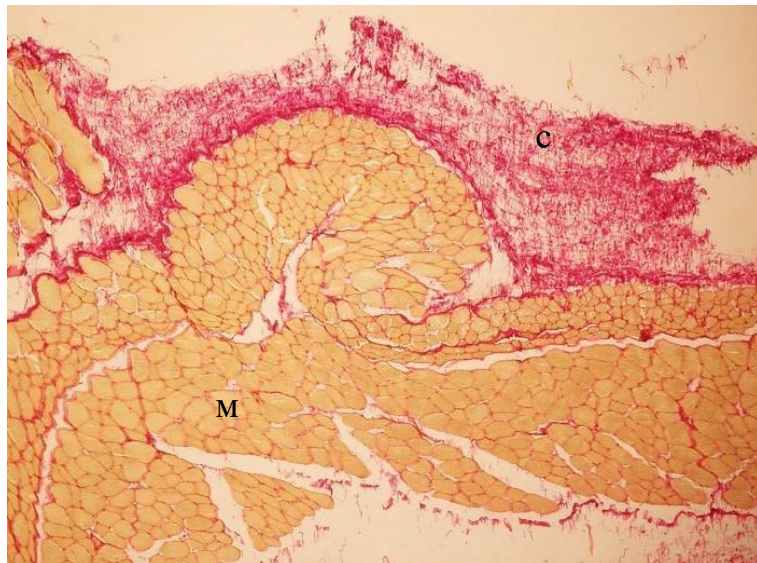


Рисунок 3.5 – Скелетна м'язова тканина інтактних щурів.

Ділянку, в яку не імплантували метал.

Примітка: м – м'язові волокна; с – сполучна тканина фасції. Забарвлення сіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

Імплант підшивали субфасціально. М'язова тканина представлена щільно орієнтованими м'язовими волокнами, а м'яз покритий волокнистою сполучною

тканиною, яка формувала фасцію. За результатами морфометрії середня товщина цієї фасції $122,7 \pm 9,7$ мкм.

Дослідження зразків тканин, які були виділені навколо імплантів показали розвиток сполучної тканини, яка формувала щільну капсулу навколо металу (рис. 3.6).

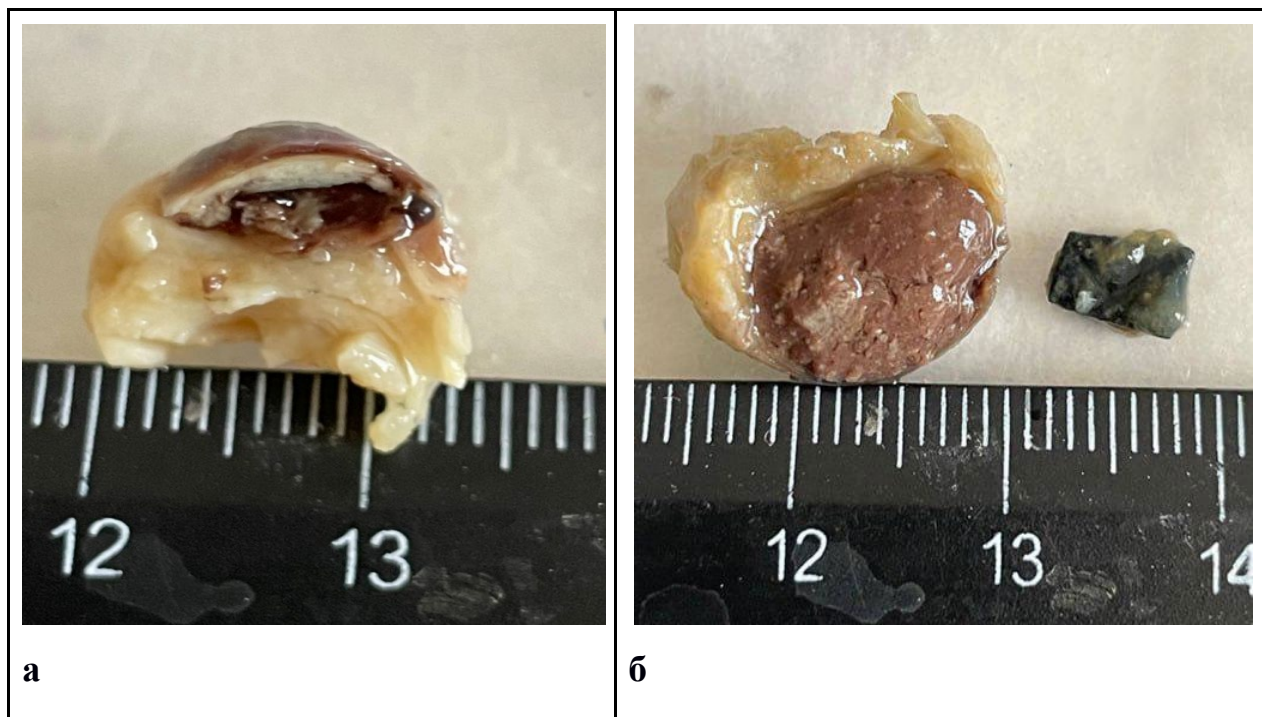


Рисунок 3.6 – Реакція запалення на імплант. Макропрепарат.

У дослідній групі - (б) більший запальний інфільтрат ніж у контрольній групі (а).

Макроскопічно навколо імпланту сформувалась щільна капсула, при розрізі виявлено порожнину, що містила інфільтрат від світло коричневого до бурого кольору. Досліджені зразки характеризувались значною варіабельністю розмірів утвореної капсули. Проведено лінійні розрахунки малого і великого діаметру утвореної капсули, просвіту капсули і визначено співвідношення (індекс) між ними щодо кожного зразка (табл. 3.5).

За результатами вимірювання середнього діаметру (напівдіаметр, де $(d1+d2)/2$) різниці між контрольною та дослідною групою не виявлено, індекс діаметрів також не мав статистично значущої різниці. Ці результати свідчать про

те, що навколо імплантів двох груп закономірності розвитку сполучнотканинної капсули мали подібний характер.

Таблиця 3.5

Індекс зовнішнього та внутрішнього діаметру сполучнотканинної капсули у зразках контрольної та дослідної групи

Група	Зовнішній діаметр	Внутрішній діаметр	Індекс діаметрів
Контрольна група	10,6±1,5	6,9±1,2	1,58±0,1
Дослідна група	10,6±0,8	7,03±0,8	1,54±0,1
p, критерій Манна-Уїтні	0,48	0,48	0,50

При гістологічному дослідженні стінки капсул у контрольній групі було виявлено сполучнотканинну оболонку, яка характеризувалась розвитком волокнистої сполучної тканини, ангиогенезом і ознаками запальної реакції.

Остання полягала у інфільтрації моноцитів/макрофагів, нейтрофілів і рідко зустрічаються гігантські клітини чужорідних тіл (велика за об'ємом цитоплазми клітини з 1-3 ядрами). Стінка капсули мала певну полярність: з зовнішньої сторони спостерігались новоутворена сполучна тканина і м'язові волокна з ознаками атрофії (деформація, менша товщина волокна), з внутрішньої сторони різноспрямовані тяжі колагену, новоутворені кровоносні мікросудини і значна кількість клітини, пов'язаних із запальною реакцією – макрофаги, нейтрофіли.

У контрольній групі у рівній мірі було ідентифіковано два домінуючих гістологічних варіантів тканинних реакцій на імплант:

- а) інкапсуляція імпланту з помірною інфільтрацією макрофагів (n=3),
- б) інкапсуляція з інтенсивною змішаною інфільтрацією макрофагів та нейтрофілів і появою осередній колагеногенезу у інфільтраті (n=3).

В першому варіанті імплант був інкапсульованим, стінка капсули представлена волокнистою тканиною з колагеновими тяжами по контуру імпланта (рис. 3.7).

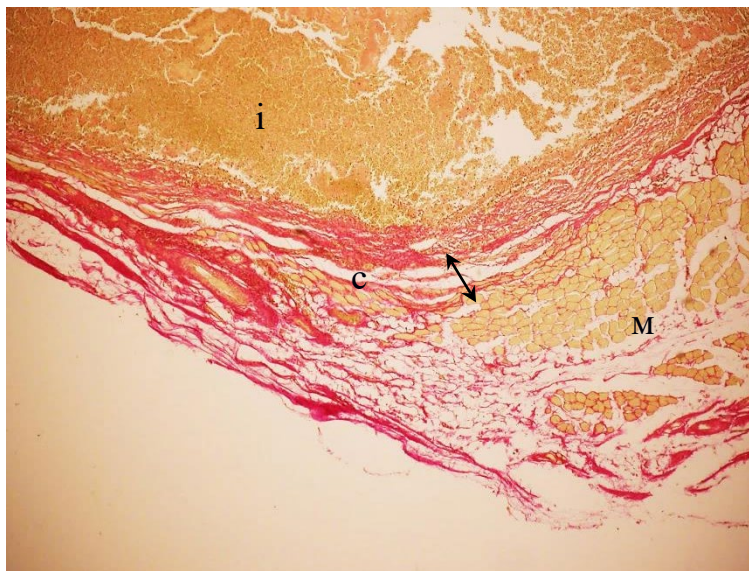


Рисунок 3.7 – Стінка капсули навколо імпланта у контрольній групі.

*Примітка: м – м'язові волокна; с – сполучнотканинна капсула (↕); і – інфільтрат. Забарвлення сіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

Відносно тонка капсула, ззовні частково збережена м'язова тканина, у просвіті інфільтрат

У другому варіанті товщина капсули була істотно більшою, реєстрували крововиливи (геморагічне просочення ділянок капсули), більшу щільність клітин і вже в самому запальному інфільтраті виникали осередки колагеногенезу, які структурно не пов'язані з волокнистою стінкою капсули (рис. 3.8). У інфільтраті виявлено як нейтрофіли, так і клітини моноцитарного ряду, але домінуючими були еритроцити. Скупчення фібрину також були підтверджені у інфільтраті. На основі зазначених морфологічних ознак капсули навколо імпланту зроблено заключення, що реакція тканин на імплант з нікелю полягає у його інкапсуляції з розвитком запальної інфільтрації, супутнім геморагічним просоченням капсули (рис. 3.9). Очевидно імплант у створеній капсулі не має безпосереднього контакту з стінкою капсули, і є відмежованим інфільтратом.

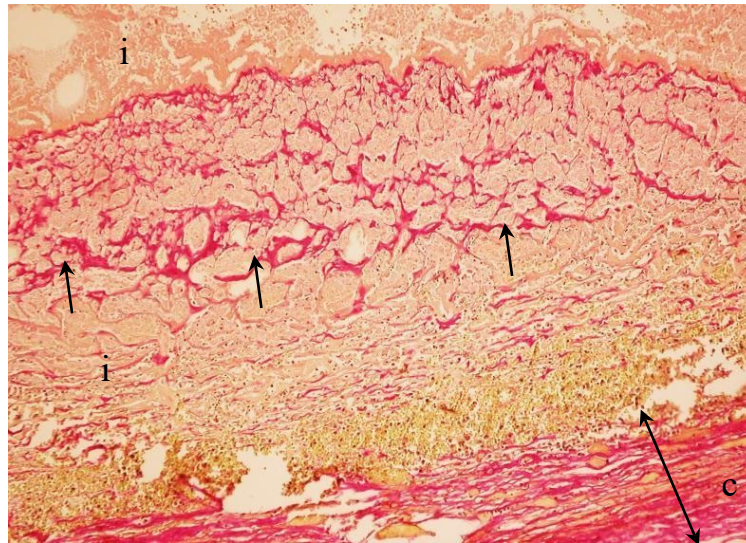


Рисунок 3.8 – Стінка капсули навколо імпланта у контрольній групі.

*Примітка: с – сполучнотканинна капсула (↕); і – інфільтрат; ← колаген у інфільтраті. Забарвлення сіріус червоний. Об. 10, ок. 10.

З внутрішньої сторони капсули сіткоподібні структури з колагену. Значний клітинний інфільтрат, у капсулі гемосидерин.

В просвіті капсули виявлено також клітинний детрит. Поодинокі клітини в осередках колагеногенезу гіпотетично є продуцентами цього протеїну у порожнині капсули.

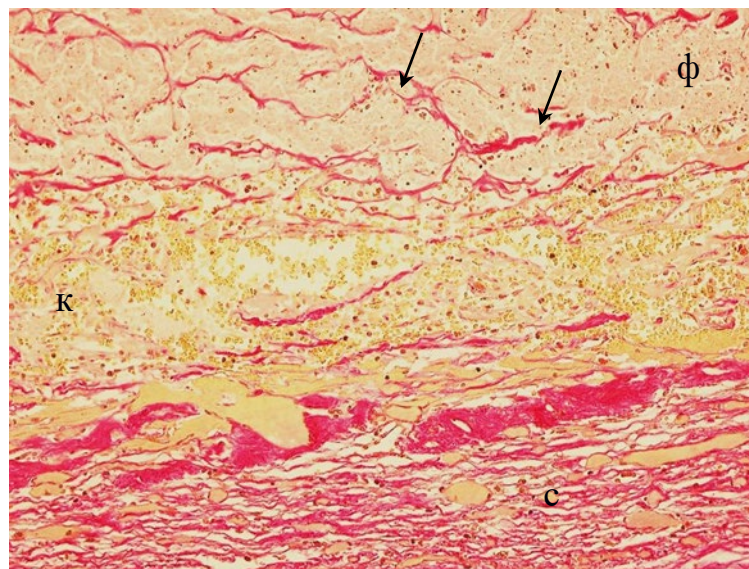


Рисунок 3.9 – Внутрішня поверхня капсули навколо імпланта у контрольній групі.

*Примітка: ф – фібрин; г – кров; с – сполучнотканинна капсула (↕); ← колаген у інфільтраті. Забарвлення сіріус червоний. Об. 20, ок. 10. Фібриновий згусток з осередками колагену розділений від стінки капсули крововиливом.

Проведено морфометричне дослідження стінки капсули, які показали достовірно більшу товщину новоутвореної капсули порівняно з фасцією м'язів у місці імплантації (рис. 3.10). Формування такого утворення не викликало сумнівів і було передбачуваним, але факт появи клітинного інфільтрату у порожнині капсули, вказують на необхідність більш глибокого дослідження проблеми клітинних реакцій на ортопедичні імпланти, які у складі сплаву містять нікель.

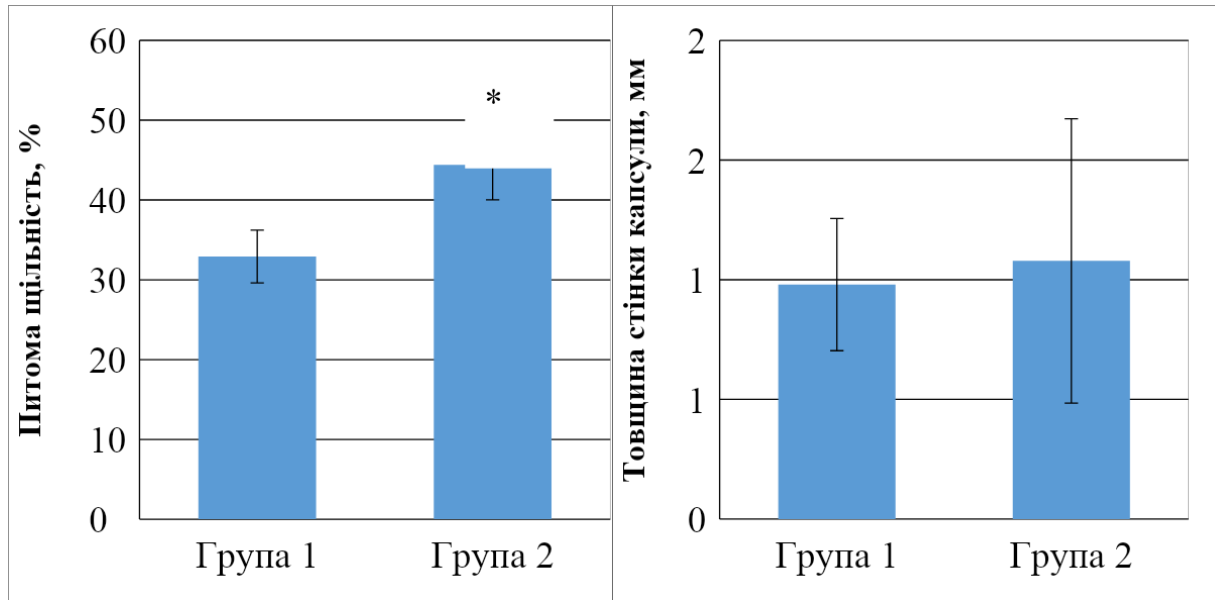


Рисунок 3.10 – Результати морфометрії стінки сполучнотканинної капсули.

Достовірно збільшення питомої щільності колагену у дослідній групі. * $p < 0,05$

У дослідній групі морфологічні особливості розвитку сполучнотканинної капсули навколо імпланту були подібними до контрольної групи, але виявлено деякі відмінні особливості (рис. 3.11). Як і у контрольній групі, у просвіті (порожнині) капсули виявлено значний за об'ємом клітинний інфільтрат, з геморагічним просоченням і клітинним детритом. Додатково до цього встановлено вогнищеві або множинні скупчення гемосидерину та макрофаги у стінці капсули. Макрофаги активно фагоцитували цей продукт окиснення (гранули гемосидерину виявлено у цитоплазмі макрофагів).

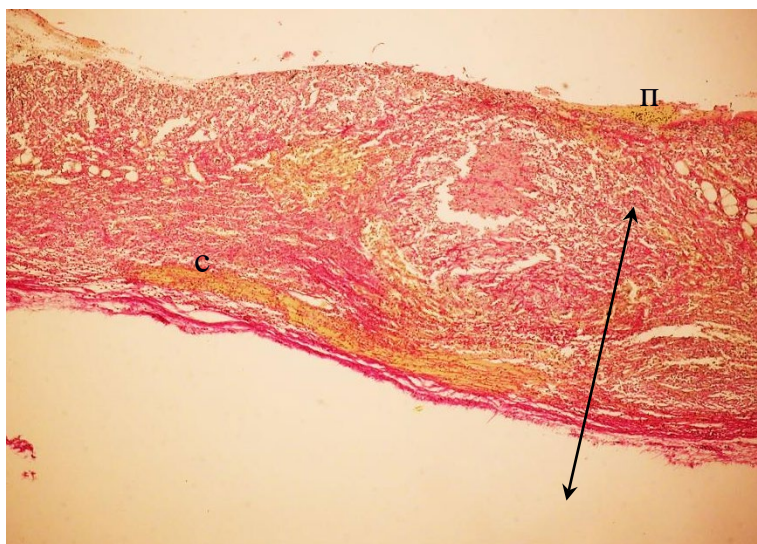


Рисунок 3.11 – Стінка капсули навколо імпланта у дослідній групі.

*Примітка: п – порожнина капсули; с – сполучнотканинна капсула (↕). Забарвлення сіріус червоний. Об. 20, ок. 10. Істотно більша товщина порівняно з контрольною групою, більша щільність колагенових волокон у стінці капсули.

Їх скупчення були дифузними, характеризувались деякою неоднорідністю, але переконливих ознак щодо специфічної локалізації у стінці капсули не виявлено. Лише відмічена тенденцію щодо більшої щільності гемосидерину у зовнішній шарах капсули (рис. 3.12).

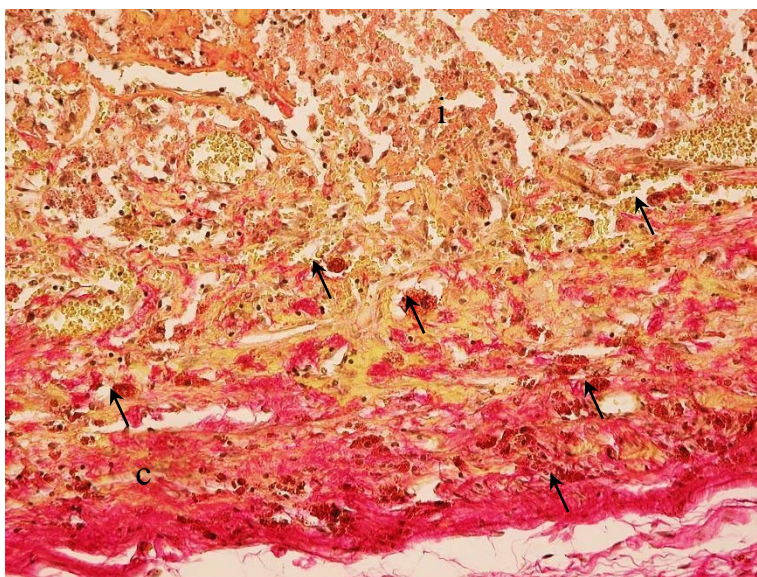


Рисунок 3.12 – Гемосидерин у стінці капсули навколо імпланта у дослідній групі

*Примітка: і – клітинний інфільтрат; с – сполучнотканинна капсула; ← гемосидерин. Забарвлення сіріус червоний. Об. 40, ок. 10. Множинні гранули гемосидерину

Це було відмінною гістологічною ознакою дослідної групи від контрольної. Також відмічена тенденцію збільшення інтенсивності інфільтрації великих макрофагів та фагоцитозу гемосидерину, рідше гігантські клітини чужорідних тіл (рис. 3.13).

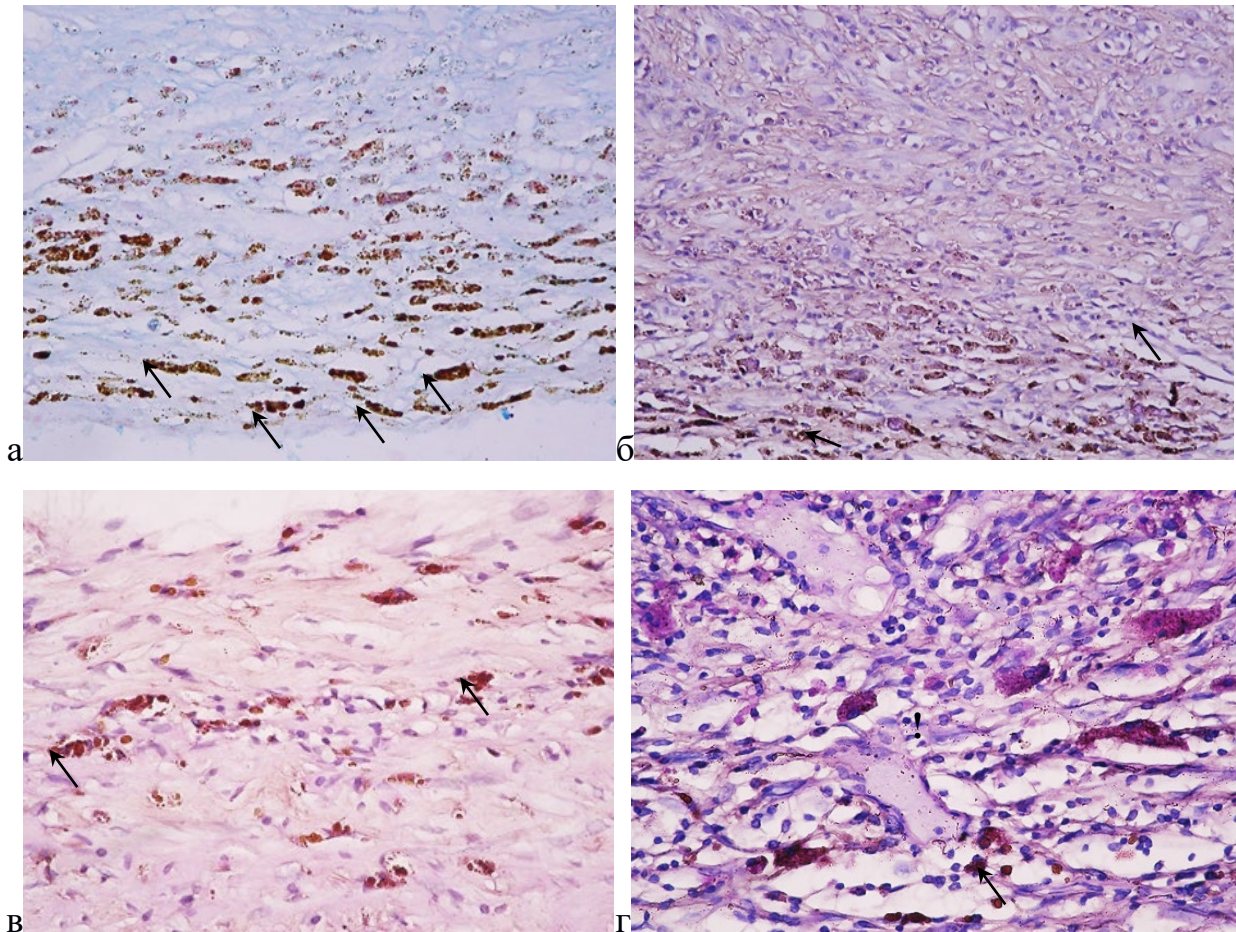


Рисунок 3.13 – Множинні скупчення гемосидерину у стінці капсули дослідної групи та їх елімінація макрофагами фагоцитозом

*Примітка: ← гемосидерин; ! - гігантські клітини чужорідних тіл. Забарвлення: а, б – альціановий синій (рН 2,5), об. 20, ок. 10; в, г – ШИК-реакція, об. 40, ок. 10

Цитоплазма таких клітин містила значну кількість гранул гемосидерину та ШИК-позитивних гранул. Останнє є цитологічною ознакою фагоцитозу глікопротеїнів з інтерстиційного простору тканини. Це гетерогенні скупчення

протеїнів, як результат некрозу клітин, так і структурних білків позаклітинного матриксу.

Іншою гістохімічною реакцією було досліджено розподіл кислих глікозаміногліканів. Ці сполуки є складовою позаклітинної речовини сполучної тканини, а їх додаткова поява пов'язана з процесами активної регенерації тканин.

Ми не виявили залежності між розподілом кислих глікозаміногліканів та ШИК-позитивних глікопротеїнів у стінці капсули і скупченнями гемосидерину (рис.3.14).

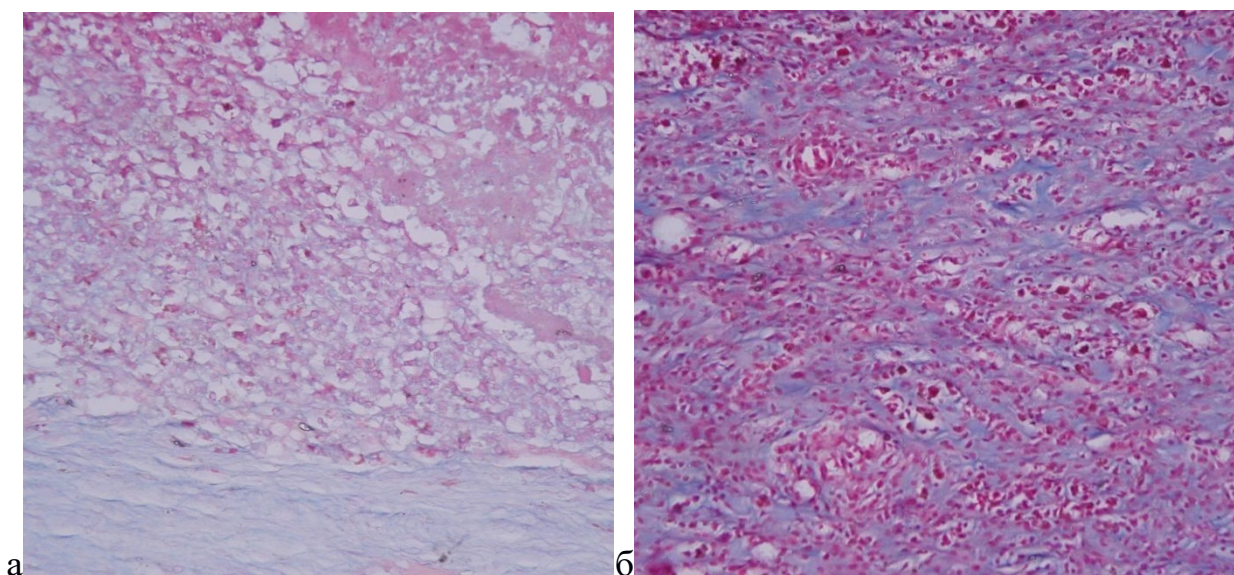


Рисунок 3.14 – Збільшена щільність клітин та інтенсивність ШИК-реакції у дослідній групі: а – контрольна група, б – дослідна група (забарвлення: ШИК-реакція. Об. 42, ок. 10)

Хоча інтенсивність гістохімічної реакції до глюкозаміногліканів зростала у напрямку від просвіту рубця до зовнішніх шарів. Це пояснюється розвитком більш зрілої сполучної тканини саме по контуру рубця, тоді як на межі з запальним інфільтратом виявлення глікозаміногліканів було складнішим.

ШИК-реакція дозволила з більшою ймовірністю та ефективністю виявити активний фагоцитоз макрофагами та гігантськими клітинами чужорідних тіл.

Останні характеризувались значно більшим розміром (у 5-6 разів) порівняно до інших (малих) макрофагів, а в їх цитоплазмі наявні лізосоми великого об'єму. Глікопротеїни, які позитивно забарвлюються в результаті ШИК-реакції, виявлялись безпосередньо у запальному інфільтраті (рис. 3.15).

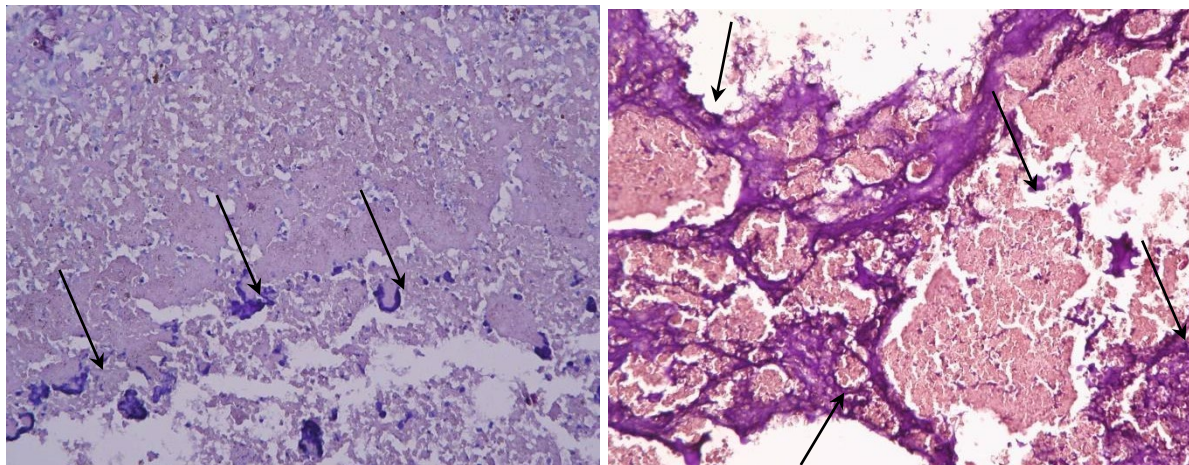


Рисунок 3.15 – ШИК-позитивні продукти реакції у клітинному інфільтраті у дослідній групі

*Примітка: ← скупчення глікопротеїнів, фібрину (забарвлення: ШИК-реакція. Об. 42, ок. 10)

Порівняння зразків контрольної та дослідної групи показало тенденцію до збільшення утворення кислих глікопротеїнів сполучною тканиною у другій групі. Якщо у контрольній групі питома щільність позитивної реакції була невираженою, то у дослідній групі картина була іншою.

Не тільки у капсулі, але і в запальному інфільтраті реєструвались скупчення кислих глікопротеїнів. Це може бути проявом більш інтенсивного запалення і, як наслідок, в регенерацію залучена більша кількість сполучної тканини і її кількість.

Було проведено морфометричне дослідження стінки капсули дослідної групи та порівняно результати з контрольною групою. Як видно з мікрофотографії, які були одержані із зразків дослідної групи, товщина капсули та щільність колагену зростала (рис.3.16 і 3.17).

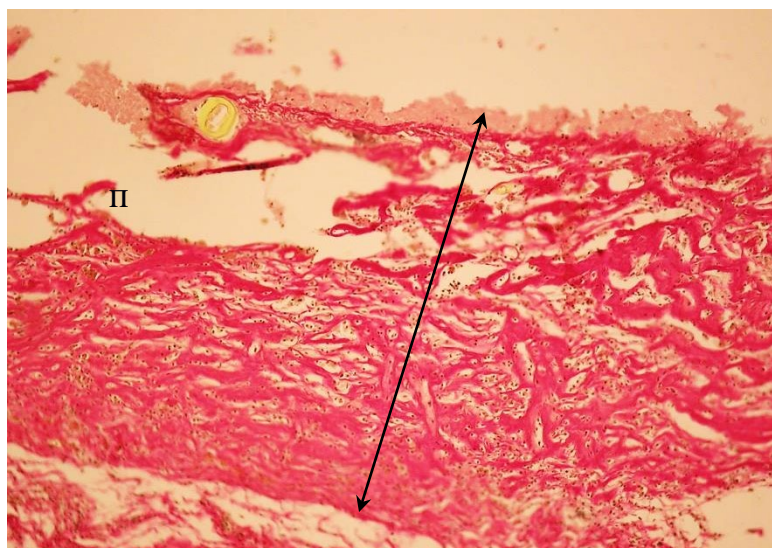


Рисунок 3.16 – Стінка капсули навколо імпланта у дослідній групі

*Примітка: п – порожнина капсули; с – сполучнотканинна капсула (↕). (зabarвлення сіріус червоний) Об. 20, ок. 10. Щільна сітка колагенових волокон у стінці капсули

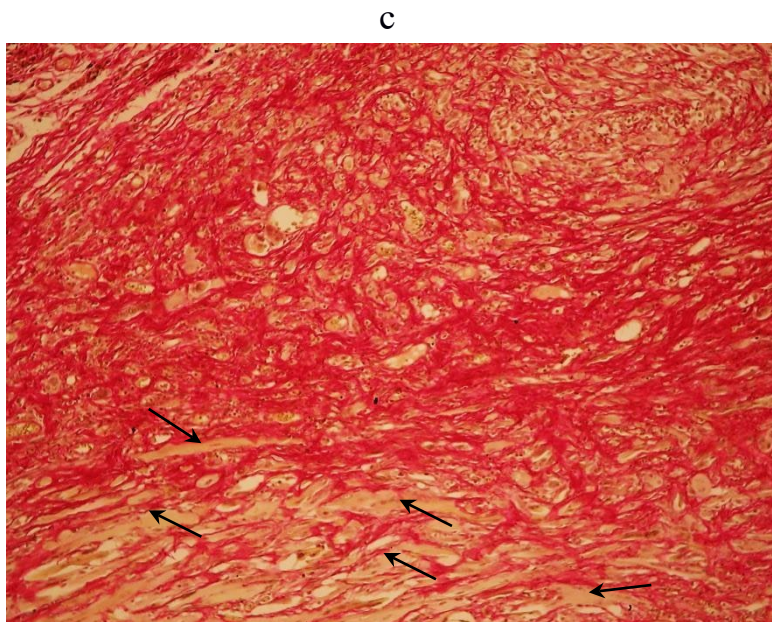


Рисунок 3.17 – Волокниста сполучна тканина у ділянці атрофії м'язової тканини

*Примітка: с – сполучнотканинна капсула; ← м'язове волокно. (зabarвлення сіріус червоний) Об. 20, ок. 10. Заміщення атрофованих м'язових волокон фіброзною тканиною

Однак, слід враховувати, що об'єм сформованої капсули був досить варіабельний у межах обох груп. Це позначилось на результатах морфометрії.

Так, ми не виявили статистично значущої різниці між товщиною капсули навколо імплантів у контрольній групі та дослідній групі ($p=0,71$, при $d1=65,5$ vs. $d2=172,6$), але у дослідній групі питома щільність колагенових волокон була достовірно більшою на 34,8% ($p<0,05$, при $d1=45,7$ vs. $d2=318,7$) (рис. 3.10).

Дисперсія значень цих двох показників також була більшою у дослідній групі, що показало деяку відмінну характеристику розвитку тканинних реакцій. Залежності між товщиною капсули та питомою щільністю колагену у капсулі ($Rho=0,42$, $p=0,14$) не виявлено.

Імуногістохімічне дослідження

Наступним етапом у дослідженнях розвитку сполучнотканинної капсули навколо імпланта було імуногістохімічне виявлення віментину (Vimentin).

Віментин є внутрішньоклітинний білком, який експресується різними клітинами сполучної тканини: фібробласти, ендотеліальні клітини, макрофаги, шванівські клітини та лімфоцити [314]. Його експресія позитивно корелює з розвитком тканин у онтогенезі, регенерації тканин.

Ми розглянули гіпотезу про те, що більший розвиток капсули навколо імпланту буде корелювати з рівнем експресії віментину у дослідній групі тварин.

За результатами імуногістохімічних досліджень встановлено наступні закономірності. Віментин експресується фібробластами у капсулі та іншими клітинами. Імунопозитивну реакцію у нашому дослідженні ми реєстрували у стінці кровоносних судинах, у веретеноподібних тяжках фібробластів. Щільність реакції зменшувалась на рівні внутрішньої стінки капсули (рис. 3.18).

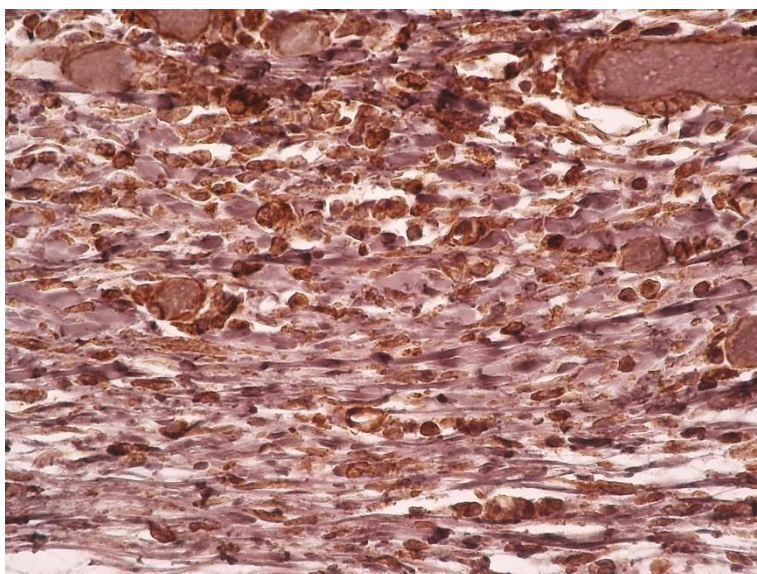


Рисунок 3.18 – Імуногістохімічне виявлення віментину у сполучнотканинній капсулі навколо металевого імпланту у контрольній групі

*Примітка: к – кровоносна судина. Імуногістохімічна реакція щодо віментину. Об. 40, ок. 10. Інтенсивна експресія віментину у стінці капсули, навколо кровоносної судини

У контрольній групі додатково виникали скупчення віментин-експресуючих клітин вже у просвіті порожнини, що вказує на атипову тканинну реакцію на нікель (Рис. 3.19).

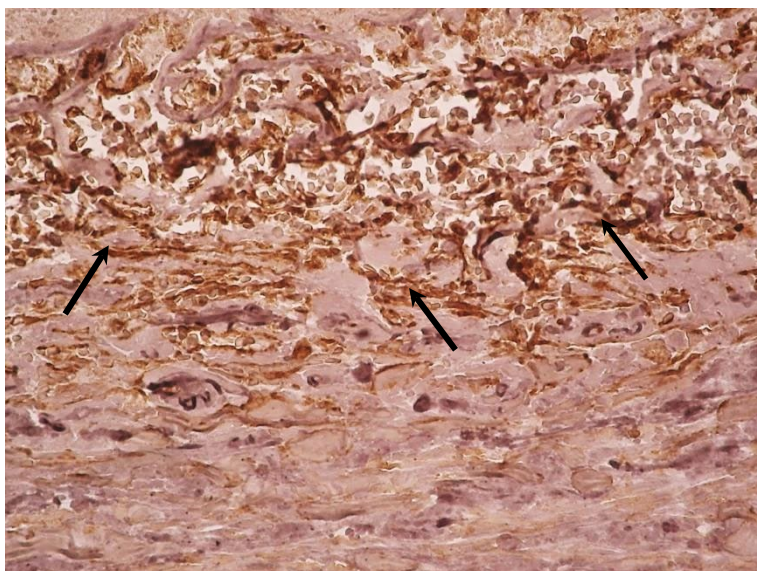


Рисунок 3.19 – Імуногістохімічне виявлення віментину на межі з капсулою імпланту у контрольній групі

*Примітка: ← позитивна реакція до віментину. Імуногістохімічна реакція щодо віментину. Об. 40, ок. 10

У дослідній групі питома щільність імунопозитивної реакції була більшою (Рис. 3.20), а по контуру капсули реєстрували поодинокі клітини, які дифузно мігрували до зони регенерації сполучної тканини у відповідь на появу чужорідного тіла (Рис. 3.21).

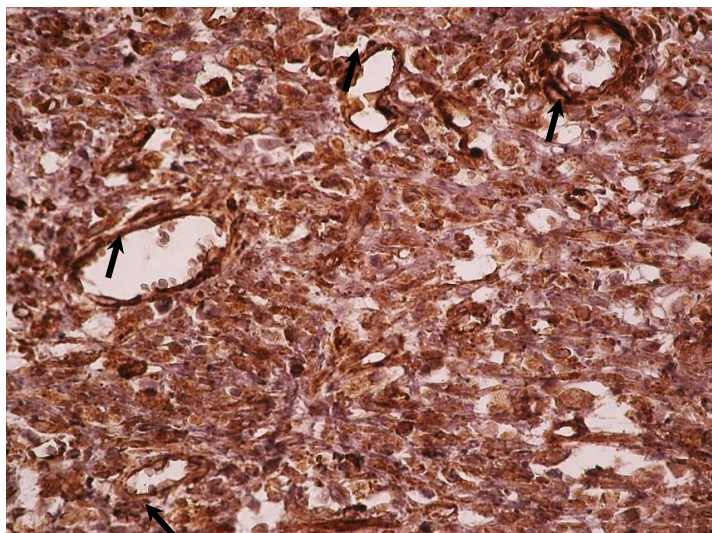


Рисунок 3.20 – Імуногістохімічне виявлення віментину у стінці капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← позитивна реакція до віментину. Імуногістохімічна реакція щодо віментину. Об. 40, ок. 10. Рясна імунопозитивна реакція.

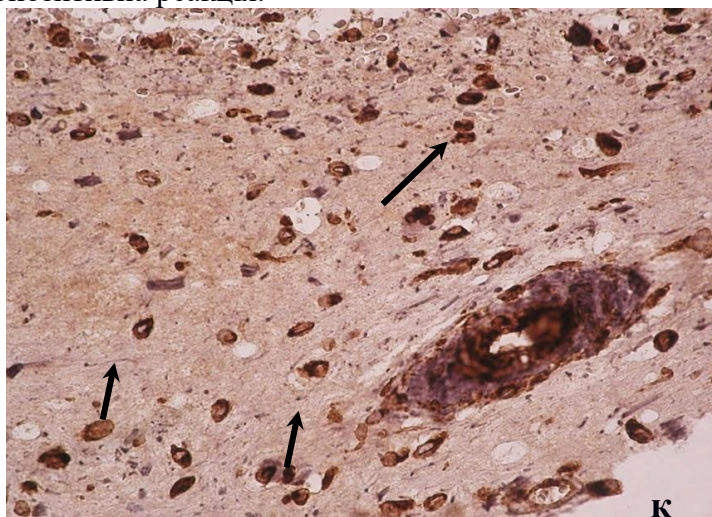


Рисунок 3.21 – Імуногістохімічне виявлення віментину по периметру капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← позитивна реакція до віментину. Імуногістохімічна реакція щодо віментину. Об. 40, ок. 10. Поодинокі клітини з імунопозитивною реакцією, кровоносна судина з позитивною реакцією у ендотелії

На рис. 3.22 наведено результати кількісної оцінки імуногістохімічної реакції до віментину. Результати показали тенденцію до збільшення кількості імунопозитивних сигналів (тобто клітин, показник питома щільність позитивної реакції) у дослідній групі за непараметричним критерієм Манна-Уїтні ($p=0,05$), а інтенсивність реакції в обох групах порівняння була на одному рівні ($p=0,44$). Цікаво відмітити, що віментин-позитивні клітини реєстрували не тільки у межах стінки капсули, але і у просвіті, серед клітин запального інфільтрату (рис. 3.23)

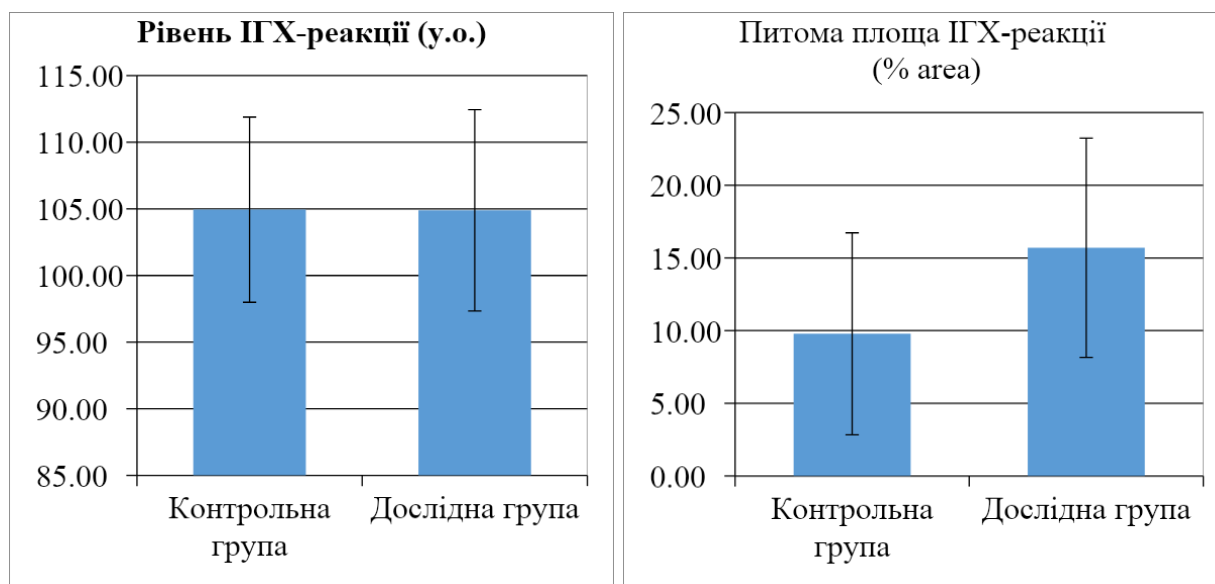


Рисунок 3.22 – Результати кількісної оцінки імунопозитивної реакції щодо віментину. Результати представлені як $M \pm m$

Наступним етапом дослідження стало вивчення імунофенотипової характеристики клітин, які мігрують до капсули і залучені до розвитку клітинних реакцій навколо імпланту.

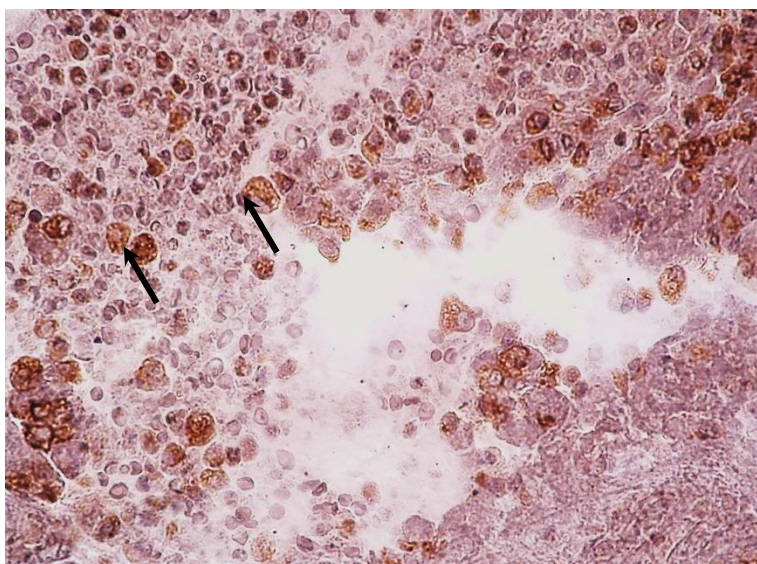


Рисунок 3.23 – Віментин-позитивні клітини у інфільтраті навколо імпланту у контрольній групі

*Примітка: ← позитивна реакція до віментину. Імуногістохімічна реакція щодо віментину. Об. 40, ок. 10. Серед лейкоцитів великі віментин-позитивні клітини

Досліджено активність міграції CD3 лімфоцитів до капсули (Рис. 3.24, 3.25). У стінці капсули було виявлено тільки поодинокі CD3+ лімфоцити, їх поява була відносно рідкою. CD3+ лімфоцити реєстрували як з внутрішнього боку стінки капсули, так і по її контуру. Зважаючи на низьке їх виявлення стверджувати про закономірності появи CD3+ лімфоцити у різних ділянках капсули складно. Проте відмічено певну тенденцію міграцію цього імунофенотипу клітин до внутрішніх шарів капсули і навіть поодинокі клітини реєстрували серед запального інфільтрату. Результати оцінки кількості CD3+ лімфоцити, які мігрували до капсули не показали значної відміни між двома групами порівняння. Серед клітин запального також реєстрували поодинокі CD3+ лімфоцити.

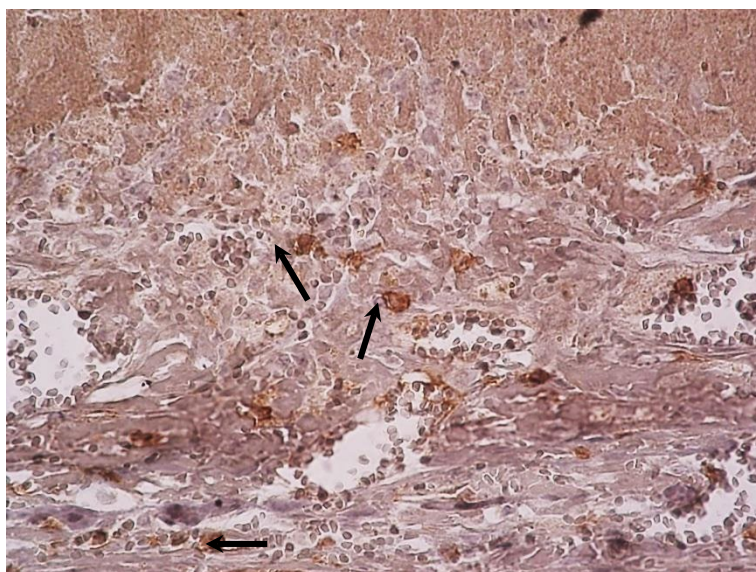


Рисунок 3.24 – CD3 лімфоцити на межі з запальним інфільтратом у стінці капсули навколо імпланту у контрольній групі

*Примітка: ← CD3+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD3. Об. 40, ок. 10

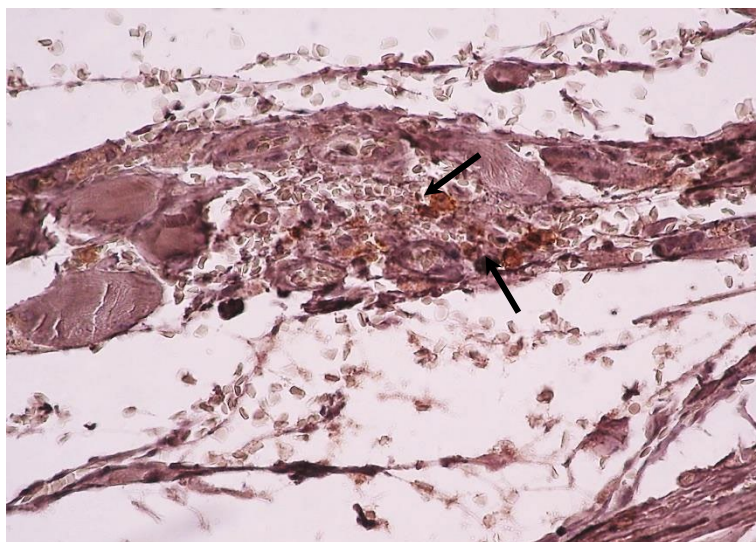
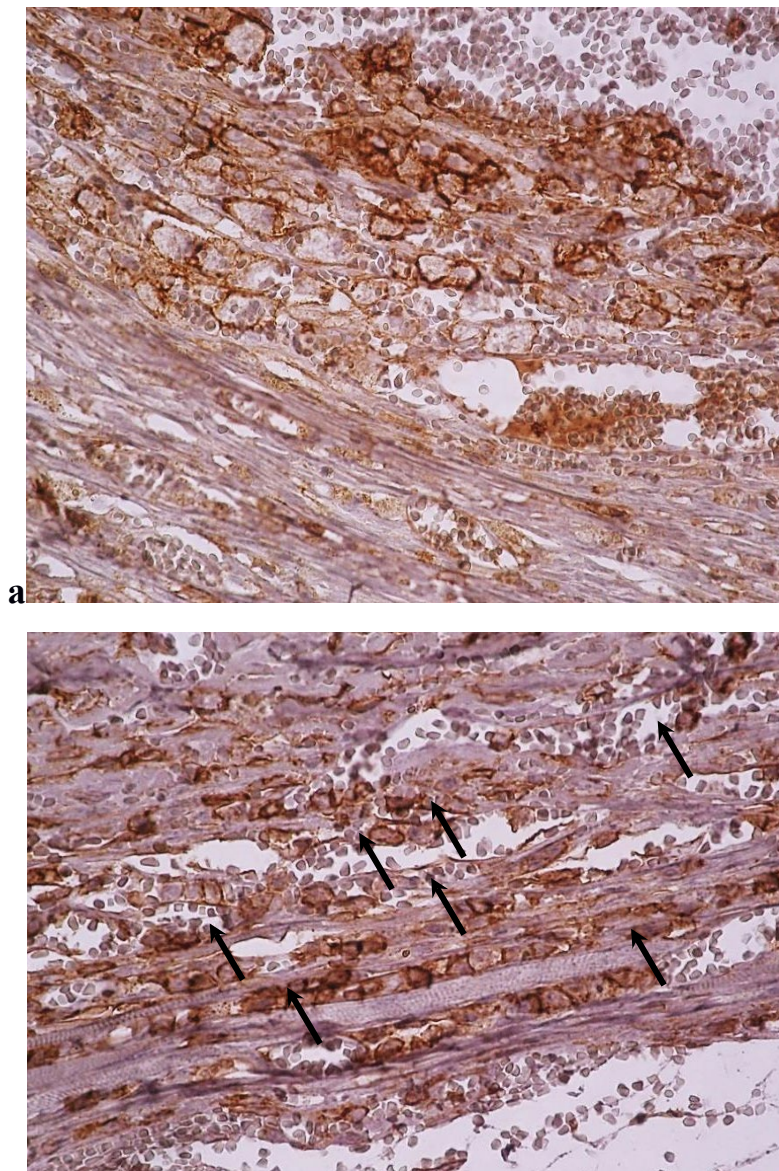


Рисунок 3.25 – CD3 лімфоцити на зовнішній стороні капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← CD3+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD3. Об. 40, ок. 10

Зовсім іншу морфологічну картину було виявлено при дослідженні клітин, які експресують CD44. CD44 є мембранним рецептором до гіалуронової кислоти тканинах і тому їх часто виявляють у пошкоджених тканинах, оскільки значна

кількість позаклітинного матриксу сполучної тканини є субстратом для фіксації та міграції CD44+клітин. CD44+клітини рясно мігрували до капсули навколо імпланту. Клітини з чіткою мембраною імунопозитивною реакцією до CD44 були виявлені на межі із запальним інфільтратом, поодинокі клітина та їх скупчення було ідентифіковано у запальному інфільтраті (рис. 3.26 та 3.27).



б

Рисунок 3.26 – CD44+ клітини на внутрішній (а) і зовнішній (б) стороні капсули навколо імпланту у контрольній групі

Примітка: ← CD44+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD44. Об. 40, ок. 10

CD44+клітини пронизували стінку капсули і мігрували між пошкодженими м'язовими волокнами, накопичувались у ділянках з ознаками атрофії м'язових волокон.

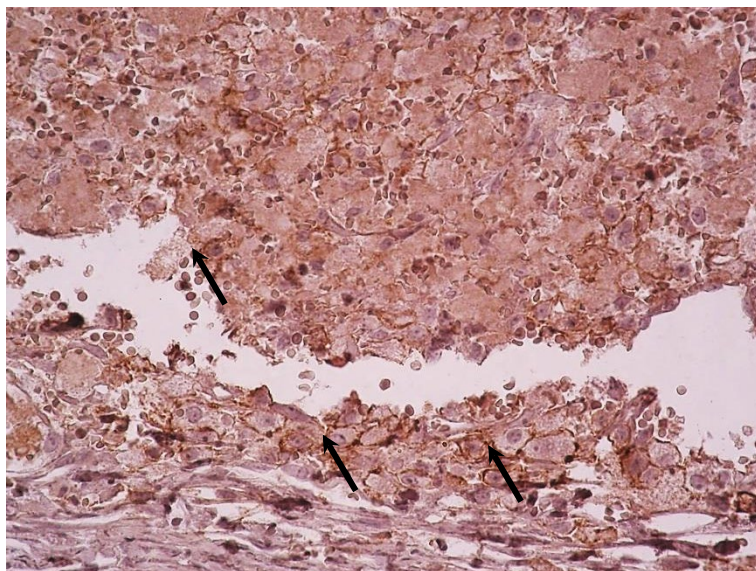


Рисунок 3.27 – CD44+ клітини на внутрішній стороні капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← CD44+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD44. Об. 40, ок. 10. Наявні CD44+ клітини у запальному клітинному інфільтраті у просвіті

Досліджено активність накопичення CD44+клітин у стінці капсули (рис. 3.28). Відмічено тенденцію до більш активної міграції CD44+ клітин у дослідній групі (за U-критерій Манна-Уїтні, $p=0,11$).

Це може свідчити про те, що більш інтенсивний процес розвитку капсули навколо імпланту асоційований з міграцією клітин, які пов'язані з запальною реакцією. Порівнюючи їх появу з CD3+ лімфоцитами відмічено наступну залежність: локалізація накопичення CD44+ клітин у капсулі не залежала від локалізації CD3+ лімфоцитів (тобто гіпотетично можна розглядати ймовірність появи у капсулі CD3+CD44- клітини та CD3-CD44+ клітини). CD44+ клітини є досить гетерогенною популяцією клітин і, навіть, деякі субпопуляції лімфоцитів експресують CD44 [315, 316].

З огляду на кількісне співвідношення клітин з виявленою імунопозитивною реакцією до CD3 та CD44, розглянуто гіпотезу про міграцію до капсули двох незалежних популяції клітин з прозапальним імунофенотипом.

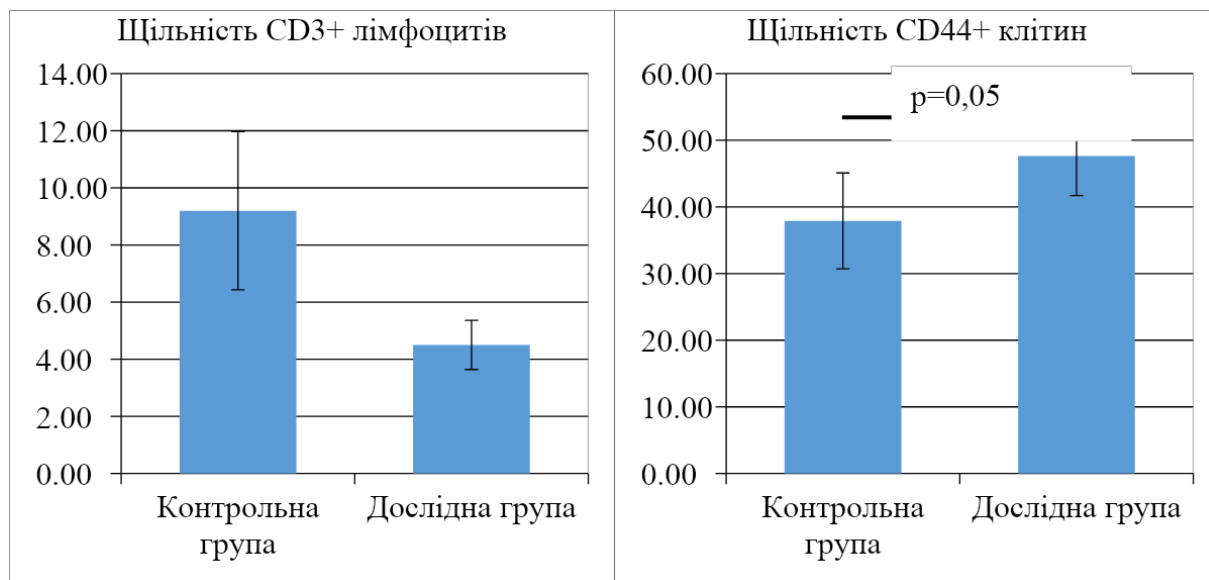


Рисунок 3.28 – Результати кількісної оцінки активності міграції CD3+ та CD44+ клітин до стінки капсули навколо імпланту. Результати представлені як $M \pm m$

Варто зазначити, що CD44+клітини були виявлені не тільки у межах стінки капсули, а також реєстрували серед запального клітинного інфільтрату у порожнині капсули (рис. 3.27 та 3.29).

CD44+клітини частіше виявляли як групові скупчення, особливо поблизу якихось тканинних елементів, наприклад біля поверхні внутрішньої стінки капсули. Також часто CD44+клітини були виявлені ззовні сполучнотканинної капсули, між м'язовими волокнами скелетної м'язової тканини, але домінуючим було їх накопичення з внутрішньої поверхні капсули, у її сполучнотканинних елементах, тобто по контуру імпланту.

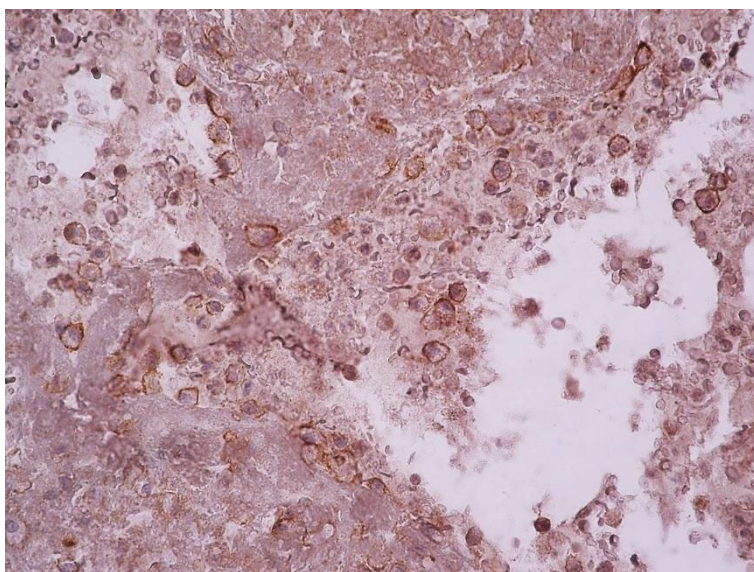


Рисунок 3.29 – CD44+ клітини серед запального клітинного інфільтрату та еритроцитарної маси у просвіті капсули у дослідній групі

*Примітка: ← CD44+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD44. Об. 40, ок. 10

Третьою популяцією клітин, які можуть брати активну участь у розвитку імунної реакції на імплант є CD68+ клітини, які походять з гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку і належать до системи моноцитів/макрофагів.

У контрольній групі CD68+ клітин реєстрували у межах стінки капсули: між м'язовими волокнами та сполучнотканинними елементами, навколо окремих кровоносних судин. Рідко виявляли цей тип клітин у запальному клітинному інфільтраті. По зовнішньому контуру капсули виявлено тільки поодинокі CD68+ клітини (рис.3.30).

У дослідній групі відмічено подібну морфологічну картину: CD68+ клітини головним чином були виявлені у волокнистій сполучній тканині капсулі, між м'язовими волокнами з ознаками атрофії (рис. 3.31).

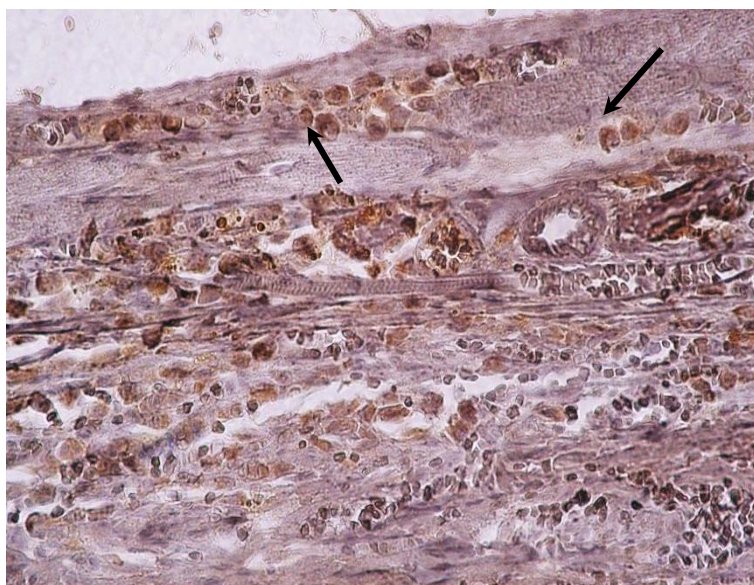


Рисунок 3.30 – CD68+ клітини у стінці капсули навколо імпланту у контрольній групі

*Примітка: ← CD68+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD68. Об. 40, ок. 10



Рисунок 3.31 – CD68+ клітини у стінці капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← CD68+ клітини. Імуногістохімічна реакція щодо CD68. Об. 40, ок. 10. Скупчення клітин на зовнішній стороні капсули.

Результати оцінки питомої щільності CD68+ клітин не показали переконливої (достовірної) різниці в активності їх накопичення у капсулах контрольної та

дослідної груп (Рис. 3.32). Міграція популяції клітин цього імунофенотипу було досить гетерогенною і значно меншою, ніж активність інфільтрації CD44+ клітин. Ці два типи клітин мали схожу локалізацію у стінці капсули.

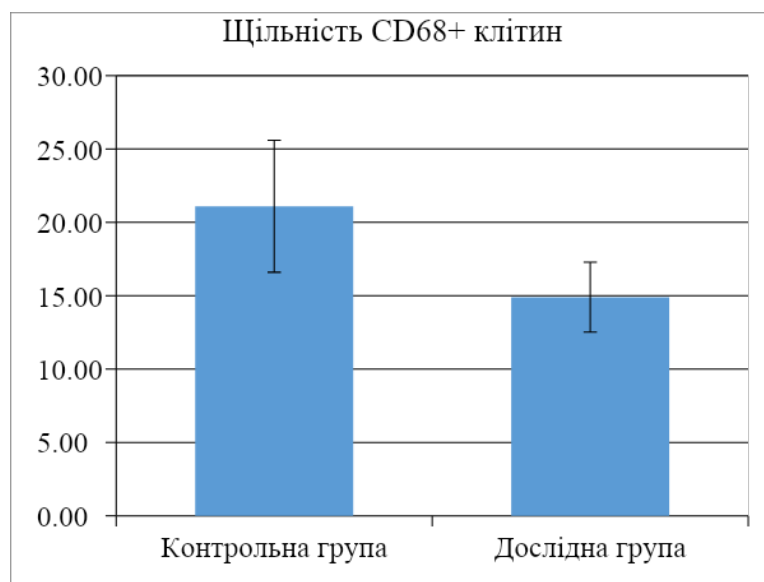


Рисунок 3.32 – Результати кількісної оцінки активності міграції CD68+ клітин до стінки капсули навколо імпланту. Результати представлені як $M \pm m$

Завершальним етапом морфологічного дослідження було вивчення клітинних реакцій у стінці капсули, які можуть пояснити процеси асоційовані із загибеллю клітин. В якості клітинних маркерів таких змін було обрано GRP78 та beclin1.

Перший пов'язаний з стресом ендоплазматичної сітки, а другий з аутофагією. Тобто на основі характеристики імуногістохімічного виявлення цих двох маркерів можна пояснити активність аутофагії, як одного з механізмів загибелі клітин. Як показали результати досліджень, клітин у стінці капсули мали інтенсивну цитоплазматичну імунореакцію до GRP78 (рис. 3.33 та 3.35).

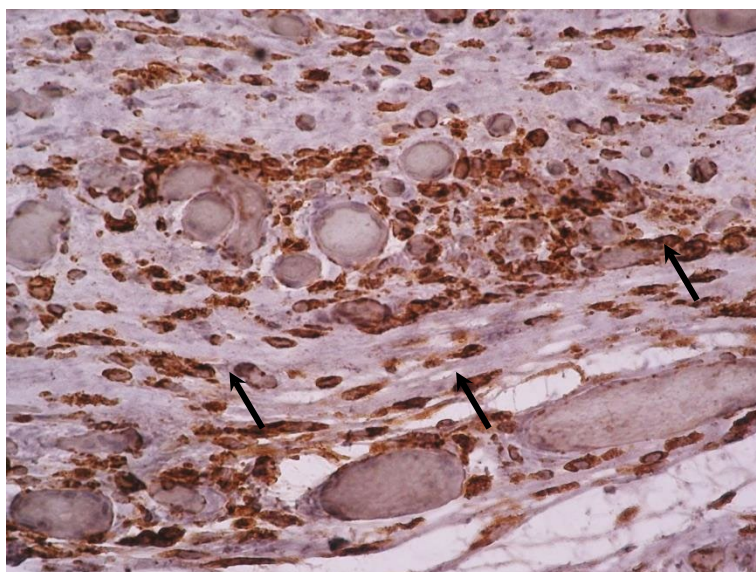


Рисунок 3.33 – Клітини з GRP78-позитивною імунореакцією у стінці капсули навколо імпланту у контрольній групі

*Примітка: ← клітини з позитивною реакцією до GRP78. Імуногістохімічна реакція щодо GRP78. Об. 40, ок. 10

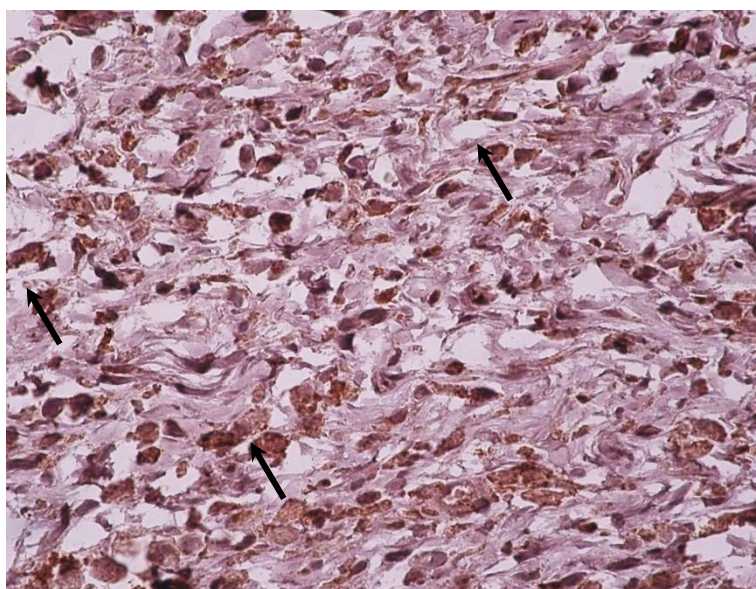


Рисунок 3.34 – Клітини з GRP78-позитивною імунореакцією у стінці капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← клітини з позитивною реакцією до GRP78. Імуногістохімічна реакція щодо GRP78. Об. 40, ок. 10

Такі клітини виявлено в обох груп, їх реєстрували між м'язовими волокнами, навколо кровоносних судин, між волокнистими елементами капсули. На основі тільки позитивної реакції до GRP78 не можна достовірно встановити тип або популяцію клітин, але превалююча більшість клітин у стінці капсули характеризувалась активною експресією GRP78.

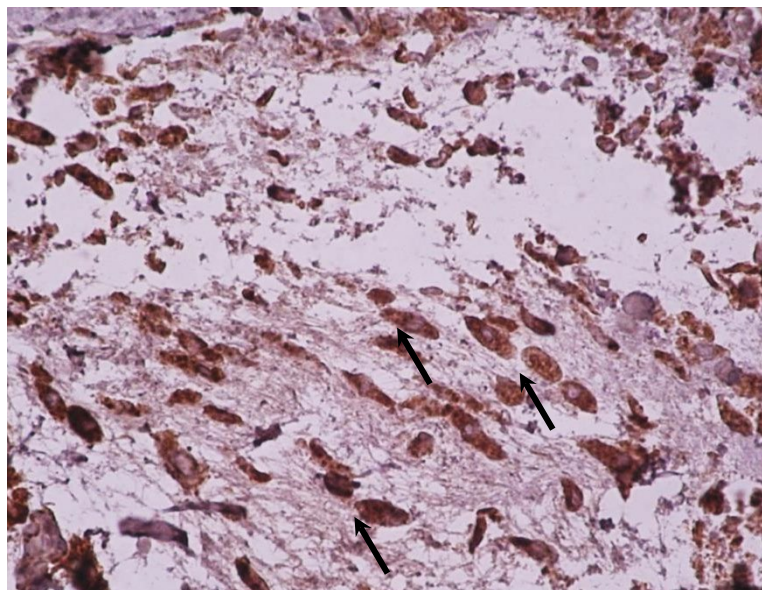


Рисунок 3.35 – Клітини з GRP78-позитивною імунореакцією по зовнішньому контуру капсули навколо імпланту у дослідній групі

*Примітка: ← клітини з позитивною реакцією до GRP78. Імуногістохімічна реакція щодо GRP78. Об. 40, ок. 10

Проведено кількісний аналіз імуногістохімічної реакції щодо GRP78 (рис. 3.36). Мала місце тенденція до зростання питомої щільності клітин з позитивною імунореакцією до GRP78, але середня її інтенсивність була статистично значуще більшою у контрольній групі (за непараметричним критерієм Манна-Уїтні, $p=0,02$).

Ці результати свідчать, що інтенсивність процесів у стінці капсули, які гіпотетично пов'язані з ураженням клітин з реакціями, які відбуваються з залученням ендоплазматичної сітки у клітинах були більшими у дослідній групі,

або не відрізняються між групами порівняння. Разом з цим інтенсивність цих процесів в окремих клітинах була більшою у контрольній групі.

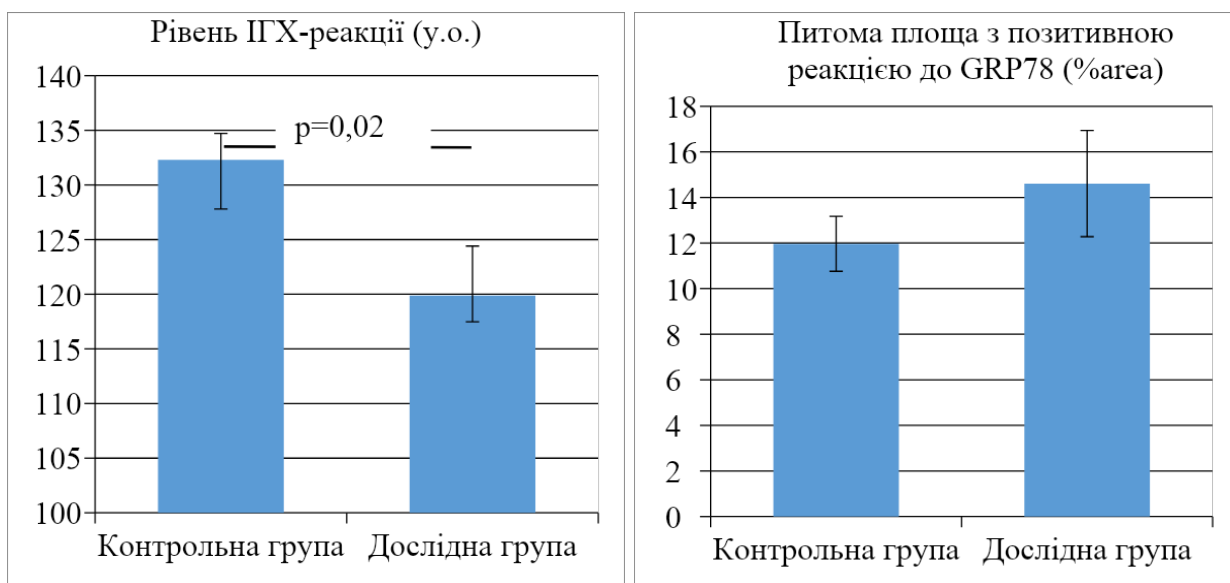


Рисунок 3.36 – Результати кількісної оцінки імунопозитивної реакції щодо GRP78.

Результати представлені як $M \pm m$

Клітинні реакції, які можуть бути пояснені аутофагією у стінці капсули були оцінені за результатами досліджень імуногістохімічної реакції до протеїну Veslin1 (рис. 3.37 та 3.38). Позитивну імунореакцію до Veslin1 було виявлено у поодиноких клітинах, реакція була цитоплазматичною і ядерною. Цікаво, що щільність клітин з позитивною імунореакцією залежала від відстані до порожнини капсули. Так, їх щільність зростала по внутрішньому контуру капсули і зменшувалась до ділянки середньої товщини стінки капсули. Назвні капсули клітини з позитивною імунореакцією до Veslin1 не реєстрували.

Ці результати засвідчили дистантну залежність розвитку аутофагії у клітинах капсули навколо імплантів. Можна передбачати, що по контуру імпланту відбувалась загибель клітин механізмом аутофагії.

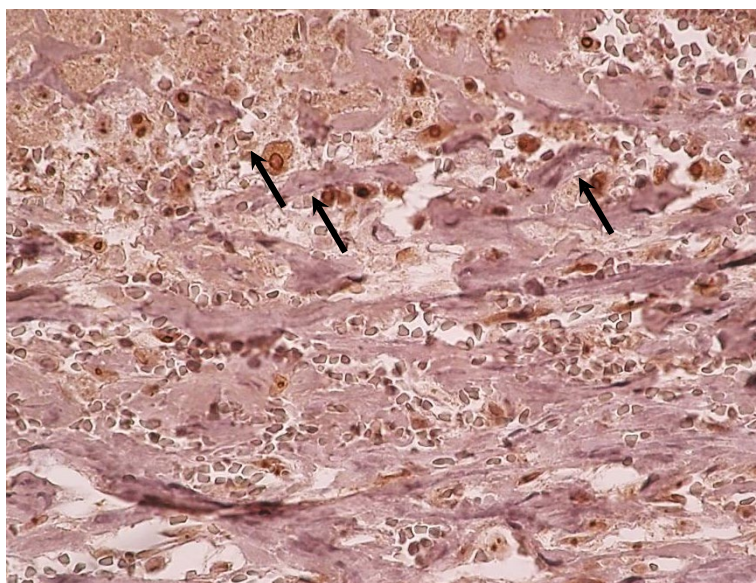


Рисунок 3.37 –Клітини з Veslin1 -позитивною імунореакцією у стінці капсули навколо імпланту у контрольній групі. Внутрішній шар капсули

*Примітка: ← клітини з позитивною реакцією до Veslin1. Імуногістохімічна реакція щодо Veslin1. Об. 40, ок. 10.

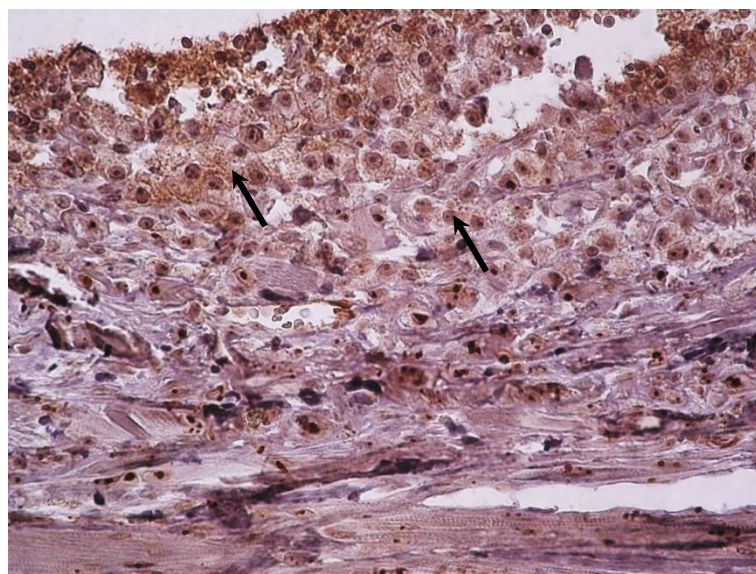


Рис. 3.38 – Клітини з Veslin1- позитивною імунореакцією у стінці капсули навколо імпланту у дослідній групі. Внутрішній шар капсули

*Примітка: ← клітини з позитивною реакцією до Veslin1. Імуногістохімічна реакція щодо Veslin1. Об. 40, ок. 10.

За результатами денситометричного дослідження питома щільність клітин з імунопозитивною реакцією була достовірно більшою у дослідній групі порівняно до контрольної (за непараметричним критерієм Манна-Уїтні, $p=0,01$) (Рис. 3.39). Це свідчить про те, що на межі з імплантом у клітинах стінка капсули відбувається аутофагія клітин, що є молекулярною основою їх загибелі.

Очевидно процеси аутофагії були значно менш вираженими щодо клітинних реакцій, які пов'язані з GRP78, мають дистантну залежність від імпланта і потенційно більш інтенсивними у дослідній групі.

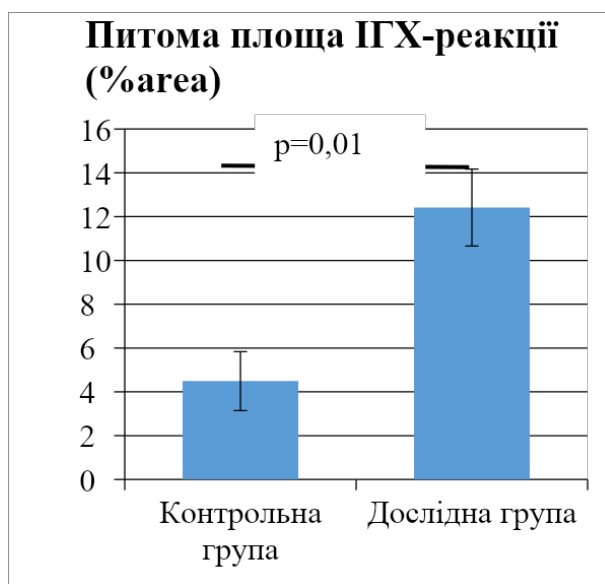


Рисунок 3.39 – Результати кількісної оцінки імунопозитивної реакції до протеїну Vec1n1. Результати представлені як $M \pm m$

Зроблено спробу узагальнити результати досліджень шляхом напівкількісного аналізу (таблиця 3.6).

У роботі виявлено деякі відмінності у значущості морфологічних параметрів між досліджуваними групами. Наприклад тенденцію до більш інтенсивного колагеногенезу і аутофагії у дослідній групі, але більш інтенсивний прояв стресової реакції у клітинах контрольної групи. Якщо узагальнити суму балів, то різниці не виявлено.

Таблиця 3.6

Узагальнюючий напівкількісний аналіз показників капсули

Показник	Контрольна група	Дослідна група
Колаген	++/+++	+++
CD3	+	+/-
CD44	++/+++	++/+++
CD68	++	+/+++
Vimentin	++/+++	++/+++
GRP78	+++	++/+++
Veclin1	+/-	+
Всього	min 12 max 16	min 12 max 16

Таким чином, це вказує на те, що виявлення специфічної реакції у тканинах на імплант, що містить нікель, є непростим завданням і потребує додаткового вивчення.

Як заключення, вперше на тваринній моделі було представлено результати морфологічних, гістохімічних та імуногістохімічних досліджень стінки капсули навколо імплантату з та без попередньої сенсibilізації нікелем.

Встановлено, що розвиток капсули навколо імпланту був атипичним і характеризувався активним формування капсули та накопиченням запального клітинного інфільтрату у її просвіті, який представлений CD44 і CD68 клітинами.

Особливості розвитку капсули полягали у збільшеному синтезі колагену і віментину у дослідній групі тварин та експресії Veclin1.

Виявлені нами в роботі морфологічні особливості реакції тканин на імплант є матеріалом для наступних досліджень.

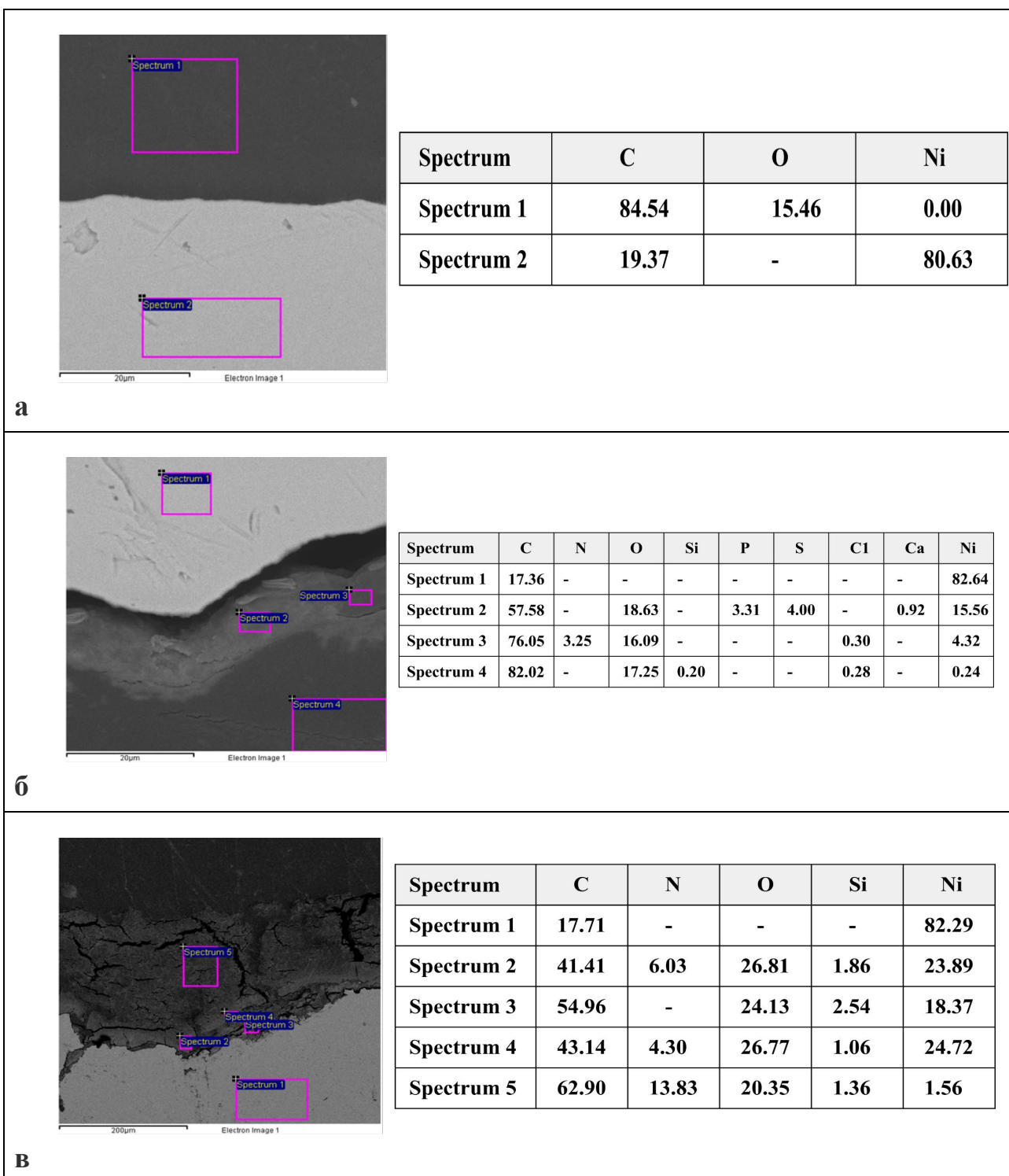


Рисунок 3.40 – Скануюча електронна мікроскопія поверхні імплантів та вмісту елементів, які були виділені через 5 місяців з тканин лабораторних тварин

*Умовні позначення: а - поверхня інтактних нікелевих імплантів, б - імпланти вилучені з тварин Групи 1, в - імпланти вилучені з тварин Групи 2 . СЕМ, $\times 20$ та $200 \mu\text{m}$.

Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ)

Для проведення дослідження методом електронної мікроскопії поверхні імплантів вилучені металеві пластини попередньо були механічно зафіксовані епоксидним компаундом для утримання поверхневого шару, після полімеризації компаунда, зразок розрізали поперек. В подальшому переріз шліфували та полірували з метою виявити границю металу та поверхневого шару та ідентифікувати елементний склад окремих прошарків.

Окислена поверхня імплантів була покрита органічною плівкою. Наявність макроелементів на окисленій поверхні ідентифіковано методом енергодисперсійної спектроскопії, результати представлено на (рис. 3.40)

Інтактний зразок пластинки з Ni представлено на (рис. 3.40 а), ділянка Spectrum 2 відповідає області металу (Ni).

На другому зразку (рис. 3.40 б) імплант вилучений з тварин Групи 2 (контрольні) - ділянка Spectrum 1 відповідає металу (Ni), в ділянках Spectrum 2 та 3 показують елементний склад шару, що утворено на поверхні металу та відповідно до елементного складу можуть бути з'єднанням Ni, кисню (O), фосфору (P) та сірки (S) та кремнію (Si), що їх поява свідчить про наявність корозії в даному зразку.

Третій зразок (рис. 3.40 в) імплант вилучений з тварин Групи 3 (дослідні) ділянка Spectrum 1 відповідає металу (Ni), всі інші Spectrum відповідають різним частинам шару, що утворився на поверхні металу, в елементному складі цих ділянок (присутність кисню (O), азоту (N) та нікелю (Ni)) в більших відсоткових значеннях, що свідчить про більш виражений прояв корозії поверхні металу. Ділянка Spectrum 5 - показує віддалену наявність металу (Ni), що можна охарактеризувати, як початок руйнації. Наявність кремнію (Si) в складі може бути пояснена крихкістю "покриття", що призвело до вмісту в ньому частинок абразиву при шліфуванні.

Дослідження зразків імплантів методом стаціонарної краплі та методами атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії з отриманими IgG піддослідних тварин

Властивості матеріалів імплантів були протестовані на нанорівні з використанням методів атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії. Досліджено як особливості рельєфів поверхонь металів, так і силові взаємодії з поверхнею, які можуть відповідати за біогезію білків до поверхні.

Проведення дослідження поверхні методом стаціонарної краплі (кут змочування в точці контакту трьох фаз (метал-вода-повітря)

В загальному, взаємодія речовин з поверхнею визначається співвідношенням їх вільних енергій поверхонь.

Одним із способів швидкої оцінки такої енергії є вимірювання змочування за трифазним контактним кутом рідини (WCA). У цій точці присутні межі поділу фаз тверде тіло - повітря, повітря - рідина та рідина - тверде тіло.

Вимірювання контакту кута з рідиною дозволяє визначити гідрофільність або гідрофобність поверхні, що часто має вирішальне значення для оцінки успіху обробки поверхні або процесів очищення.

Якщо крапля поширюється по поверхні, в результаті чого контактний кут становить менше 90° , поверхня вважається гідрофільною. І навпаки, якщо рідина не має тенденції до розтікання, що призводить до контактного кута більше за 90° , поверхня вважається гідрофобною.

Покрокове проведення дослідження поверхні методом стаціонарної краплі (кута контакту в точці контакту трьох фаз (метал-вода-повітря), докладно наведена у розділі 2.

Співвідношення енергії цих фаз та величини контактного кута описуються добре відомим рівнянням Юнга.

Для отримання достовірності даних дослідження нами використовувались різні поверхні, які попередньо проходили спектроскопію для визначення вмісту елементів: нікелеві пластини (Ni) – аналогічної яку імплантували піддослідним тваринам, пластинки що містять (Fe+Cr+Ni+Mo+Mn) та пластинки що містять (Ti+2%Al).

Для виключення впливу рельєфу поверхні на результати досліджень, зразки були попередньо відполіровані до шорсткості 6-13 нм.

АСМ зображення полірованих поверхонь наведена на (рис. 3.41). На зображеннях присутні характерні сліди полірування у вигляді нано-/мікроподряпин різної глибини.

Загалом такого розміру подряпини не впливають на величину контактного кута змочування.

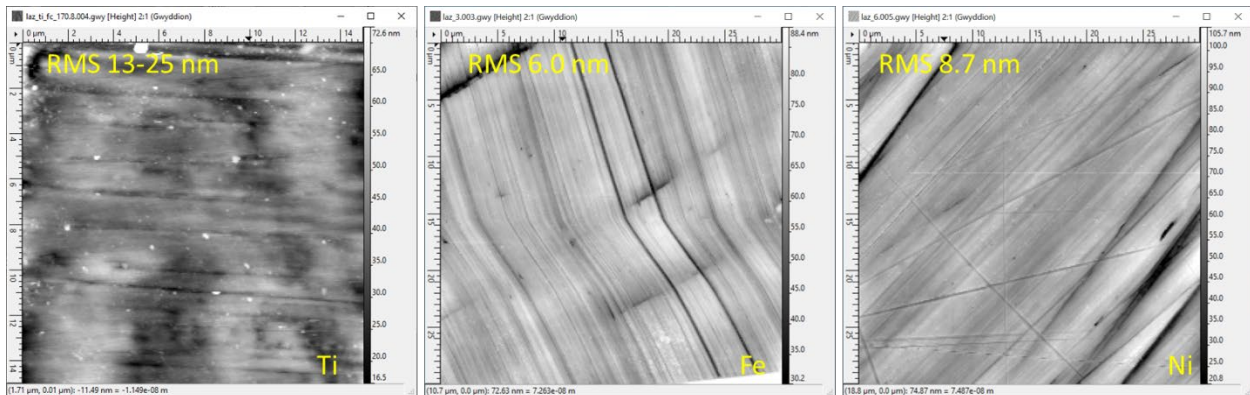


Рисунок 3.41 – АСМ зображення поверхонь полірованих підкладинок титану (Ti+2%Al), заліза (FeCrNiMoMn) та нікелю (Ni).

Вказана шорсткість поверхонь (RMS)

Проведено дослідження величини контактного кута на трьох різних поверхнях: нікелеві пластини (Ni) – аналогічної яку імпантували піддослідним тваринам (рис. 3.42 а), пластинки що містять (Fe+Cr+Ni+Mo+Mn) – (Рис. 3.42 б) та пластинки що містять (Ti+2%Al) (рис. 3.42 в). Результати вимірювань кута змочуваності у зразках представлено у таблиці 3.7

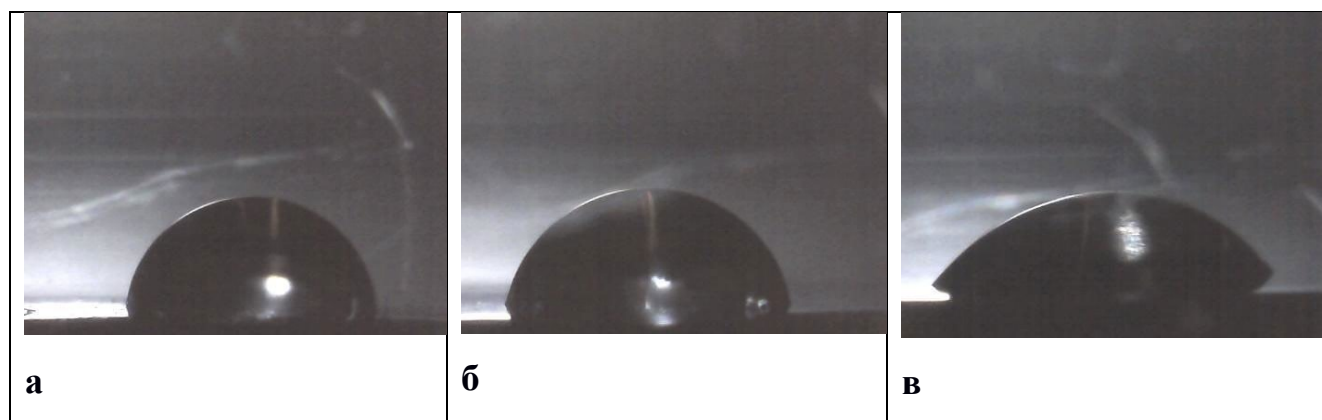


Рисунок 3.42 – Результати вимірювання кута змочуваності поверхні імплантів.

Умовні позначення: а - Ni, б - Fe+Cr+Ni+Mo+Mn, в - Ti+2%Al.

Показник кута змочуваності на зразках Ni та Fe+Cr+Ni+Mo+Mn більше ніж у Ti+2%Al, що вказує на їх більшу гідрофільність. Менший кут контакту вказує на кращу змочуваність, маючи на увазі, що рідина легше розтікається по поверхні. І навпаки, більший кут контакту вказує на погану змочуваність.

Таблиця 3.7

Показник кута змочуваності на різних поверхнях

Зразок	CA, deg	Err
Ni	82,15	0,15
Fe+Cr+Ni+Mo+Mn	74,45	0,05
Ti+2%Al	46,65	0,55

Умовні позначення: CA — contact angle (кут контакту), Err – error (похибка).

Згідно отриманих нами даних, величини кута змочування дистильованої води та проб IgG на досліджуваних поверхнях показані на рис. 3.43.

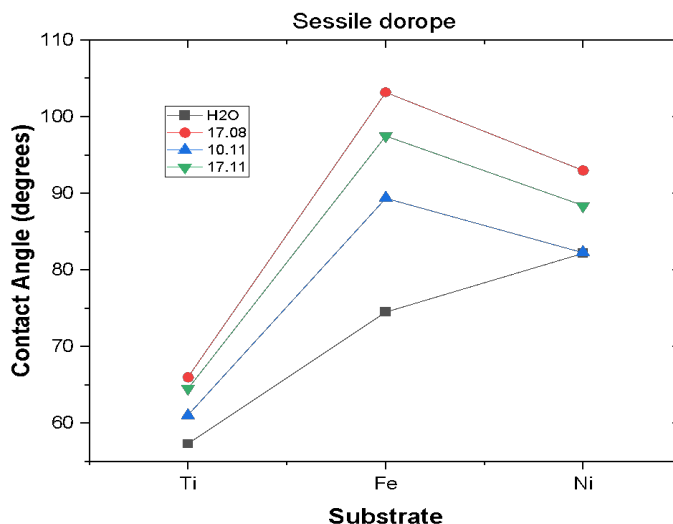


Рисунок 3.43 – Кути змочування поверхонь водою (дистильована) та IgG.

Кут змочування поверхонь зразків водою є цілком очікуваним та відповідає літературним даним про кути змочування чистих металів Ti, Fe+Cr+Ni+Mo+Mn та Ni, з урахуванням того що досліджуваний зразок заліза є багатокомпонентним сплавом Fe+Cr+Ni+Mo+Mn.

Кути змочування пробами білків мають таку ж тенденцію, однак значення WCA є дещо вищими (поверхні змочуються пробами-білків гірше ніж водою), що вказує на подальшу тенденцію до адгезії білку на поверхнях матеріалу.

Також звертає на себе увагу збільшення WCA проб білків на поверхні залізного сплаву відносно характерної поведінки WCA води.

Проведення індивідуального тестування імплантів за допомогою методів атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії з отриманими IgG піддослідних тварин

Широко відоме застосування АСМ для характеристикації тривимірної форми поверхонь в діапазоні розмірів від кількох ангстрем до десятків мікрон. Дані прилади визнанні як одні з найкращих для проведення спектроскопії силових взаємодій зонд-поверхня, зокрема спектроскопії сил міжмолекулярних взаємодій, де реєструються залежності сили взаємодії від відстані.

Також, добре розроблені теорія та експериментальні методи досліджень наномеханічних та адгезійних взаємодій на основі атомно-силової спектроскопії. Шорсткість поверхні, енергія адгезії, змочуваність, поверхневий заряд та інші фізичні характеристики, картографовані АСМ на поверхні із нанометровою просторовою роздільною здатністю є важливими додатковими параметрами в аналізі рівня біоадгезійних взаємодій та прогнозуванні біосумісності матеріалів.

Дослідження адгезивних властивостей в живих клітин вимагають застосування протоколів, які використовуються для модифікації поверхонь як кантилевера, так і підкладки.

Нанесення біомолекул на зонд АСМ (функціоналізація) має ключове значення для реєстрування молекулярного розпізнавання. Як правило, слід надавати перевагу використанню ковалентного зв'язування для кріплення біомолекул на зонди, яке зазвичай реалізується за допомогою або тіолових або силанових поверхневих хімічних сполук.

У системі формування реакції організму на сторонній матеріал тригерну функцію виконують імуноглобуліни класу G (IgG). Вони мають тверду просторову структуру у вигляді букви Y, центри їхнього розпізнавання розміщені на верхніх кінцях Y, їхнє зв'язування відбувається за рахунок утворення ковалентного зв'язку з комплементарними молекулами.

В організмі IgG представлені на поверхні лімфоцитів, які при зв'язуванні IgG з іншими молекулами активуються, викидають у навколишнє середовище окисні радикали і дають сигнал для стимуляції синтезу IgG з певними параметрами, щоб розпізнавати і зв'язувати чужорідні молекули.

Принцип розпізнавання високоспецифічними IgG певних речовин лежить в основі клінічних імуноферментних аналізів.

Тобто можливе використання АСМ як для утворення зв'язків, так і для їхнього розриву.

За допомогою АСМ можливо виміряти величину міжмолекулярних сил (сил біoadгезії, або афінних) між АГ та АТ.

При проведенні експерименту після очищення та розведення до відповідної концентрації IgG. Для підготовки АСМ зондів нами проводилась попередня функціоналізація поверхні зонда шляхом нанесення IgG (піддослідних тварин) за раніше описаною методикою забезпечуючи специфічність силових міжмолекулярних взаємодій, більш детально описано в розділі 2. На АСМ зонди наносилась майже однакова кількість імуноглобуліну методом занурення у мікрокраплю. Точна кількість осадженого на зонд білка відстежувалась за зсувом максимуму власного механічного резонансу зонду. Зонд може бути функціоналізований протягом відносно короткого часу (менше 2-3 годин).

Як раніше було зазначено для отримання достовірності даних дослідження використовувались різні поверхні, які попередньо проходили спектроскопію для визначення вмісту елементів: нікелеві пластини (Ni) – аналогічної яку імплантували піддослідним тваринам, пластинки що містять (Fe+Cr+Ni+Mo+Mn) та пластинки що містять (Ti+2%Al).

Кваліфікація адгезивних властивостей за допомогою АСМ проводилась в режимі силової спектроскопії де записуються силові криві.

Силова крива – це залежність між відхиленням кантилевера (що перетворюються на силу) та відносним положенням зразка (або сканер), яке можна перетворити на відстань між вістрям та зразком.

Характер силової кривої залежить від фізико-хімічних властивостей двох взаємодіючих поверхонь, а саме досліджуваного зразка, вістря зонда та навколишнього середовища.

Вимірювання адгезійних взаємодій проводились в різних точках типових, однорідних ділянок полірованих поверхонь при однаковій температурі та відносній вологості повітря (кімнатні умови 22 С, 40%).

В проведено дослідженні сили взаємодії отримали з аналізу відтягуючої частини кривої сил, записаної під час відводу консолі АСМ від поверхні. Відбувається розрив комплексу (в зоні контакту між модифікованим лігандом вістрієм та рецептором), результуюча крива сили містить характерний «стрибок».

Сила роз'єднання, необхідна для роз'єднання двох взаємодіючих молекул, визначається на основі аналізу частини кривої сили відтягнення. АСМ може вимірювати силу відриву, яка також називається силою розриву або відриву.

В кожній серії вимірювань на 2-х різних волокнах реєструвалось по 50 силових кривих. При суттєвій відмінності отримуваних значень сил адгезії проводились додаткові вимірювання.

Дослідження проводились в декілька етапів, в першому етапі проводилось дослідження чистими - нефункціоналізованим зондом, результати вимірювань сили відриву від різних точок поверхонь зразків для чистого нефункціоналізованого зонду приведені на рис. 3.44.

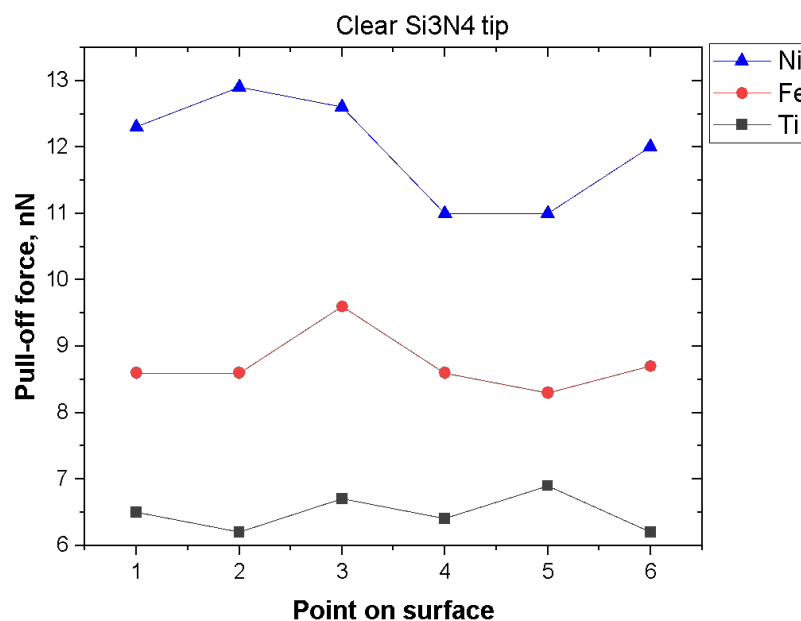


Рисунок 3.44 – Сили біoadгезії проб до поверхонь підкладинок, виміряні атомно-силовою спектроскопією: сили відриву від поверхні чистого зонду АСМ.

За отриманими результатами для відведення зонду від поверхні Ni потрібно прикласти вдвічі більшу силу ніж від поверхні Ti (12,2 нН та 6,5 нН, відповідно). Для подолання взаємодій з поверхнею сплаву Fe+Cr+Ni+Mo+Mn потрібно прикласти зусилля біля 8,7 нН. Тобто адгезивні взаємодії чистого зонду з поверхнею є інверсними до величини змочування поверхонь водою.

Схожу тенденцію показують і біоадгезивні взаємодії зонду функціоналізованого IgG (піддослідних тварин), із тестовими поверхнями металів (рис. 3.45).

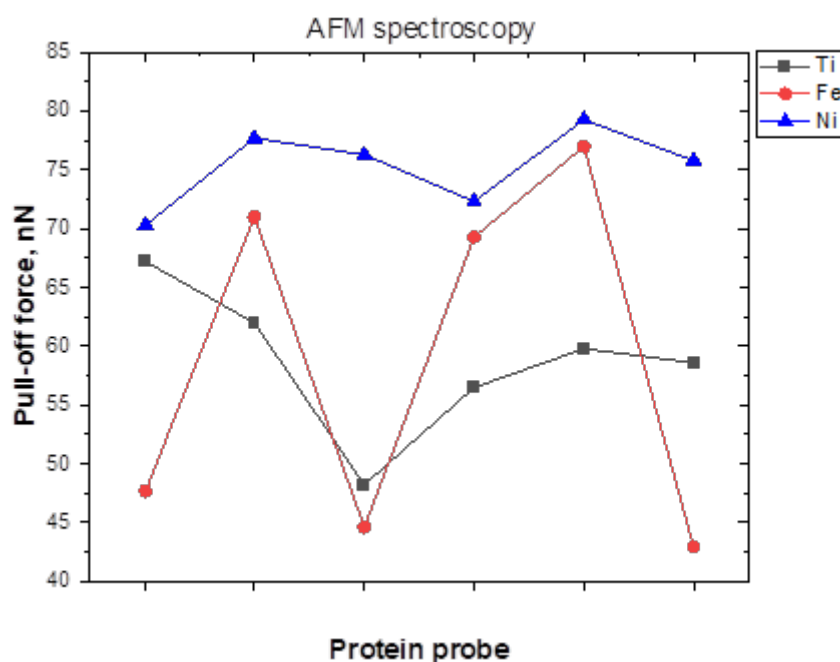


Рисунок 3.45 – Сили біоадгезії проб до поверхонь підкладинок, виміряні атомно-силовою спектроскопією: сили відриву від поверхні функціоналізованого IgG (піддослідних тварин) зонду АСМ.

Для відриву від поверхні Ni зонду із різними пробами IgG, нанесеними на його вістря зонду, потрібно прикласти зусилля біля 75 нН.

Сили біоадгезії проб до Ti є більш неоднорідними у порівнянні із адгезією до Ni і в середньому можна вважати їх силу адгезії на рівні 57 нН.

Адгезія функціоналізованого зонду до сплаву Fe+Cr+Ni+Mo+Mn є ближчою до величини характерної для поверхні Ni (якщо не дивитися на точки 45 нН, які, здаються - не типовими). Що знову ж таки, як і у випадку контактного кута змочування, відрізняється тренд біоадезивних взаємодій до сплаву заліза від двох інших металів. Ймовірно така поведінка може бути пояснена, що досліджуваний зразок заліза є багатокомпонентним сплавом Fe+Cr+Ni+Mo+Mn, але дана поведінка вказує на те що наявність в сплаві елемента Ni, який пояснює отриманні дані.

Можливі похибки при вимірюваннях:

– вимірювання АСМ за своєю суттю чутливі до різних факторів, таких як вологість, геометрія зонда та площа контакту. Ці фактори можуть вносити варіації та невизначеності у виміряні сили адгезії, що ускладнює пряме порівняння результатів для різних металів.

– шорсткість поверхні: як згадувалося, шорсткість поверхні металів може впливати на площу контакту з зонду АСМ. Шорсткіша поверхня може забезпечити більше контактних точок і потенційно сильнішу адгезію, незалежно від змочуваності.

Таблиця 3.8

Показник сили відриву функціоналізованого IgG зонда на різних поверхнях

Метал/група	Контрольна, нН	Дослідна, нН	p-значення за U-критерієм Манна-Уїтні
Ni	55,7±0,2	75,2±1,4	0,02
Fe	54,1±3,2	39,7±11,4	0,14
Ti	56,6±1,8	52,9±4,6	0,24

У таблиці 3.8 представлені дані по взаємодії функціоналізованого IgG зонда з різними поверхнями імплантів. Відповідно, результати отриманих вимірювань

свідчать про найвищу афінність та специфічність (силу зв'язування) антитіл, отриманих із сироваток щурів дослідної групи в порівнянні з іншими.

Показник у дослідній групі при вивченні імплантата з Ni достовірно вищий за U-критерієм Манна-Уїтні ($p=0,02$). Результати при дослідженні зразків з Fe та Ti не відрізнялись.

Значення сили (нН) відриву зонду поверхнею імплантату з IgG вважали за оцінку сумісності матеріалу з організмом. Чим вище значення сили відриву тим ймовірніше можливий розвиток реакції на імплантат.

Сама реакція організму реципієнта реалізовується як формування сполучної тканини навколо імплантату з втратою функціональних властивостей останнього та ймовірним розвитком асептичного запалення в місці встановлення імплантату, у руйнуванні самого імплантату.

В основу даного дослідження поставлена задача забезпечити встановлення сумісності імплантатів до організму певного реципієнта шляхом вимірювання сил взаємодій між функціоналізованим зондом і поверхнею імплантату за допомогою АСМ, який би був точним, відповідаючи реальному стану.

Функціоналізація зонду IgG дозволяє виміряти силу взаємодії між поверхнею та імуноглобуліном зафіксованому на зонді АСМ і у такий спосіб допомогти визначити сумісність даного матеріалу з живим організмом.

3.2.2 Висновки другого етапу дослідження

1. Доведено розвиток запальної реакції на нікелевий імплант в експерименті. Морфологічні особливості запальної реакції подібні до типу побічних місцевих тканинних реакцій (ALTR) і побічних реакцій на металеві уламки (ARMD). На тлі сенсibiliзації сульфатом нікелю тканинні реакції сполучної тканини капсули на нікелеві імпланти характеризувалися достовірно більшою питомою щільністю колагену ($44,4\pm 4,3\%$ проти $32,9\pm 3,3\%$, $p<0,01$) та тенденцією

збільшення питомої щільності клітин з експресією віментину ($15,7 \pm 3,0\%$ проти $9,8 \pm 2,1\%$, $p=0,05$).

2. Клітинно-запальна реакція навколо нікелевих імплантів після сенсibilізації та без такої мала інтенсивну інфільтрацію CD44+ клітин і значно меншу появу CD68+ макрофагів та CD3e+ лімфоцитів з наступною закономірністю питомої щільності у стінці капсули: CD44+ клітини $47,6 \pm 5,9\%$ проти $37,9 \pm 7,2\%$ ($p=0,11$), CD68+ клітини $14,9 \pm 2,4\%$ проти $21,1 \pm 4,5\%$ ($p=0,23$), CD3e+ клітини $4,5 \pm 0,8\%$ проти $9,2 \pm 2,7\%$ ($p=0,11$).

3. У стінці капсули навколо нікелевих імплантів виявлено молекулярні маркери стрес-індукованих клітинних реакцій та загибелі клітин. На тлі сенсibilізації сульфатом нікелю показник питомої щільності Bcl2-позитивних клітин, що є маркером аутофагії, вірогідно перевищував значення у капсулі контрольного імпланту ($12,4 \pm 1,7\%$ проти $4,5 \pm 1,3\%$ ($p=0,01$)). Доведено розвиток запалення, пошкодження клітин сполучної тканини з накопиченням запального інфільтрату та клітинного детриту у сполучнотканинній капсулі навколо нікелевих імплантів.

4. Корозія імпланту була виявлена в кожному вилученому зразку, але більш вираженою була в групі тварин з попередньою сенсibilізацією до Ni, з'являються віддалені часточки (Ni), що можна охарактеризувати, як початок руйнації імпланту.

5. Наявність реакції гіперчутливості до металу або наявність реакції до елемента у складі імпланту може призвести до пришвидшення корозії імпланту.

6. Реакція реципієнта на імплантат має індивідуальний характер та залежить від стану імунної системи організму на момент імплантації, так як на поверхні імплантатів є центри зв'язування, які можуть розпізнаватися імунною системою організму.

7. Високий ступінь відповідності даних вимірювання з використанням атомно-силової спектроскопії в експерименті *in vivo*, що дозволяє розглядати цей

запропонований метод як перспективний, швидкий і високоінформативний для тестування матеріалів на сумісність з організмом певного реципієнта.

8. Метод тестування за допомогою атомно-силової мікроскопії на основі функціоналізації IgG може дозволити визначити можливість виникнення реакції на імплантат.

Матеріали розділу висвітлені в наступних наукових роботах:

1. Грищук ЯІ, Алексеєва ТА, Картель МТ, Лазаренко ОМ, Лазаренко ГО, Литвин ПМ, та ін. Тестування з використанням атомно силової мікроскопії індивідуальної сумісності алотрансплантатів з організмом реципієнта. Клінічна хірургія. 2016; 7: 61-63.

2. Boiko IV, Zaft VB, Lazarenko GO, Lazarenko OM, Aleksyeyeva TA, Kartel NT, Lytvyn PM. Testing the compatibility of the orthopedic implants material with recipients body in arthroplastic using atomic force microscopy (AFM). Juniper Online Journal of Orthopedic & Orthoplastic Surgery 2018; 1(5): P 86-90.

3. Lazarenko HO, Boiko IV. The method of atomic force microscopy as a possible tool for testing the biocompatibility of implants in traumatology and orthopedics practice. Wiadomości Lekarskie. 2022; 75(11(1): 2614-2618.

4. Lazarenko HO, Savosko SI, Guzyk MM, Boiko IV. Features of using orthopedic implants on an experimental model of sensitization to nickel (Ni). Clinical and Preventive Medicine. 2023; (6(28) C. 77-89.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За результатами проведеного аналізу вітчизняних та закордонних літературних даних жоден метод діагностики реакції гіперчутливості до металу не є загальноприйнятим або рекомендованим для клінічного визначення. Наразі бракує надійних діагностичних або скринінгових інструментів для оцінки повного спектру реакцій пацієнта на металевий імплант. Існує обмежена кількість способів передбачити або діагностувати несподівані прояви реакції на метал. На даний момент існує декілька діагностичних тестів, які оцінюють відповідь організму, але немає чіткого консенсусу щодо того, як ці тести слід використовувати в клінічних умовах.

Дані прогалини підкреслюють потребу в нових, клінічно ефективних діагностичних та прогностичних тестах для визначення ймовірності виникнення індукованої імплантатом патологічної відповіді на імплантацію та адекватну оцінки всього спектру можливих реакцій після проведення імплантації.

За результатами нашого дисертаційного дослідження вивчення реакції організму на Ni-вмісні імплантати на тваринній моделі з штучною сенсibiliзацією до Ni підтверджуються гіпотеза за якою реакціях, пов'язаних з гіперчутливістю типу IV, іони металів, що вивільняються з імплантатів, вважаються гаптенами, тобто хімічними компонентами, які занадто малі, щоб самостійно викликати цей тип імуногенної відповіді, але здатні зв'язуватися з ендogenousними білками з утворенням гаптен-білкових комплексів, які в подальшому діють як антиген. Після поглинання макрофагами, іони металів зв'язуються з білками, які ідентифікуються антигенпрезентуючими клітинами.

Антигенпрезентуючі клітини демонструють метало-антигенний комплекс для Т-клітин, що призводить до подальшої активації клітин CD4 +, CD8 + та макрофагів, з наступним вивільненням прозапальних факторів, які і є ключовими

медіаторами реакцій гіперчутливості. Прозапальні цитокіни призводять до імунної відповіді, яка може спричинити запалення тканин з подальшим пошкодженням навколишніх тканин.

Іони металу можуть пошкоджувати клітини та активувати специфічні імунні та запальні шляхи, що призводить до розвитку реакції гіперчутливості, а частинки, які поглинаються макрофагами, можуть призвести до запалення та тканино-деструктивних реакцій різного ступеня.

Причиною активації макрофагів в місці імплантації можуть бути металеві залишки та DAMP, що вивільняються після пошкодження тканини та загибелі клітин. Даний процес призводить до виробництва прозапальних цитокінів, включаючи, а також хемокіни та інші низькомолекулярні медіатори запалення. У взаємодії ці численні шляхи ще більше підсилюють клітинну інфільтрацію та запалення. Поглинання металевих частинок макрофагами шляхом фагоцитозу є ключовим механізмом, за допомогою якого імплантати можуть викликати запальні реакції.

Надалі фагоцитовані металеві частинки діаметром менше 10 мкм піддаються ендоцитозу та транспортуються до лізосом, де кисле мікрооточення цих везикул сприяє корозії частинок, стимулюючи подальше вивільнення видів іонів металу.

Оскільки металеві частинки стійкі до повної деградації лізосомами, вони не зникають після загибелі клітини, а навпаки збільшують запальний сигнал. Занадто великі частинки, які не може поглинути окрема клітина, можуть ініціювати злиття макрофагів, що призведе до утворення багатоядерних синцитованих гігантських клітин чужорідного тіла (FBGC) для секвестрування неперетравлених частинок. Цей процес, відіграє центральну роль у формуванні гранульом чужорідних тіл та в продовженні запальних реакцій пов'язаних з імплантатом.

Іони металу, що вивільняються в результаті окислювальної корозії металу, можуть служити критичними підсилювачами реакцій запалення та взаємодіють з іншими імунними та запальними медіаторами.

Фізичні та хімічні характеристики металевих частинок можуть визначати апоптозний або некротичний процес в контексті інших запальних сигналів, налаштовуючи подальший перебіг запального процесу.

Пошкодження тканини, що проявляється як некроз у зв'язку з нестабільними або скомпрометованими імплантатами, може хронізувати ці дезадаптивні реакції.

Гістологічні дані демонструють спільну локалізацію лімфоцитів із макрофагами та гігантськими клітинами у фіброзних тканинах, що оточують металеві імплантати.

На основі зазначених морфологічних ознак капсули навколо імпланту зроблено заключення, що реакція тканин на імплант полягає у його інкапсуляції з розвитком запальної інфільтрації, супутнім геморагічним просочуванням капсули. Вочевидь імплант у створеній капсулі не має безпосереднього контакту з стінкою капсули, і є відмежованим інфільтратом.

Додатково до цього встановлено вогнищеві або множинні скупчення гемосидерину та макрофагів у стінці капсули. Макрофаги активно фагоцитували цей продукт окиснення (гранули гемосидерину виявлено у цитоплазмі макрофагів).

Крім того, лімфоцити виділені з тканин, що оточують імплантати, реагували на стимуляцію іонами металів. Лінії лімфоцитів, включаючи Т-клітини та В-клітини, містять властивості «пам'яті» тривалого набутого імунітету завдяки вибіркового механізму та розподілу специфічних клонів лімфоцитів. Клітинні лінії є центральними в організації залучення, активації та ефекторних функцій інших клітин імунної системи.

Наявність реакції гіперчутливості до металу або наявність реакції до елемента у складі імпланту може призвести до пришвидшення корозії імпланту.

Розроблений в ході виконання дисертаційної роботи та апробований шляхом експерименту *in vivo* фізичний метод тестування імплантатів на основі методів атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії з використанням IgG на

експериментальній моделі з штучною сенсibiliзацією на Ni дозволив визначити можливості виникнення реакції на імплантат.

Враховуючи клінічні дані, на створеній експериментальній моделі, виявлено високий ступінь відповідності даних вимірювання з використанням атомно-силової спектроскопії на палітрі матеріалів в експерименті *in vivo*, що дозволило нам розглядати цей метод як перспективний, швидкий і високоінформативний для тестування матеріалів на сумісність з організмом певного реципієнта.

Результати проведеного дослідження дозволити зробити висновки що реакція організму на імплантат має індивідуальний характер та залежить від багатьох факторів, особливо від стану імунної системи організму на момент імплантації, так як на поверхні імплантатів є центри зв'язування, які можуть розпізнаватися імунною системою організму.

Також результати нашого дослідження стали підґрунтям для практичних рекомендацій лікарям ортопедам-травматологам, які виконують оперативні втручання з застосуванням імплантатів.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота містить науково-теоретичне узагальнення та нове розв'язання актуального науково-практичного завдання – дослідження реакції гіперчутливості на ортопедичні імплантати, встановлення впливу реакції організму на поверхню імплантатів та визначення індивідуальної сумісності імплантатів в ортопедо - травматологічній практиці.

1. За результатами проведеного аналізу вітчизняних та закордонних літературних даних щодо діагностики, тактики лікування та ризику виникнення ускладнень при використанні ортопедо-травматологічних імплантатів та проявів реакції гіперчутливості на метал, встановлено прогалини у вивченні та оцінці біологічної реакції організму на металеві імплантати та відсутність чітких доказів специфічності існуючих тестів для прийняття клінічних рішень.

2. Встановлено, що реакція реципієнта на імплантат має індивідуальний характер та залежить від стану імунної системи організму на момент імплантації, так як на поверхні імплантатів є центри зв'язування, які можуть розпізнаватися імунною системою організму.

3. Розроблено та апробовано модифіковану модель сенсibiliзації піддослідних тварин (щурів) на Ni, в якій досліджено реакцію організму на ортопедичні імплантати з Ni з сенсibiliзацією до Ni та без сенсibiliзацією до цього елемента.

4. Доведено неефективність поширеного методу вушної проби на Ni в експериментальних моделях на тваринах, встановлено нечутливість цього методу до оцінки реакції на Ni, що підтверджується однаковими показниками у контрольній та дослідній групах тварин ($2,0 \pm 0,08$ проти $2,0 \pm 0,09$, $p=0,47$).

5. Встановлено відсутність достовірної різниці показників при дослідженні із використанням протокової цитофлуориметрії визначено

концентрацію IFN- γ , IL-4, TNF- α в сироватці крові щурів за умов нікель-асоційованої сенсibilізації, що свідчить про неспецифічність даних маркерів для діагностик реакції гіперчутливості на Ni, про те виявлено зростання рівня MCP-1 у дослідних тварин в сироватці крові щурів за тих же самих умов, нами встановлено, що таргетування MCP-1 може бути потенційною терапевтичною стратегією визначення реакції гіперчутливості.

6. Доведено розвиток запальної реакції на нікелевий імплант в експерименті. Встановлено, що морфологічні особливості запальної реакції подібні до типу побічних місцевих тканинних реакцій (ALTR) і побічних реакцій на металеві уламки (ARMD). На тлі сенсibilізації сульфатом нікелю тканинні реакції сполучної тканини капсули на нікелеві імпланти характеризувалися достовірно більшою питомою щільністю колагену ((n – 13) 44,4 \pm 4,3% проти (n – 6) 32,9 \pm 3,3%, p<0,01) та тенденцією збільшення питомої щільності клітин з експресією віментину ((n – 13) 15,7 \pm 3,0% проти (n – 6) 9,8 \pm 2,1%, p=0,05).

7. Встановлено, що клітинно-запальна реакція навколо нікелевих імплантів після сенсibilізації (n – 13) та без сенсibilізації (n – 6) мала інтенсивну інфільтрацію CD44+ клітин і значно меншу появу CD68+ макрофагів та CD3e+ лімфоцитів з наступною закономірністю питомої щільності у стінці капсули: CD44+ клітини 47,6 \pm 5,9% проти 37,9 \pm 7,2% (p=0,11), CD68+ клітини 14,9 \pm 2,4% проти 21,1 \pm 4,5% (p=0,23), CD3e+ клітини 4,5 \pm 0,8% проти 9,2 \pm 2,7% (p=0,11).

8. Доведено розвиток запалення, пошкодження клітин сполучної тканини з накопиченням запального інфільтрату та клітинного детриту у сполучнотканинній капсулі навколо нікелевих імплантів, про це свідчить наявність у стінці капсули навколо нікелевих імплантів молекулярних маркерів стрес-індукованих клітинних реакцій та загибелі клітин. На тлі сенсibilізації сульфатом нікелю показник питомої щільності Weslin1-позитивних клітин, що є маркером аутофагії, вірогідно перевищував значення у капсулі контрольного імпланту ((n – 13) 12,4 \pm 1,7% проти (n – 6) 4,5 \pm 1,3% p=0,01).

9. Розроблено та апробовано фізичний метод тестування імплантатів за допомогою методів атомно-силової мікроскопії та силової спектроскопії з отриманими IgG на експериментальній моделі з штучною сенсibiliзацією на Ni для визначення можливості виникнення реакції на імплантат.

10. Встановлено, що метод тестування за допомогою атомно-силової мікроскопії на основі функціоналізації IgG може дозволити визначити можливість виникнення реакції на імплантат. На створеній експериментальній моделі виявлено високий ступінь відповідності даних вимірювання з використанням атомно-силової спектроскопії на палітрі матеріалів в експерименті *in vivo* (Ni $55,7 \pm 0,2$ нН проти $75,2 \pm 1,4$ нН ($p=0,02$)), що дозволяє розглядати цей метод як перспективний, швидкий і високоінформативний для тестування матеріалів на сумісність з організмом певного реципієнта.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

– За результатами проведеного аналізу вітчизняних та закордонних літературних даних та даних проведеного нами експериментального дослідження реакції організму на Ni-вмісних імплантатах на тваринній моделі з штучною сенсibiliзацією до Ni, ми можемо рекомендувати практикуючим лікарям ортопедам-травматологам наступне:

– проводити передопераційний скринінг пацієнтам, з алергією на метал або на компоненти імпланту анамнезі;

– диференційно підходити до способів діагностики реакції гіперчутливості на імплантат в ортопедично-травматологічній практиці в залежності від поставлених клінічних задач;

– проводити обстеження пацієнтів з підозрою на реакцію гіперчутливістю на метал (повний збір алергологічного анамнезу, даних загального аналізу крові, показники С-реактивного білка, показники прокальцитоніну та дослідження аспірату з суглобу на наявність клітин з диференціацією);

– застосовувати чотири великі та шість малих діагностичних критеріїв реакції гіперчутливості до металевих імплантатів у пацієнтів з підозрою на реакцію гіперчутливістю на метал;

– використовувати імпланти з гіпоалергенними компонентами при ревізійних оперативних втручаннях у пацієнтів з верифікованою гіперчутливістю на метал;

– рекомендувати проведення імуноферментного аналізу, а не алергічних проб, як більш специфічний аналізу з метою виявлення реакції на Ni-вмістний імплантат;

- використовувати МСР-1 як таргетний маркер в терапевтичній стратегії для завчасної діагностики у пацієнтів реакції гіперчутливості на Ni;
- використовувати в імуногістологічному дослідженні Віментин при підозрі на реакцію побічних місцевих тканинних реакцій (ALTR) та побічних реакцій на металеві уламки/дебрис (ARMD);
- використовувати в імуногістологічному дослідженні Veslin 1 для оцінки гістологічних явищ реакцій таки як: побічні місцеві тканинні реакції (ALTR) та побічні реакції на металеві уламки/дебрис (ARMD), як маркер аутофагії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lane WA. Some Remarks on the Treatment of Fractures. Br Med J. 1895; 1: 861-63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2509418/>.
2. King D. Metals and engineering in bone and joint surgery. Calif Med. 1959; 91: 303-04. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1577920/>.
3. Uthoff HK, Poitras P, Backman DS. Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. J Orthop Sci. 2006; 11: 118-26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2780616/>.
4. Disegi JA, Eschbach L. Stainless steel in bone surgery. Injury. 2000; 31: D2-D6/Availablefrom:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020138300800157>
5. Gore D, Frazer RQ, Kovarik RE, Yepes JE. Vitallium. Journal of Long-Term Effects of Medical Implants. 2005; 15: 673-86. Available from: <http://dl.begellhouse.com/journals/1bef42082d7a0fdf,56437700108bb47c,30e720956c6f2ac2.html>.
6. Abraham CM. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. Open Dent J. 2014; 8: 50-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4040928/>.
7. Greatbatch W, Holmes CF. History of implantable devices. IEEE Eng Med Biol Mag. 1991; 10: 38- 41.
8. Knight SR, Aujla R, Biswas SP. Total Hip Arthroplasty - over 100 years of operative history. Orthopedic Reviews. 2011; 3: e16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257425/>.
9. Joung Y-H. Development of Implantable Medical Devices: From an Engineering Perspective', Int Neurourol J. 2013; 17: 98-106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797898/>.

10. Saini M, Singh Y, Arora P, Arora V, Jain K. Implant biomaterials: A comprehensive review. *World J Clin Cases*. 2015; 3: 52-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4295219/>.

11. Khan W, Muntimadugu E, Jaffe M, Domb A. J. Implantable Medical Devices. in Abraham J. Domb, Wahid Khan (eds.). *Focal Controlled Drug Delivery* (Springer US: Boston, MA). 2014.

12. Matusiewicz H. New technology for in situ visualization, monitoring and controlling microwave chemical reaction progress using a focused microwave high pressure–temperature closed-vessel digestion system', *Analyst*. 2009; 134: 1490-97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/B901244C>

13. Matusiewicz H. Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles – A systematic analytical review. *Acta Biomaterialia*. 2014; 10: 2379-403 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706114000798>.

14. Akil S, Newman JM, Shah NV, Ahmed N, Deshmukh AJ, Maheshwari AV. Metal hypersensitivity in total hip and knee arthroplasty: Current concepts. *J Clin Orthop Trauma*. 2018;9(1):3-6. doi:10.1016/j.jcot.2017.10.003

15. Rajan TV. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*. 2003;24(7):376-379. doi:10.1016/s1471-4906(03)00142-x

16. Baumann CA, Crist BD, Nickel allergy to orthopaedic implants: A review and case series, *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2020.02.008>

17. Middleton S, Toms A. Allergy in total knee arthroplasty: a review of the facts. *Bone Joint J*. 2016;98-B(4):437-441. doi:10.1302/0301-620X.98B4.36767

18. Krenn V, Morawietz L, Perino G, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract*. 2014;210(12):779-786. doi:10.1016/j.prp.2014.09.017

19. Svedman C, Moller H, Gruvberger B, Gustavsson CG., Dahlin J, Persson L, Bruze M. Implants and contact allergy: are sensitizing metals released as haptens from coronary stents? *Contact Dermatitis*. 2014; 71: 92-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24720468>.

20. Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, Merk HF, Puddu P, Girolomoni G, Cavani A. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol*. 2000; 165: 3058-64 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975816>.

21. Kyriakides TR, Maclauchlan S. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. *J Cell Commun Signal*. 2009; 3: 215-2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844806>.

22. Sweetwyne MT, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGFbeta-dependent and independent mechanisms. *Matrix Biol*. 2012; 31: 178-86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266026>

23. Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF-beta1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018; 10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28432134>.

24. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM. Antiinflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis*. 2014; 17: 109-18 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24013945>.

25. Jha AK, Huang SC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 2015; 42: 419-30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786174>.

26. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000; 5: 40-6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147674>.

27. Wong VW, Crawford JD. Vasculogenic cytokines in wound healing. *Biomed Res Int.* 2013; 190486. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555076>.

28. Krafts KP. Tissue repair: The hidden drama. *Organogenesis.* 2010; 6: 225-33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220961>.

29. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* 1999; 18: 417-26. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601729>.

30. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr Res Transl Med.* 2016; 64: 171-77. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27939455>.

31. Zhang Y, Cao HJ, Graf B, Meekins H, Smith TJ, Phipps RP. CD40 engagement upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J Immunol.* 1998; 160: 1053-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570516>.

32. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453: 314-21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18480812>.

33. Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth ID, Case CP. An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87: 18-27. Available from: <https://doi.org/10.2106/JBJS.C.00949>.

34. Willert H G, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, et al.. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am.* 2005; 87: 28-36 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637030>.

35. Campbell P, Ebramzadeh E, Nelson S, Takamura K, De Smet K, Amstutz H. C. Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips. *Clin Orthop*

Relat Res. 2010; 468: 2321-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458645>.

36. Christo SN, Diener KR, Bachhuka A, Vasilev K, Hayball JD. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes', *Biomed Res Int*, 2015; 34: 2304. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247017>.

37. Major MR, Wong VW, Nelson ER, Longaker MT, Gurtner GC. The foreign body response: at the interface of surgery and bioengineering. *Plast Reconstr Surg*. 2015; 135: 1489-98. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25919260>

38. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign Body Reaction to Biomaterials. *Seminars in immunology*. 2008; 20: 86-100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2327202/>.

39. Moore LB, Kyriakides TR. Molecular Characterization of Macrophage-Biomaterial Interactions. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 865: 109-22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26306446>.

40. Gibon E, Amanatullah DF, Loi F, Pajarinen J, Nabeshima A, Yao Z, et al.. 'The biological response to orthopaedic implants for joint replacement. Part I. Metals. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017; 105: 2162-73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27328111>.

41. Klopfleisch R, Jung F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials', *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105: 927-40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27813288>.

42. Goodman SB, Konttinen YT, Takagi M. Joint replacement surgery and the innate immune system. *J Long Term Eff Med Implants*. 2014; 24: 253-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747028>.

43. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem*. 2014; 289: 35237-45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25391648>.

44. Rider P, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN, Cohen I. Alarmins: Feel the Stress. *J Immunol.* 2017. 198: 1395-402 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28167650>.

45. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica *Science.* 2008; 320: 674-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403674>.

46. St Pierre CA, Chan M, Iwakura Y, Ayers DC, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wearparticles. *J Orthop Res.* 2010; 28: 1418-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872576>

47. Burton L, Paget D, Binder NB., Bohnert K, Nestor BJ, Sculco TP, Santambrogio L, Ross FP, Goldring SR, Purdue PE. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation. *J Orthop Res.* 2013; 31: 73-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933241>.

48. Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: a novel mechanism for implant debris reactivity. *J Orthop Res.* 2009; 27: 847- 54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105226>.

49. Cobelli N, Scharf B, Crisi GM, Hardin J, Santambrogio L. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 7: 600-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21894210>.

50. Konttinen YT, Pajarinen J, Takakubo Y, Gallo J, Nich C, Takagi M, Goodman, S. B. Macrophage polarization and activation in response to implant debris: influence by "particle disease" and "ion disease". *J Long Term Eff Med Implants.* 2014; 24: 267-81 http://www.dl.begellhouse.com/download/article/5ef89af34a38a925/JLT_11355_b.pdf

51. Reddy A, Caicedo MS, Samelko L, Jacobs JJ, Hallab NJ. Implant debris particle size affects serum protein adsorption which may contribute to particle size-based

bioreactivity differences. *J Long Term Eff Med Implants*. 2014; 24: 77-88. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24941408>.

52. Scharf B, Clement CC, Zolla V, Perino G, Yan B, Elci SG, et al. Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity. *Scientific Reports*. 2014; 4: 5729. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103093/>.

53. Schmidt M, Raghavan B, Muller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, et al. Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol*. 2010. 11: 814-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711192>.

54. Raghavan B, Martin SF, Esser PR, Goebeler M, Schmidt, M.. Metal allergens nickel and cobalt facilitate TLR4 homodimerization independently of MD2. *EMBO Rep*. 2012;13: 1109-15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23059983>.

55. Potnis P A, Dutta DK, Wood SC. Toll-like receptor 4 signaling pathway mediates proinflammatory immune response to cobalt-alloy particles. *Cell Immunol*. 2013; 282: 53-65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680697>.

56. Tyson-Capper AJ, Lawrence H, Holland JP, Deehan DJ, Kirby JA.. 'Metal-on-metal hips: cobalt can induce an endotoxin-like response. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2013; 72: 460- 61. Available from: <http://ard.bmj.com/content/annrheumdis/72/3/460.full.pdf>.

57. Lawrence H, Deehan D, Holland J, Kirby J, Tyson-Capper A. The immunobiology of cobalt: demonstration of a potential aetiology for inflammatory pseudotumours after metal-onmetal replacement of the hip. *Bone Joint J*. 2014; 96-B: 1172-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183586>.

58. Lawrence H, Deehan DJ, Holland JP, Anjum S A, Mawdesley AE, Kirby JA, Tyson-Capper AJ. Cobalt ions recruit inflammatory cells in vitro through human Toll-like receptor 4. *Biochem Biophys Rep*. 2016; 7: 374-78. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28955928>.

59. Samelko L, Landgraerber S, McAllister K, Jacobs J, Hallab N. J. Cobalt Alloy Implant Debris Induces Inflammation and Bone Loss Primarily through Danger Signaling, Not TLR4 Activation: Implications for DAMP-ening Implant Related Inflammation. *PLoS One*. 2016; 11: e0160141. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27467577>

60. Kzhyshkowska J, Gudima A, Riabov V, Dollinger C, Lavallo P, Vrana NE.. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine. *J Leukoc Biol*. 2015; 98: 953-62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168797>.

61. Peters K, Unger RE, Barth S, Gerdes T, Kirkpatrick CJ. Induction of apoptosis in human microvascular endothelial cells by divalent cobalt ions. Evidence for integrin-mediated signaling via the cytoskeleton', *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12: 955-8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348347>.

62. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Antoniou J, Huk OL. TNF-alpha secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials*. 2003; 24: 383-91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423593>.

63. Huk OL, Catelas I, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Petit, A. Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *The Journal of Arthroplasty*. 2004;19: 84-87. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883540304005108>.

64. Caicedo M, Jacobs JJ, Reddy A, Hallab NJ. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 86: 905-13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050301>.

65. Gill HS, Grammatopoulos G, Adshead S, Tsiologiannis E, Tsiridis E.. Molecular and immune toxicity of CoCr nanoparticles in MoM hip arthroplasty. *Trends Mol Med*. 2012; 18: 145-55. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.12.002>.

66. Posada. OM, Gilmour D, Tate RJ, Grant MH. CoCr wear particles generated from CoCr alloy metal-on-metal hip replacements, and cobalt ions stimulate apoptosis and expression of general toxicology-related genes in monocyte-like U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014; 281: 125-35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X14003494>.

67. VanOs, R, Lildhar LL, Lehoux EA, Beaulé PE, Catelas I. In vitro macrophage response to nanometer-size chromium oxide particles. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014; 102: 149-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997019>

68. Posada OM, Tate RJ, Grant MH. Toxicity of cobalt-chromium nanoparticles released from a resurfacing hip implant and cobalt ions on primary human lymphocytes in vitro', *J Appl Toxicol*. 2015; 35: 614-22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25612073>.

69. Rosario F, Hoet P, Santos C, Oliveira H. Death and cell cycle progression are differently conditioned by the AgNP size in osteoblast-like cells. *Toxicology*. 2016; 368-369: 103-15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27590928>.

70. Grammatopoulos G, Munemoto M, Inagaki Y, Tanaka Y, Athanasou NA. The Diagnosis of Infection in Metal-on-Metal Hip Arthroplasties. *J Arthroplasty*. 2016; 31: 2569-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27235328>.

71. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013; 229: 176-85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23096265>.

72. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016; 44: 450-62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26982353>.

73. Mahendra G, Pandit H, Kliskey K, Murray D, Gill HS, Athanasou N. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. *Acta Orthopaedica*. 2009; 80: 653-59. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/17453670903473016>

74. Paukkeri EL, Korhonen R, Hamalainen M, Pesu M, Eskelinen A, Moilanen T, Moilanen E.. The Inflammatory Phenotype in Failed Metal-On-Metal Hip Arthroplasty Correlates with Blood Metal Concentrations. PLoS One. 2016; 11: e0155121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27227536>.

75. Steinbeck MJ, Jablonowski LJ, Parvizi J, Freeman TA. The role of oxidative stress in aseptic loosening of total hip arthroplasties. J Arthroplasty. 2014; 29: 843-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290740>

76. Kzhyshkowska J, Gudima A, Riabov V, Dollinger C, Lavallo P, Vrana NE.. Macrophage responses to implants: prospects for personalized medicine', J Leukoc Biol. 2015; 98: 953-62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168797>.

77. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris', Bull NYU Hosp Jt Dis. 2009; 67: 182-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19583551>.

78. Hallab NJ, Jacobs JJ. Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris. Front Endocrinol (Lausanne). 2017; 8: 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28154552>.

79. Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, et al. Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements', J Biomed Mater Res A. 2013; 101: 3033-45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568608>.

80. Nich C, Goodman SB. Role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements. J Long Term Eff Med Implants. 2014; 24: 259-65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747029>.

81. Athanasou NA. The pathobiology and pathology of aseptic implant. Bone Joint Res. 2016; 5: 162-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27146314>.

82. Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B. In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles', J Bone Joint Surg Br. 1995; 77: 962-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7593115>.

83. Akbar M, Fraser AR, Graham GJ, Brewer JM, Grant MH. Acute inflammatory response to cobalt chromium orthopaedic wear debris in a rodent air-pouch model. *J R Soc Interface*. 2012; 9: 2109-19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513721>.
84. Liu J, Harberts E, Tammaro A, Girardi N, Filler RB, Fischelevich R.. IL-9 regulates allergen-specific Th1 responses in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol*. 2014; 134: 1903-11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487305>.
85. Jhunjhunwala S, Aresta-DaSilva S, Tang K, Alvarez D, Webber MJ, Tang BC. Neutrophil Responses to Sterile Implant Materials. *PLoS One*. 2015; 10: e0137550 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355958>.
86. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017; 23: 279-87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28267716>.
87. Sutherland K, Mahoney JR, Coury A J, Eaton JW. Degradation of biomaterials by phagocyte-derived oxidants. *J Clin Invest*. 1993; 92: 2360-7. Available from: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8227352>.
88. Labow RS, Meek E, Santerre JP. Neutrophil-mediated biodegradation of medical implant materials. *J Cell Physiol*. 2001; 186: 95-103. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11147818>.
89. Goncalves DM, Chiasson S, Girard D. Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles', *Toxicol In Vitro*. 2010; 24: 1002-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.007>.
90. Ye Q, Harmsen MC, van Luyn MJ, Bank RA. The relationship between collagen scaffold cross-linking agents and neutrophils in the foreign body reaction. *Biomaterials*. 2010; 31: 9192-201. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20828809>.
91. Tang L, Jennings TA, Eaton JW. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 8841-6. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8841>.

92. Zdolsek J, Eaton JW, Tang L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *J Transl Med.* 2007; 5: 31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1929055/>.

93. Thewes M, Kretschmer R, Gfesser M, Rakoski J, Nerlich M, Borelli S.. 'Immunohistochemical characterization of the perivascular infiltrate cells in tissues adjacent to stainless steel implants compared with titanium implants', *Arch Orthop Trauma Surg.* 2001. 121: 223-6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11317685>.

94. Keselowsky BG, Lewis JS. Dendritic cells in the host response to implanted materials', *Semin Immunol.* 2017; 29: 33-40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28487131>.

95. Voggenreiter G, Leiting S, Brauer H, Leiting P, Majetschak M, Bardenheuer M, Obertacke U. Immuno-inflammatory tissue reaction to stainless-steel and titanium plates used for internal fixation of long bones. *Biomaterials.*, 2003; 24: 247-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419625>.

96. Krenn V, Morawietz L, Perino G, Kienapfel H, Ascherl R, Hassenpflug GJ, et al. Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology. *Pathol Res Pract.* 2014; 210: 779-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25454771>.

97. Perino G, Sunitsch S, Huber M, Ramirez D, Gallo J, Vaculova J. Diagnostic guidelines for the histological particle algorithm in the periprosthetic neo-synovial tissue. *BMC Clin Pathol.* 2018; 18: 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30158837>.

98. Hallab NJ, Caicedo M, Finnegan A, JacobsJJ. Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Surg Res.* 2008; 3: 6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18271968>.

99. Hasegawa M, Iino T, Sudo A. Immune response in adverse reactions to metal debris following metal-on-metal total hip arthroplasty. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016; 17: 221. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1069-9>.

100. Mittal S, Revell M, Barone F, Hardie DL., Matharu GS, Davenport AJ et al.. Lymphoid Aggregates That Resemble Tertiary Lymphoid Organs Define a Specific Pathological Subset in Metal-on-Metal Hip Replacements. *PLOS ONE*. 2013; 8: e63470. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063470>.

101. Campbell P, Ebrahimzadeh E, Nelson S, Takamura K, De Smet K, Amstutz H. C. Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips. *Clin Orthop Relat Res*. 2010; 468: 2321-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458645>.

102. Zug KA, Warshaw EM, Fowler JF, Jr. Maibach HI, Belsito DL, Pratt MD. et al. Patchtest results of the North American Contact Dermatitis Group 2005-2006.

103. *Dermatitis*. 2009; 20: 149-60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19470301>.

104. Granchi D, Cenni E, Trisolino G, Giunti A, Baldini N. Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006; 77: 257-64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265661>.

105. Thyssen JP, Johansen JD, Menne T, Liden C, Bruze M, White IR. Hypersensitivity reactions from metallic implants: a future challenge that needs to be addressed. *Br J Dermatol*. 2010; 162: 235-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374245>.

106. Granchi D, Cenni E, Giunti A, Baldini N.. 'Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review. *J Bone Joint Surg Br*. 2012; 94: 1126-34. Available from: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/94-B/8/1126.long>.

107. Wawrzynski J, Gil JA, Goodman AD, Waryasz GR. Hypersensitivity to Orthopedic Implants: A Review of the Literature. *Rheumatol Ther*. 2017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364382>.

108. Lu L, Vollmer J, Moulon C, Weltzien HU, Marrack P, Kappler J. Components of the ligand for a Ni⁺⁺ reactive human T cell clone. *J Exp Med*. 2003; 197: 567-74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615898>.

109. Clayton GM, Wang Y, Crawford F, Novikov A, Wimberly BT, Kieft JS, et al. Structural basis of chronic beryllium disease: linking allergic hypersensitivity and autoimmunity. *Cell*. 2014; 158: 132-42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24995984>.

110. Moulon C, Vollmer J, Weltzien HU. Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 3308-15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566016>.

111. Gamerding K, Moulon C, Karp DR, Van Bergen J, Koning F, Wild D. A new type of metal recognition by human T cells: contact residues for peptide-independent bridging of T cell receptor and major histocompatibility complex by nickel. *J Exp Med*. 2003;197: 1345-53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12756270>.

112. Catelas I, Lehoux EA, Hurda I, Baskey SJ, Gala L, Foster R.. Do patients with a failed metal-on-metal hip implant with a pseudotumor present differences in their peripheral blood lymphocyte subpopulations?. *Clin Orthop Relat Res*. 2015; 473: 3903-14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/26324830/>.

113. Mahendra G, Pandit H, Kliskey K, Murray D, Gill HS, Athanasou N. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. *Acta Orthopaedica*. 2009; 80: 653-59. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/17453670903473016>.

114. Kwon YM, Thomas P, Summer B, Pandit H, Taylor A, Beard D, et al.. Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-

metal hip resurfacing arthroplasty. *J Orthop Res.* 2010; 28: 444-50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834954>.

115. Paukkeri EL, Korhonen R, Hamalainen M, Pesu M, Eskelinen A, Moilanen T., Mo et al.. The Inflammatory Phenotype in Failed Metal-On-Metal Hip Arthroplasty Correlates with Blood Metal Concentrations. *PLoS One.* 2016; 11: e0155121. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27227536>

116. Savarino L, Ciapetti G, Cenni E, Rotini R, Mieti M, Baldini N. Immunological changes in patients with primary osteoarthritis of the hip after total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br.* 2003; 85: 758-64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892206>.

117. Penny JO, Varmarken JE, Ovesen O, Nielsen C, Overgaard S. Metal ion levels and lymphocyte counts: ASR hip resurfacing prosthesis vs. standard THA: 2-year results from a randomized study. *Acta Orthop.* 2013; 84: 130-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3639332/pdf/ORT-84-130.pdf>.

118. Budinger L, and Hertl M. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy.* 2000; 55: 108-15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10726725>.

119. Whittingham-Jones PM, Dunstan E, Altaf H, Cannon SR, Revell PA, Briggs T. W. Immune responses in patients with metal-on-metal hip articulations: a long-term follow-up. *J Arthroplasty.* 2008; 23: 1212-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arth.2007.10.015>.

120. Hallab NJ, Caicedo M, Epstein R, McAllister K, Jacobs JJ. In vitro reactivity to implant metals demonstrates a person-dependent association with both T-cell and B-cell activation. *J Biomed Mater Res A.* 2010a.; 92: 667-82. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19235773>.

121. Dapunt U, Giese T, Lasitschka F, Reinders J, Lehner B, Kretzer JP et al. On the inflammatory response in metal-on-metal implants. *J Transl Med.* 2014; 12: 74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24650243>.

122. Hailer NP, Bengtsson M, Lundberg C, Milbrink J.. High metal ion levels after use of the ASR device correlate with development of pseudotumors and T cell activation. Clin Orthop Relat Res. 2014; 472: 953-61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24081666>.

123. Revell PA, Matharu GS, Mittal S, Pynsent PB, Buckley CD, Revell MP. Increased expression of inducible co-stimulator on CD4+ T-cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with failed hip arthroplasties. Bone & Joint Research. 2016; 5: 52-60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4852791/>.

124. Markel DC, Bergum C, Flynn J, Jackson N, Bou-Akl T, Ren W. Relationship of Blood Metal Ion Levels and Leukocyte Profiles in Patients With Articular Surface Replacement Metalon-Metal Hip Replacement. Orthopedics. 2018; 41: e424-e31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29708567>

125. Schierano G, Bellone G, Cassarino E, Pagano M, Preti G, Emanuelli G. Transforming growth factor-beta and interleukin 10 in oral implant sites in humans. J Dent Res. 2003; 82: 428-32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766193>.

126. Summer B, Paul C, Mazoochian F, Rau C, Thomsen M, Banke I. Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni. Contact Dermatitis. 2010; 63: 15-22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597929>.

127. Hallab NJ, Caicedo M, McAllister K, Skipor A, Amstutz H, Jacobs JJ. Asymptomatic prospective and retrospective cohorts with metal-on-metal hip arthroplasty indicate acquired lymphocyte reactivity varies with metal ion levels on a group basis. J Orthop Res. 2013; 31: 173-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941579>.

128. Vermes C, Kuzsner J, Bardos T, Than P. Prospective analysis of human leukocyte functional tests reveals metal sensitivity in patients with hip implant. J Orthop

Surg Res. 2013; 8: 12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674931/pdf/1749-799X-8-12.pdf>.

129. Perino G, Ricciardi BF, Jerabek SA, Martignoni G, Wilner G, Maass D, Implant based differences in adverse local tissue reaction in failed total hip arthroplasties: a morphological and immunohistochemical study. BMC Clin Pathol. 2014; 14: 39. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242891>.

130. Singh G, Nuechtern JV, Meyer H, Fiedler GM, Awiszus F, Junk-Jantsch S et al.. Particle characterisation and cytokine expression in failed small diameter metal-on-metal total hip arthroplasties. Bone Joint J. 2015; 97-B: 917-23. Available from: <https://doi.org/10.1302/0301-620X.97B7.35163>

131. Nosbaum A, Prevel N, Truong HA, Mehta P, Ettinger M, Scharschmidt TC Ali, et al. Cutting Edge: Regulatory T Cells Facilitate Cutaneous Wound Healing. J Immunol. 2016;196: 2010-4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826250>.

132. Samelko L, Caicedo MS, Jacobs J, Hallab NJ. Transition from metal-DTH resistance to susceptibility is facilitated by NLRP3 inflammasome signaling induced Th17 reactivity: Implications for orthopedic implants. PLoS One. 2019; 14: e0210336. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30653583>.

133. Roelofs-Haarhuis K, Wu X, Nowak M, Fang M, Artik S, Gleichmann E.. Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. J Immunol. 2003; 171: 2863-72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960308>.

134. Mishra PK, Wu W, Rozo C, Hallab NJ, Benevenia J, Gause WC. Micrometer-sized titanium particles can induce potent Th2-type responses through TLR4-independent pathways. J Immunol. 2011; 187: 6491-8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22095717>.

135. Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Kondo T, Kurosawa M, Kudo Y et al.. A critical role for thymic stromal lymphopoietin in nickel-induced allergy in mice', J

Immunol. 2014; 192: 4025-31. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670797>.

136. Du Z, Wang S, Yue B, Wang Y, Wang Y. Effects of wear particles of polyether-etherketone and cobalt-chromium-molybdenum on CD4- and CD8-T-cell responses. *Oncotarget*. 2018; 9: 11197-208. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541407>.

137. Granchi D, Ciapetti G, Stea S, Cavedagna D, Bettini N, Bianco T, Fontanesi G. Evaluation of several immunological parameters in patients with aseptic loosening of hip arthroplasty. *Chir Organi Mov*. 1995; 80: 399-408. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706547>.

138. Hart AJ, Skinner JA, Winship P, Faria N, Kulinskaya E, Webster D, et al.. Circulating levels of cobalt and chromium from metalon-metal hip replacement are associated with CD8+ T-cell lymphopenia. *J Bone Joint Surg Br*. 2009; 91: 835-42.

139. Hailer NP, Blaheta RA, Dahlstrand H, Stark A. Elevation of circulating HLA DR+ CD8+ Tcells and correlation with chromium and cobalt concentrations 6 years after metal-on-metal hip arthroplasty. *Acta Orthopaedica*. 2011; 82: 6-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/17453674.2010.548028>.

140. Hallab NJ, Caicedo M, Epstein R, McAllister K, Jacobs JJ. In vitro Reactivity to Implant Metals Demonstrates a Person Dependent Association with both T-Cell and B-Cell Activation. *J Biomed Mater Res A*. 2010b; 92: 667-82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797558/>.

141. Singleton H, Popple A, Gellatly N, Maxwell G, Williams J, Friedmann PS, Anti-hapten antibodies in response to skin sensitization. *Contact Dermatitis*. 2016; 74: 197-204. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26560413>.

142. Yang J, Merritt K. Detection of antibodies against corrosion products in patients after Co-Cr total joint replacements. *J Biomed Mater Res*. 1994; 28: 1249-58. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7829554>.

143. Merritt K, Rodrigo JJ. Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants. *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 71-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620661>.

144. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000; 289: 1504-8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10968780>.

145. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* 2014; 41: 21-35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25035951>.

146. Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol.* 2018; 149: 325-41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29392395>.

147. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000. 113 (Pt 3): 377-81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10639325>.

148. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* 1999; 20: 345-57. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10368775>.

149. Cadosch D, Gautschi OP, Brockamp T, Zellweger R. Osteopetrosis--a challenge for the orthopaedic surgeon. *S Afr J Surg.* 2009; 47: 131-3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20141071>.

150. Park-Min KH. Mechanisms involved in normal and pathological osteoclastogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:2519-28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29670999>.

151. Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity. *Life Sci.* 1999; 65: 1087-102. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503925>.

152. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Simmen HP, Filgueira L. Bio-corrosion of stainless steel by osteoclasts--in vitro evidence. *J Orthop Res.* 2009; 27: 841-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105228>.

153. Cadosch D, Al-Mushaiqri MS, Gautschi OP, Meagher J, Simmen HP, Filgueira L.. Biocorrosion and uptake of titanium by human osteoclasts. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95: 1004-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20872748>.

154. Cadosch D, Gautschi OP, Chan E, Simmen HP, Filgueira L. Titanium induced production of chemokines CCL17/TARC and CCL22/MDC in human osteoclasts and osteoblasts. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 92: 475-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19205012>.

155. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA.. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface.* 2008; 5: 1137-58. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0151>.

156. Brinkmann J, Hefti T, Schlottig F, Spencer ND, Hall H. Response of osteoclasts to titanium surfaces with increasing surface roughness: an in vitro study. *Biointerphases.* 2012; 7: 34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639093>.

157. Pasold J, Markhoff J, Tillmann J, Krogull M, Pisowocki P, Bader R.. Direct influence of titanium and zirconia particles on the morphology and functionality of mature human osteoclasts. *J Biomed Mater Res A.* 2017; 105: 2608-15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28544592>.

158. Lotz EM, Berger MB, Schwartz Z, Boyan BD.. Regulation of osteoclasts by osteoblast lineage cells depends on titanium implant surface properties. *Acta Biomater.* 2018; 68: 296-307. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292169>.

159. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Meagher J, Zellweger R, Filgueira L. Titanium IV ions induced human osteoclast differentiation and enhanced bone resorption in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2009; 91: 29-36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683234>.

160. Konig MA, Gautschi OP, Simmen HP, Filgueira L, Cadosch D.. 'Influence of Vanadium 4+ and 5+ Ions on the Differentiation and Activation of Human Osteoclasts. *Int J Biomater.* 2017; 9439036. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28947903>.

161. Rousselle AV, Heymann D, Demais V, Charrier C, Passuti N, Basle MF.. Influence of metal ion solutions on rabbit osteoclast activities in vitro. *Histol Histopathol.* 2002; 17: 1025-32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12371129>.

162. Bernhardt A, Schamel M, Gbureck U, Gelinsky M.. Osteoclastic differentiation and resorption is modulated by bioactive metal ions Co^{2+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} incorporated into calcium phosphate bone cements. *PLoS One.* 2017; 12: e0182109. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28763481>.

163. Sul OJ, Kim JC, Kyung TW, Kim HJ, Kim YY, Kim SH, et al.. Gold nanoparticles inhibited the receptor activator of nuclear factor-kappa ligand (RANKL)-induced osteoclast formation by acting as an antioxidant. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74: 2209-13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071867>.

164. Park KH, Park B, Yoon DS, Kwon SH, Shin DM, Lee JW, Lee HG, Shim, J. H., Park, J. H., and Lee, J. M. et al.. Zinc inhibits osteoclast differentiation by suppression of Ca^{2+} -Calcineurin/NFATc1 signaling pathway. *Cell Commun Signal.* 2013; 11: 74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088289>.

165. Lee YE, Park KS, Park EK, Im SU, Choi YH, Song KB.. Polycan suppresses osteoclast differentiation and titanium particle-induced osteolysis in mice. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2016; 104: 1170-5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26097144>.

166. Hu X, Wang Z, Shi J, Guo X, Wang L, Ping Z, et al.. Lithium chloride inhibits titanium particle-induced osteoclastogenesis by inhibiting the NFkappaB pathway. *Oncotarget.* 2017; 8: 83949-61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29137395>.

167. Zhu L, Kang H, Guo CA, Fan WS, Wang YM, Deng LF. et al. Rifampin suppresses osteoclastogenesis and titanium particle-induced osteolysis via modulating RANKL signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 484: 64-70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108285>.

168. Cordoba A, Manzanaro-Moreno N, Colom C, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Monjo M. Quercitrin Nanocoated Implant Surfaces Reduce Osteoclast Activity In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci.* 2018; 19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30366383>.

169. Dong L, Wang R, Zhu YA, Wang C, Diao H, Zhang C, et al.. Antisense oligonucleotide targeting TNF-alpha can suppress Co-Cr-Mo particle-induced osteolysis. *J Orthop Res.* 2008; 26: 1114-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18327794>.

170. Eger M, Hiram-Bab S, Liron T, Sterer N, Carmi Y, Kohavi D. Mechanism and Prevention of Titanium Particle-Induced Inflammation and Osteolysis. *Front Immunol.* 2018; 9: 2963. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30619321>.

171. Magone K, Luckenbill D, Goswami T.. Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2015;135: 683-95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25795427>.

172. Looney RJ, Schwarz EM, Boyd A, O'Keefe RJ.. Periprosthetic osteolysis: an immunologist's update. *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18: 80-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16344623>.

173. Ricciardi BF, Nocon A A, Jerabek SA, Wilner G, Kaplowitz E, Goldring SR et al. Histopathological characterization of corrosion product associated adverse local tissue reaction in hip implants: a study of 285 cases. *BMC clinical pathology.* 2016; 16: 3. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12907-016-0025-9>.

174. Nawabi DH, Gold S, Lyman S, Fields K, Padgett D E, Potter H G. MRI predicts ALVAL and tissue damage in metal-on-metal hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2014; 472: 471-81. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11999-013-2788-y>.

175. Willert HG, Semlitsch M.. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1977; 11: 157-64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/140168>.

176. Reito A, Lainiala O, Elo P, Eskelinen A. Prevalence of Failure due to Adverse Reaction to Metal Debris in Modern, Medium and Large Diameter Metal-on-Metal Hip Replacements--The Effect of Novel Screening Methods: Systematic Review and Metaregression Analysis. *PLoS One.* 2016; 11: e0147872./ Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26930057>.

177. Langton DJ, Joyce TJ, Jameson SS, Lord J, Van Orsouw M, Holland JP. Et al.. Adverse reaction to metal debris following hip resurfacing: the influence of component type, orientation and volumetric wear. *J Bone Joint Surg Br.* 2011; 93: 164-71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282753>.

178. Natu S, Sidaginamale RP, Gandhi J, Langton DJ, Nargol AV. Adverse reactions to metal debris: histopathological features of periprosthetic soft tissue reactions seen in association with failed metal on metal hip arthroplasties. *J Clin Pathol.* 2012;65: 409-18. Available from: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200398>.

179. Bitar D, Parvizi J.. Biological response to prosthetic debris. *World J Orthop.* 2015; 6: 172-89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793158>.

180. Lainiala O, Elo P, Reito A, Pajamaki, J, Puolakka T, Eskelinen A.. Comparison of extracapsular pseudotumors seen in magnetic resonance imaging and in revision surgery of 167 failed metal-on-metal hip replacements. *Acta Orthop.* 2014; 85: 474-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4164864/pdf/ORT-85-474.pdf>.

181. Plummer DR, Berger RA, Paprosky WG, Sporer SM, Jacobs JJ, Della Valle C. J.. Diagnosis and Management of Adverse Local Tissue Reactions Secondary to Corrosion at the Head-Neck Junction in Patients With Metal on Polyethylene Bearings. *J Arthroplasty.* 2016; 31: 264-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26321628>.

182. Campbell PA, Kung MS, Hsu AR, Jacobs JJ.. Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions?. *Clin Orthop Relat Res.* 2014; 472: 3718-27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397772/pdf/11999_2014_Article_3893.pdf.

183. Wawrzynski J, Gil JA, Goodman AD, Waryasz GR. Hypersensitivity to Orthopedic Implants: A Review of the Literature. *Rheumatol Ther.* 2017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28364382>.

184. Teo Wendy ZW, Schalock PC.. Hypersensitivity Reactions to Implanted Metal Devices: Facts and Fictions. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2016; 26: 279-94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27763855>.

185. Middleton S, Toms A. Allergy in total knee arthroplasty. 2016; 98-B: 437-41. Available from: <https://online.boneandjoint.org.uk/doi/abs/10.1302/0301-620X.98B4.36767>.

186. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2009; 67: 182-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19583551>.

187. Verma SK, Tobis JM. Explantation of patent foramen ovale closure devices: a multicenter survey. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011;4: 579-85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2011.01.009>.

188. Zurawin RK, Zurawin JL.. Adverse events due to suspected nickel hypersensitivity in patients with essure micro-inserts. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011; 18: 475-82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmig.2011.04.009>.

189. Morshedi MM, Kinney TB.. Nickel hypersensitivity in patients with inferior vena cava filters: case report and literature and MAUDE database review. *J Vasc Interv Radiol.* 2014; 25: 1187-91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2014.04.017>.

190. Cheung AC, Banerjee S, Cherian JJ, Wong F, Butany J, Gilbert C et al.. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 1 -

history, mechanism, measurements, and pathophysiology. *Bone Joint J.* 2016; 98-B: 6-13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733509>.

191. Zywiol MG, Cherian JJ, Banerjee S, Cheung AC, Wong F, Butany J, et al.. Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties: review of a rare condition Part 2. measurement, risk factors, and step-wise approach to treatment. *Bone Joint J.* 2016; 98-B: 14-20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26733510>.

192. Faschingbauer M., Renner L., Boettner F. Allergy in Total Knee Replacement. Does It Exist?: Review Article. *HSS J.* 2017;13(1):12-19. doi:10.1007/s11420-016-9514-8

193. Mitchelson AJ, Wilson CJ, Mihalko WM, et al. Biomaterial hypersensitivity: is it real? Supportive evidence and approach considerations for metal allergic patients following total knee arthroplasty. *Biomed Res Int.* 2015;137287. doi:10.1155/2015/137287

194. Thomsen M, Krenn V, Thomas P. Adverse Reaktionen gegenüber orthopädisch-chirurgischen Metallimplantaten nach Kniegelenkersatz [Adverse reactions to metal orthopedic implants after knee arthroplasty]. *Hautarzt.* 2016;67(5):347-351. doi:10.1007/s00105-016-3793-3

195. Schäfer T, Böhler E, Ruhdorfer S, et al. Epidemiology of contact allergy in adults [published correction appears in *Allergy* 2002 Feb;57(2):178]. *Allergy.* 2001;56(12):1192-1196. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00086.x

196. Van der Merwe JM. Metal Hypersensitivity in Joint Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev.* 2021;5(3):e20.00200. Published 2021 Mar 12. doi:10.5435/JAAOSGlobal-D-20-00200

197. Haddad SF, Helm MM, Meath B, Adams C, Packianathan N, Uhl R. Exploring the Incidence, Implications, and Relevance of Metal Allergy to Orthopaedic Surgeons. *J Am Acad Orthop Surg Glob Res Rev.* 2019;3(4):e023. Published 2019 Apr 5. doi:10.5435/JAAOSGlobal-D-19-00023

198. Thyssen JP, Linneberg A, Menné T, Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2007;57(5):287-299. doi:10.1111/j.1600-0536.2007.01220.x

199. Niki Y, Matsumoto H, Otani T, et al. Screening for symptomatic metal sensitivity: a prospective study of 92 patients undergoing total knee arthroplasty. *Biomaterials*. 2005;26(9):1019-1026. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.03.038

200. Atanaskova Mesinkovska N, Tellez A, Molina L, et al. The effect of patch testing on surgical practices and outcomes in orthopedic patients with metal implants. *Arch Dermatol*. 2012;148(6):687-693. doi:10.1001/archdermatol.2011.2561

201. Hartmann A, Hannemann F, Lützner J, Seidler A, Drexler H, Günther KP, Schmitt J. Metal ion concentrations in body fluids after implantation of hip replacements with metal-on-metal bearing--systematic review of clinical and epidemiological studies. *PLoS One*. 2013; 8: e70359. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737219/pdf/pone.0070359.pdf>.

202. Gessner BD, Steck T, Woelber E, Tower SS. A Systematic Review of Systemic Cobaltism After Wear or Corrosion of Chrome-Cobalt Hip Implants. *J Patient Saf* 2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076080>.

203. Hannemann F, Hartmann A, Schmitt J, Lützner J, Seidler A, Campbell P, et al.. European multidisciplinary consensus statement on the use and monitoring of metal-on-metal bearings for total hip replacement and hip resurfacing. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2013;99: 263-71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2013.01.005>.

204. Fehring KA, Fehring TK. Modes of failure in metal-on-metal total hip arthroplasty. *Orthop Clin North Am*. 2015; 46: 185-92. Available from: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0030-5898\(14\)00191-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0030-5898(14)00191-6).

205. Weiser MC, Lavernia CJ.. Trunnionosis in Total Hip Arthroplasty. 2017; 99: 1489-501. Available from: https://journals.lww.com/jbjsjournal/Fulltext/2017/09060/Trunnionosis_in_Total_Hip_Arthroplasty.10.aspx.

206. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE.. Systemic toxicity related to metal hip prostheses', *Clin Toxicol (Phila)*. 2014; 52: 837-47. <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/15563650.2014.944977>.

207. Pahuta M, Smolders JM, van Susante JL, Peck J, Kim PR, Beaulé PE.. Blood metal ion levels are not a useful test for adverse reactions to metal debris: A systematic review and meta-analysis. *Bone Joint Res*. 2016; 5: 379-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27612918>.

208. Paukkeri E-L, Korhonen R, Hämäläinen M, Pesu M, Eskelinen A, Moilanen T., Moilanen E.. The Inflammatory Phenotype in Failed Metal-On-Metal Hip Arthroplasty Correlates with Blood Metal Concentrations. *PLOS ONE*. 2016;11: e0155121. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0155121>.

209. Drake LA, Dorner W, Goltz RW, et al. Guidelines of care for contact dermatitis. Committee on Guidelines of Care. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(1):109-113. doi:10.1016/0190-9622(95)90194-9

210. Schalock PC, Crawford G, Nedorost S, Scheinman PL, Atwater AR, Mowad C, et al.. Patch Testing for Evaluation of Hypersensitivity to Implanted Metal Devices: A Perspective From the American Contact Dermatitis Society. *Dermatitis*. 2016; 27: 241-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649347>.

211. Teo WZW, Schalock PC.. Metal Hypersensitivity Reactions to Orthopedic Implants. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2017; 7: 53-64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27995484>.

212. Bao W, He Y, Fan Y, Liao Y. Metal allergy in total-joint arthroplasty: Case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(38):e12475. doi:10.1097/MD.00000000000012475

213. Hallab NJ, Caicedo M, Finnegan A, Jacobs JJ. Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Surg Res*. 2008;3:6. Published 2008 Feb 13. doi:10.1186/1749-799X-3-6

214. Cederbrant K, Hultman P, Marcusson JA, Tibbling L. In vitro lymphocyte proliferation as compared to patch test using gold, palladium and nickel. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;112(3):212-217. doi:10.1159/000237456

215. Granchi D, Cenni E, Giunti A, Baldini N. Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review. *J Bone Joint Surg Br.* 2012;94(8):1126-1134. doi:10.1302/0301-620X.94B8.28135

216. Lachiewicz PF, Watters TS, Jacobs JJ. Metal Hypersensitivity and Total Knee Arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg.* 2016;24(2):106-112. doi:10.5435/JAAOS-D-14-00290

217. Wawrzynski J, Gil JA, Goodman AD, Waryasz GR. Hypersensitivity to Orthopedic Implants: A Review of the Literature. *Rheumatol Ther.* 2017;4(1):45-56. doi:10.1007/s40744-017-0062-6

218. Henry A, Inverso G, Granquist EJ. Revision temporomandibular joint arthroplasty for the treatment of acquired metal allergy and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020;49(3):356-360. doi:10.1016/j.ijom.2019.08.002

219. Schalock PC, Crawford G, Nedorost S, et al. Patch Testing for Evaluation of Hypersensitivity to Implanted Metal Devices: A Perspective From the American Contact Dermatitis Society. *Dermatitis.* 2016;27(5):241-247. doi:10.1097/DER.0000000000000210

220. Amini M, Mayes WH, Tzeng A, Tzeng TH, Saleh KJ, Mihalko WM. Evaluation and management of metal hypersensitivity in total joint arthroplasty: a systematic review. *J Long Term Eff Med Implants.* 2014;24(1):25-36. doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.2014010277

221. Richards LJ, Streifel A, Rodrigues JM. Utility of Patch Testing and Lymphocyte Transformation Testing in the Evaluation of Metal Allergy in Patients with Orthopedic Implants. *Cureus.* 2019;11(9):e5761. Published 2019 Sep 25. doi:10.7759/cureus.5761

222. Morwood MP, Garrigues GE. Shoulder arthroplasty in the patient with metal hypersensitivity. *J Shoulder Elbow Surg.* 2015;24(7):1156-1164. doi:10.1016/j.jse.2015.01.015

223. Schalock PC, Thyssen JP. Metal hypersensitivity reactions to implants: opinions and practices of patch testing dermatologists. *Dermatitis.* 2013;24(6):313-320. doi:10.1097/DER.0b013e3182a67d90

224. Schalock PC, Crawford G, Nedorost S, et al. Review of “Patch Testing for Evaluation of Hypersensitivity to Implanted Metal Devices: A Perspective From the American Contact Dermatitis Society: *The Journal of craniofacial surgery.* 2017;28(6):1 doi:10.1097/SCS.00000000000003422

225. Mitchelson AJ, Wilson CJ, Mihalko WM, et al. Biomaterial hypersensitivity: is it real? Supportive evidence and approach considerations for metal allergic patients following total knee arthroplasty. *Biomed Res Int.* 2015;137287. doi:10.1155/2015/137287

226. Schalock PC, Thyssen JP. Patch testers' opinions regarding diagnostic criteria for metal hypersensitivity reactions to metallic implants. *Dermatitis.* 2013;24(4):183-185. doi:10.1097/DER.0b013e31829cb113

227. Krenn V, Morawietz L, Kienapfel H, et al. Erweiterte Konsensusklassifikation. Histopathologische Klassifikation von Gelenkendoprothesen-assoziierten Erkrankungen [Revised consensus classification. Histopathological classification of diseases associated with joint endoprotheses]. *Z Rheumatol.* 2013;72(4):383-392. doi:10.1007/s00393-012-1099-0

228. Krenn V, Perino G, Krenn VT, et al. Histopathologische Diagnostik von Gelenkendoprothesen-assoziierten Erkrankungen [Histopathological diagnostic work-up of joint endoprosthesis-associated pathologies]. *Hautarzt.* 2016;67(5):365-372. doi:10.1007/s00105-016-3778-2

229. Perino G, Sunitsch S, Huber M, et al. Diagnostic guidelines for the histological particle algorithm in the periprosthetic neo-synovial tissue. *BMC Clin Pathol.* 2018;18:7. Published 2018 Aug 25. doi:10.1186/s12907-018-0074-3

230. Carlsson A, Möller H. Implantation of orthopaedic devices in patients with metal allergy. *Acta Derm Venereol.* 1989;69(1):62-66.

231. Thienpont E, Berger Y. No allergic reaction after TKA in a chrome-cobalt-nickel-sensitive patient: case report and review of the literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013;21(3):636-640. doi:10.1007/s00167-012-2000-z

232. Pazzini CA, Pereira LJ, Marques LS, Ramos-Jorge J, Aparecida da Silva T, Paiva SM. Nickel-free vs conventional braces for patients allergic to nickel: Gingival and blood parameters during and after treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2016;150(6):1014-1019. doi:10.1016/j.ajodo.2016.05.009

233. Münch HJ, Jacobsen SS, Olesen JT, et al. The association between metal allergy, total knee arthroplasty, and revision: study based on the Danish Knee Arthroplasty Register. *Acta Orthop.* 2015;86(3):378-383. doi:10.3109/17453674.2014.999614

234. Granchi D, Cenni E, Trisolino G, Giunti A, Baldini N. Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;77(2):257-264. doi:10.1002/jbm.b.30445

235. Pinson ML, Coop CA, Webb CN. Metal hypersensitivity in total joint arthroplasty. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014;113(2):131-136. doi:10.1016/j.anai.2014.05.012

236. Waterman AH, Schrik JJ. Allergy in hip arthroplasty. *Contact Dermatitis.* 1985;13(5):294-301. doi:10.1111/j.1600-0536.1985.tb02581.x

237. Thomas P, von der Helm C, Schopf C, et al. Patients with intolerance reactions to total knee replacement: combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern. *Biomed Res Int.* 2015;910156. doi:10.1155/2015/910156

238. Delimar D, Bohaček I, Paštar Z, Lipozenčić J. Orthopedic and Cutaneous Reactions to Nickel after Total Hip Replacement. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2018;26(1):39-43.

239. Frigerio E, Pigatto PD, Guzzi G, Altomare G. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants: a prospective study. *Contact Dermatitis.* 2011;64(5):273-279. doi:10.1111/j.1600-0536.2011.01886.x

240. Bolognesi, M. P., and Ledford, C. K. Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty: Patient Evaluation and Treatment. *J Am Acad Orthop Surg.* 2015; 23: 724-31. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-14-00183>

241. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(3):428-436. doi:10.2106/00004623-200103000-00017

242. Roberts TT, Haines CM, Uhl RL. Allergic or Hypersensitivity Reactions to Orthopaedic Implants. *J Am Acad Orthop Surg.* 2017;25(10):693-702. doi:10.5435/JAAOS-D-16-00007

243. Wood MM, Warshaw EM. Hypersensitivity reactions to titanium: diagnosis and management. *Dermatitis.* 2015;26(1):7-25. doi:10.1097/DER.0000000000000091

244. Maldonado-Naranjo AL, Healy AT, Kalfas IH. Polyetheretherketone (PEEK) intervertebral cage as a cause of chronic systemic allergy: a case report. *Spine J.* 2015;15(7):e1-e3. doi:10.1016/j.spinee.2015.04.011

245. Mowad CM. The role of patch testing in the selection and management of metal device implants comment on "the effect of patch testing on surgical practices and outcomes in orthopedic patients with metal implants". *Arch Dermatol.* 2012;148(6):693-694. doi:10.1001/archdermatol.2012.86

246. Gawkrödger DJ. Nickel sensitivity and the implantation of orthopaedic prostheses. *Contact Dermatitis.* 1993;28(5):257-259. doi:10.1111/j.1600-0536.1993.tb03427.x

247. Gupta R, Phan D, Schwarzkopf R. Total Knee Arthroplasty Failure Induced by Metal Hypersensitivity. *Am J Case Rep.* 2015;16:542-547. doi:10.12659/AJCR.893609

248. Stejskal V. Metals as a common trigger of inflammation resulting in non-specific symptoms: diagnosis and treatment. *Isr Med Assoc J.* 2014;16(12):753-758.

249. Pacheco KA. Allergy to Surgical Implants. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2015;3(5):683-695. doi:10.1016/j.jaip.2015.07.011

250. Basko-Plluska JL, Thyssen JP, Schalock PC. Cutaneous and systemic hypersensitivity reactions to metallic implants. *Dermatitis.* 2011;22(2):65-79.

251. Innocenti M, Vieri B, Melani T, Paoli T, Carulli C. Metal hypersensitivity after knee arthroplasty: fact or fiction?. *Acta Biomed.* 2017;88(2S):78-83. Published 2017 Jun 7. doi:10.23750/abm.v88i2-S.6517

252. Bergschmidt P, Bader R, Ganzer D, et al. Ceramic femoral components in total knee arthroplasty - two year follow-up results of an international prospective multi-centre study. *Open Orthop J.* 2012;6:172-178. doi:10.2174/1874325001206010172

253. Bergschmidt P, Bader R, Kluess D, et al. Total Knee Replacement System with a Ceramic Femoral Component versus Two Traditional Metallic Designs: A Prospective Short-Term Study. *Journal of Orthopaedic Surgery.* December 2013:294-299. doi:[10.1177/230949901302100306](https://doi.org/10.1177/230949901302100306)

254. Bergschmidt P, Bader R, Mittelmeier W. Metal hypersensitivity in total knee arthroplasty: revision surgery using a ceramic femoral component - a case report. *Knee.* 2012;19(2):144-147. doi:10.1016/j.knee.2011.01.001

255. Gao X, He RX, Yan SG, Wu LD. Dermatitis associated with chromium following total knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2011;26(4):665.e13-665.e6.65E16. doi:10.1016/j.arth.2010.06.002

256. Thakur RR, Ast MP, McGraw M, Bostrom MP, Rodriguez JA, Parks ML. Severe persistent synovitis after cobalt-chromium total knee arthroplasty requiring revision. *Orthopedics.* 2013;36(4):e520-e524. doi:10.3928/01477447-20130327-34

257. Post ZD, Orozco FR, Ong AC. Metal sensitivity after TKA presenting with systemic dermatitis and hair loss. *Orthopedics*. 2013;36(4):e525-e528. doi:10.3928/01477447-20130327-35

258. Hofer JK, Ezzet KA. A minimum 5-year follow-up of an oxidized zirconium femoral prosthesis used for total knee arthroplasty. *Knee*. 2014;21(1):168-171. doi:10.1016/j.knee.2013.08.015

259. Innocenti M, Carulli C, Matassi F, Carossino AM, Brandi ML, Civinini R. Total knee arthroplasty in patients with hypersensitivity to metals. *Int Orthop*. 2014;38(2):329-333. doi:10.1007/s00264-013-2229-2

260. Bader R, Bergschmidt P, Fritsche A, Ansorge S, Thomas P, Mittelmeier W. Alternative Werkstoffe und Lösungen in der Knieendoprothetik für Patienten mit Metallallergie [Alternative materials and solutions in total knee arthroplasty for patients with metal allergy]. *Orthopade*. 2008;37(2):136-142. doi:10.1007/s00132-007-1189-x

261. Buchanan RA, Rigney ED Jr, Williams JM. Wear-accelerated corrosion of Ti-6Al-4V and nitrogen-ion-implanted Ti-6Al-4V: mechanisms and influence of fixed-stress magnitude. *J Biomed Mater Res*. 1987;21(3):367-377. doi:10.1002/jbm.820210309

262. Streicher RM, Weber H, Schön R, Semlitsch M. New surface modification for Ti-6Al-7Nb alloy: oxygen diffusion hardening (ODH). *Biomaterials*. 1991;12(2):125-129. doi:10.1016/0142-9612(91)90190-1

263. Hendry JA, Pilliar RM. The fretting corrosion resistance of PVD surface-modified orthopedic implant alloys. *J Biomed Mater Res*. 2001;58(2):156-166. doi:10.1002/1097-4636(2001)58:2<156::aid-jbm1002>3.0.co;2-h

264. Lützner J, Hartmann A, Dinnebier G, Spornraft-Ragaller P, Hamann C, Kirschner S. Metal hypersensitivity and metal ion levels in patients with coated or uncoated total knee arthroplasty: a randomised controlled study. *Int Orthop*. 2013;37(10):1925-1931. doi:10.1007/s00264-013-2010-6

265. Saccomanno MF, Sircana G, Masci G, et al. Allergy in total knee replacement surgery: Is it a real problem?. *World J Orthop.* 2019;10(2):63-70. Published 2019 Feb 18. doi:10.5312/wjo.v10.i2.63

266. Riedel F, Aparicio-Soto M, Curato C, Thierse HJ, Siewert K, Luch A. Immunological Mechanisms of Metal Allergies and the Nickel-Specific TCR-pMHC Interface. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Oct 15;18(20):10867. doi: 10.3390/ijerph182010867.

267. Summer B, Paul C, Mazoochian F, Rau C, Thomsen M, Banke I, et al. Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni. *Contact Dermatitis.* 2010;63(1):15–22. doi: 10.1111/j.1600-0536.2010.01744.x.

268. Lu LK, Warshaw EM, Dunnick CA: Prevention of nickel allergy: The case for regulation? *Dermatol Clin* 2009;27(2): 155-161, vi-vii. DOI: [10.1016/j.det.2008.11.003](https://doi.org/10.1016/j.det.2008.11.003)

269. Thyssen JP, Menné T: Metal allergy: A review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol* 2010;23(2):309-318. DOI: [10.1021/tx9002726](https://doi.org/10.1021/tx9002726)

270. Ahlstrom MG, Thyssen JP, Menne T, Johansen JD. Prevalence of nickel allergy in Europe following the EU Nickel Directive - a review. *Contact Dermatitis.* 2017;77(4):193. DOI: [10.1111/cod.12846](https://doi.org/10.1111/cod.12846)

271. Rastogi S, Patel KR, Singam V, et al. Associations of Nickel Co-Reactions and Metal Polysensitization in Adults. *Dermatitis* 2018;29(6):316–20 DOI: [10.1097/DER.0000000000000421](https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000421)

272. Duarte I, Mendonca RF, Korkes KL, et al. Nickel, chromium and cobalt: the relevant allergens in allergic contact dermatitis. Comparative study between two periods: 1995-2002 and 2003-2015. *An Bras Dermatol* 2018;93(1):59–62.

273. On protection of animals from cruel treatment: Law of Ukraine No3447-IV of February 21, 2006. The Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). Available from: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-1510>.

274. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes (Text with EEA relevance). Official Journal of the European Union. 2010; 276/33 – 276/79. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF>

275. European Convention for the protection of vertebrate animals used for research and other scientific purposes. Strasbourg, 18 March 1986: official translation. Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). Available from: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137. 2111.

276. Watanabe M, Ishimaru N, Ashrin MN, et al. A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice. PLoS One. 2011;6(4):e19017. Published 2011 Apr 22. doi:10.1371/journal.pone.0019017

277. Artik S, von Vultee C, Gleichmann E, Schwarz T, Griem P. Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. J Immunol. 1999;163:1143–1152.

278. Van Hoogstraten, I. M., C. Boos, D. Boden, M. E. von Blomberg, R. J. Scheper, G. Kraal. 1993. Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. J. Invest. Dermatol. 101: 26

279. Sharma A, Fish BL, Moulder JE, Medhora M, Baker JE, et al. Safety and blood sample volume and quality of a refined retro-orbital bleeding technique in rats using a lateral approach. Lab Anim (NY). 2014; 43:63–66.

280. Paul T. Wingfield. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. Curr Protoc Protein Sci. 2001 May; APPENDIX 3: Appendix–3F

281. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature. 1970; 227(5259): 680–685

282. Lin AV. Indirect ELISA. Methods Mol Biol. 2015;1318:51-9. doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_5. PMID: 26160563

283. López De Padilla CM, Coenen MJ, Tovar A, De la Vega RE, Evans CH, Müller SA. Picrosirius Red Staining: Revisiting Its Application to the Qualitative and Quantitative Assessment of Collagen Type I and Type III in Tendon. *J Histochem Cytochem.* 2021 Oct;69(10):633-643. doi: 10.1369/00221554211046777

284. Reimer L. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis.* Springer; 1998.

285. Suga M., Asahina S., Sakuda Y., et al. Recent progress in scanning electron microscopy for the characterization of fine structural details of nano materials. *Progress in Solid State Chemistry.* 2014;42(1-2):1–21. doi: 10.1016/j.progsolidstchem.2014.02.001.

286. Bormashenko EY. *Wetting of Real Surfaces.* Walter de Gruyter GmbH & Co KG. 2018. <https://doi.org/10.1515/9783110583144>.

287. Meier GH, *Thermodynamics of surfaces and interfaces: Concepts in inorganic materials.* Cambridge University Press. 2014. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139047029>.

288. Huhtamäki T, Tian X, Korhonen J, & Ras RHA. (). Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. *Nature Protocols.* 2018; 13(7): 1521–1538. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0003-z>.

289. Zeng X, Peng Y, Lang H, Liu L. Controllable nanotribological properties of graphene nanosheets. *Sci. Rep.* 2017; 7: 41891. <https://doi.org/10.1038/srep41891>.

290. Cappella B, Dietler G, Force-distance curves by atomic force microscopy, *Surf. Sci. Rep.* 1999; 34:1–3. [https://doi.org/10.1016/S0167-5729\(99\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5729(99)00003-5).

291. Лазаренко ГО, Литвин ПМ. Спосіб визначення сумісності імплантата з організмом реципієнта. Патент України на корисну модель № 147875. 2021 чер 17.

292. Лазаренко ГО, Литвин ПМ. Спосіб визначення сумісності імплантата з організмом реципієнта. Патент України на корисну модель № 147582. 2021 тра 20.

293. Butt HJ, Capella B, Kappl M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surf. Sci. Rep.* 2005; 59: 1–152.

294. Cappella G, Dietler G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf. Sci. Rep.* 1999; 34: 1–104

295. Lessons from Nanoscience: A Lecture Note Series — Vol. 4 Fundamentals of atomic force microscopy Part I: Foundations

296. Johnson KL, Kendall K, Roberts A, Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc. R. Soc. London. A. Math. Phys. Sci.* 1971; 324: 301–313. <https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0141>.

297. Jiang T, Zhu Y, Measuring graphene adhesion using atomic force microscopy with a microsphere tip. *Nanoscale.* 2015; 7: 10760–10766. <https://doi.org/10.1039/c5nr02480c>.

298. Efremov AA, Lytvyn PM, Gontar AG, Starik SP, Perevertailo VM, Prokopenko IV, et al. Macro- and nanoscopic capillary effects on nanostructured real surfaces, *J. Superhard Mater.* 2012; 34: 81–94. <https://doi.org/10.3103/S1063457612020025>.

299. Статистичний аналіз біологічних випробувань і кількісних визначень. в 3-х т.; 2015. Т.1, Р. 5.3; с. 840-910.

300. Moran CJ, Ramesh A, Brama PA, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ.. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J Exp Orthop.* 2016; 3: 1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26915001>.

301. Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:137-44. doi: 10.1590/s0074-02762005000900024.

302. Renauld J-C. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 577-589

303. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 1999; 7: 255-281.

304. Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, Cavani A, Federici M, Sozzani S, Girolomoni G. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *J Leukoc Biol.* 2001 Oct;70(4):617-23. PMID: 11590199.

305. Colagiovanni A, Di Renzo L, Sarlo F, Schiavino D, De Lorenzo A. Role of TNF-alpha polymorphism in patients with nickel allergy: a marker of susceptibility to contact polysensitization. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Jun;20(12):2663-6. PMID: 27383320

306. Coffman RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, Zlotnik A, Paul WE. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J Immunol.* 1986;136:4538–4541.

307. Pawankar R, Okuda M, Yssel H, Okumura K, Ra C. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilonRI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells. *J Clin Invest.* 1997;99:1492–1499

308. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, Jasmin C, Canonica GW, Azzarone B. IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol.* 1998;10:1421–1433. doi: 10.1093/intimm/10.10.1421.

309. Hoontrakoon R, Kailey J, Bratton D. IL-4 and TNF- α synergize to enhance eosinophil survival. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103:A239.

310. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89:6065–6069

311. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 1992;176:1091–1098.

312. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol.* 1995;154:4187–4194.

313. Sebastiani S, Albanesi C, Nasorri F, et al. (2002b) Nickel-specific CD4(+) and CD8(+) T cells display distinct migratory responses to chemokines produced during allergic contact dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 118: 1052–1058.

314. Mai W, Lu D, Liu X, Chen L. MCP-1 produced by keratinocytes is associated with leucocyte recruitment during elicitation of nickel-induced occupational allergic contact dermatitis. *Toxicol Ind Health.* 2018 Jan;34(1):36-43. doi: 10.1177/0748233717738633. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29132256.




315. Sivagurunathan S, Vahabikashi A, Yang H, Zhang J, Vazquez K, Rajasundaram D, Politanska Y, Abdala-Valencia H, Notbohm J, Guo M, Adam SA, Goldman RD. Expression of vimentin alters cell mechanics, cell-cell adhesion, and gene expression profiles suggesting the induction of a hybrid EMT in human mammary epithelial cells. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Sep 19;10:929495. doi: 10.3389/fcell.2022.929495

316. Aleksonienė R, Besusparis J, Gruslys V, Jurgauskienė L, Laurinavičienė A, Laurinavičius A, et al. CD31+, CD38+, CD44+, and CD103+ lymphocytes in peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid and lung biopsy tissue in sarcoid patients and controls. *Journal Of Thoracic Disease.* 2021; 13(4): 2300-2318. doi:10.21037/jtd-20-2396

Умови передачі та використання імплантів для дисертаційного дослідження

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
 Державне підприємство «Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя Міністерства охорони здоров'я України»
 Орган з оцінки відповідності «ЕКОГІНТОКС» (ООВ «ЕКОГІНТОКС»)

СЕРТИФІКАТ

Зареєстрований у Реєстрі ООВ «ЕКОГІНТОКС»
 “20” листопада 2020 р № UA.80092-011-20
 Дійсний до “19” листопада 2023 р.

80092
 ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1

**ЦЕЙ СЕРТИФІКАТ ПОСВІДЧУЄ, ЩО СИСТЕМА УПРАВЛІННЯ ЯКІСТЮ
 Товариства з обмеженою відповідальністю
 «ОРТОСІНТЕЗ», ЄДРПОУ 37922073**

Юридична адреса: вул. М. Краснова, 33, м. Київ, 03179, Україна
 Юридична адреса виробничих потужностей: ДП «Інженерно-виробничий центр «Алкон» НАН України, вул. Автозаводська, 2, м. Київ, 04074, Україна
 Адреса виробництва: вул. Шахтарська, 4а, м. Київ, 04074, Україна

**БУЛА ПЕРЕВІРЕНА ТА ВИЗНАНА ВІДПОВІДНОЮ ВИМОГАМ
 ДСТУ EN ISO 13485:2018 «Вироби медичні. Система управління якістю.
 Вимоги до регулювання» (EN ISO 13485:2016, IDT; ISO 13485:2016, IDT)**

**ЦЕЙ СЕРТИФІКАТ ДІЙСНИЙ СТОСОВНО РОЗРОБКИ, ВИРОБНИЦТВА,
 РОЗПОВСЮДЖЕННЯ МЕДИЧНИХ ВИРОБІВ:**

**Імпланти травматологічні
 та вертебрологічні;
 Інструмент хірургічний травматологічний**


Сертифікат видано
 Органом з оцінки
 відповідності
 «ЕКОГІНТОКС»

ДП НАУКОВИЙ ЦЕНТР ПРЕВЕНТИВНОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ,
 ХАРЧОВОЇ ТА ХІМІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ІМЕНІ АКАДЕМІКА
 Л.І. МЕДВЕДЯ МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
 Адреса: вул. Героїв оборони, 6, м. Київ, 03127, Україна.
 Аттестат акредитації, виданий
 Національним органом з акредитації України:
 № 80092 від 20.08.2020 р. (відповідно до вимог ДСТУ EN ISO/IEC 17021-1)

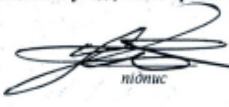
Сертифікат видано на підставі звіту № 018-20 від 19.11.2020 р., рішення № 011-20 від 20.11.2020 р.

Невиконання умов, вказаних в ліцензійній угоді, може зробити цей сертифікат недійсним.

**Заступник керівника
 ООВ «ЕКОГІНТОКС»**



С.Д. Колесник.



начальник, прізвище

Сертифікат чинний за умови проведення щорічного наглядового аудиту.
 Чинність сертифіката можна перевірити в Реєстрі органу з оцінки відповідності «ЕКОГІНТОКС», розташованому на офіційному сайті <http://oov.medved.kiev.ua/> або за телефоном: +38 (044) 521-30-20 (додатковий 11-05 або 11-76), E-mail: medici.medved@gmail.com

Дослідження хемокінового профілю у сироватках крові щурів

Покроковий хід роботи:

1. Внести у пробірки по 10 мкл стандартних розчинів (S), 10 мкл буферу (контроль) та 10 мкл досліджуваних сироваток крові.
2. Додати по 10 мкл ВеМ та 20 мкл ВСМ.
3. Перемішати та помістити на інкубацію протягом 2 год при температурі +18о до +25оС (у темному місці, без доступу світла).
4. Додати 700 мкл буферу АВ та осадити при 200х g протягом 5 хвилин.
5. Відібрати супернатант в об'ємі 700 мкл.
6. Повторити п.4 та п.5.
7. Додати 20 мкл розчину S-PE.
8. Перемішати та помістити на інкубацію протягом 1 год при температурі +18о до +25оС (у темному місці, без доступу світла).
9. Двічі повторити п.4 та п.5.
10. Додати 0,3 мл буферу АВ (зразки помістити у темному місці, без доступу світла).
11. Провести аналіз отриманих зразків.

Для дослідження контактного кута (змочуваність поверхні) слідували даним протоколом:

1. Підключити цифровий мікроскоп до ПК.
 2. Відкрийте програму Drop analysis.
 3. Покладіть на піднімальний столик чисту обрану поверхню.
 4. Установіть мікроскоп горизонтально об'єктивом до столика.
 5. Наберіть до шприца воду або іншу рідину та зробіть краплю на досліджуваній поверхні.
 6. Встановити зразок так, щоб крапля була посередині.
 7. За допомогою піднімального столика відрегулювати висоту так, щоб крапля була дещо нижче центра поля зору мікроскопа.
 8. Сфокусувати мікроскоп на краплю.
- За допомогою столика відрегулюйте положення зразку так, щоб досліджувана поверхня була розташована в полі зору мікроскопа горизонтально. Якщо необхідно, відкорегуйте фокусування мікроскопа.
10. Зробити знімок краплі за допомогою команди «Take a photo».
 11. Прокрутіть праве меню вікна вниз та відкрийте отриманий знімок у вікні попереднього перегляду програми подвійним кліком лівої кнопки миші.
 12. Скористайтеся командою «Angle» для вимірювання кута змочування водою досліджуваної поверхні.
 13. Повторіть вимірювання кутів змочування. Результати занотуйте до таблиці.
 14. За результатами вимірювань кутів змочування з обох боків краплі вираховується середнє значення для кожної поверхні.

«ЗАТВЕРЖУЮ»
 Заступник директора
 ДНУ «ННЦ ІНМ» ДУС
 Г.О. Лазаренко



Акт впровадження інновації в роботу наукових відділів ДНУ «ННЦ ІНМ» ДУС

1. **Назва інновації:** «Метод тестування ортопедичних імплантів за допомогою атомно-силової мікроскопії».
2. **Джерело інформації та вид інновації:**
Стаття: Lazarenko HO., Boiko IV. The method of atomic force microscopy as a possible tool for testing the biocompatibility of implants in traumatology and orthopedics practice.
Wiadomości Lekarskie.2022;75(11p1):2614-2618 DOI:10.36740/WLek202211111
3. **Автори інновації:** Лазаренко Г.О., д. мед. н. Бойко І.В.
4. **Науково-дослідницька робота, в рамках якої проведено дослідження:** «Оптимізація хірургічного лікування хворих за мультимодальною програмою швидкого відновлення на основі удосконалення малоінвазивних оперативних втручань, зокрема із застосуванням нанобіосенсорних технологій та їх анестезіологічного забезпечення» (номер держреєстрації № 0122U000233).
5. **Назва структурного підрозділу:** науковий відділ малоінвазивної хірургії.
6. **Термін впровадження:** впроваджено з 2023 року.
7. **Результат впровадження:**
 - з позитивним результатом - 98%
 - з негативним результатом - 0
 - з невизначеним результатом - 2%
8. **Ефективність впровадження:** Проводиться аналіз експериментальних досліджень методу тестування за допомогою атомно-силової мікроскопії на основі функціоналізації IgG (піддослідних тварин), який може дозволити визначити можливість виникнення реакції на імплантат.
9. **Зауваження та пропозиції:** Зауважень немає.

В/о завідувача структурного підрозділу  Литвак О.О.

Відповідальний за впровадження  Шептуха С.А.

Наукові праці, в яких опубліковані результати дисертації

Статті в періодичних наукових виданнях.

1. **Лазаренко Г.О.** Гіперчутливість до металу в ендопротезуванні. Методи діагностики та лікування (огляд літератури) *Літопис травматології та ортопедії* 2016. № 1-2 (33-34). С. 194-200.
<https://drive.google.com/file/d/11Ic8n2FVL7jCoHmB6GD7uSwVKHn8cT0G/view>.

2. Грищук Я.І., Алексєєва Т.А., Картель М.Т., Лазаренко О.М., **Лазаренко Г.О.**, Литвин П.М., Ничитайло М.Ю. Тестування з використанням атомно силової мікроскопії індивідуальної сумісності алотрансплантатів з організмом реципієнта / *Клінічна хірургія*. 2016. №7. С. 61-63. PubMed ID 30256601
<https://hirurgiya.com.ua/index.php/journal/issue/view/106/7-2016>

3. Boiko I.V., Zaft V.B., **Lazarenko G.O.**, Lazarenko O.M., Aleksyeyeva T.A., Kartel N.T., Lytvyn P.M. Testing the compatibility of the orthopedic implants material with recipients body in arthroplastic using atomic force microscopy (AFM) *Juniper Online Journal of Orthopedic & Orthoplastic Surgery* 2018. 1(5). P 86-90. DOI: 10.19080/JOJOOS.2018.01.555571
<https://juniperpublishers.com/jojoos/pdf/JOJOOS.MS.ID.555571.pdf>

4. **Lazarenko H.O.**, Boiko I.V. The method of atomic force microscopy as a possible tool for testing the biocompatibility of implants in traumatology and orthopedics practice *Wiadomości Lekarskie* 2022. 75(11 p1) P 2614-2618 PubMed ID 36591742 DOI: 10.36740/WLek202211111

5. **Лазаренко Г.О.**, Бойко І.В. Реакція гіперчутливості до ортопедичних імплантатів: сучасний стан проблеми (Огляд літератури) *TERRA ORTHOPAEDICA*, 2022 (3(114), С. 61-72.
<https://doi.org/10.37647/0132-2486-2022-114-3-61-72>

6. **Lazarenko H.O.**, Savosko S. I., Guzyk M. M., Boiko I.V. Features of using orthopedic implants on an experimental model of sensitization to nickel (Ni) *Clinical and Preventive Medicine*, 2023 (6) С. 194-200. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.6.2023.10>

Патенти

1. Лазаренко Г.О., Литвин П.М. Спосіб визначення сумісності імплантата з організмом реципієнта Патент України на корисну модель № 147582, 20.05.2021

2. Лазаренко Г.О., Литвин П.М. Спосіб визначення сумісності імплантата з організмом реципієнта Патент України на корисну модель № 147875, 17.06.2021

Тези наукових доповідей

1. Бойко І.В., Зафт В.Б., **Лазаренко Г.О.**, Лазаренко О.М., Алексеєва Т.А., Литвин П.Л. Індивідуальна біосумісність ортопедичних імплантів з організмом реципієнта: Перша науково-практична конференція біомедичних інженерів і технологів України «Сучасний стан та перспективи біомедичної інженерії і медичної промисловості України» 7-8.10.2015., Київ.

2. Бойко І. В., Зафт В. Б., **Лазаренко Г.О.**, Лазаренко О. М., Алексеєва Т. А., Картель М. Т., Литвин П. Л. Метод тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ): Науково-практична конференція з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» 9-10.11.2017., Київ.

3. **Лазаренко Г.О.**, Зафт. В.Б Тестування сумісності імплантатів при ендопротезуванні великих суглобів за допомогою атомно-силової мікроскопії: Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю Національної Академії Медичних Наук, 23.03.2018., Київ.

4. **Лазаренко Г.О.**, Лазаренко О.М., Бойко І.В., Алексеєва Т.А., Литвин П.М. Атомно-силовий мікроскоп, як інструмент для тестування сумісності імплантатів в ортопедо-травматологічній практиці: Науково-практична конференція молодих вчених «Перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини» 17-19.04.2019., Київ.

5. **Лазаренко Г.О.**, Лазаренко О.М., Бойко І.В., Алексеева Т.А., Литвин П.М. Атомно-силовий мікроскоп, місце в ортопедо - травматологічній практиці: XVIII з'їзд ортопедів-травматологів України, 9-11.10.2019., Івано-Франківськ.

6. **Лазаренко Г.О.** Передопераційне тестування сумісності ортопедичних імплантатів за допомогою атомно-силової мікроскопії: Конференція «BIOMED Talks 2019», 15-16.10.2019., Київ.

7. **Лазаренко Г.О.**, Лазаренко О.М., Бойко І.В., Алексеева Т.А., Литвин П.М. Тестування сумісності імплантатів в ортопедо-травматологічній практиці: Науково-практична конференція «Проблеми і перспективи розвитку клінічної і профілактичної медицини та громадського здоров'я: міждисциплінарні аспекти», 10.2019., Київ.

8. **Lazarenko H.O.**, Boyko I. V. Метод тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ): I International Scientific and Theoretical Conference The Process and Dynamics of the Scientific Path, 26.10.2021, Athens.

9. **Lazarenko H.O.** Testing of the compatibility of the orthopedic implants material with the recipient's body by using atomic force microscopy (AFM): I International Scientific and Theoretical Conference Theoretical and Practical Aspects of Modern Scientific Research, 30.04.2021., Seoul.

10. **Lazarenko H.O.** Biocompatibility testing of the orthopedic implants material with using atomic force microscopy (AFM): I Correspondence International Scientific and Practical Conference Globalization of Scientific Knowledge: International Cooperation and Integration of Science, 7.05.2021., Vienna.

11. **Лазаренко Г.О.** Метод передопераційного тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ): Науково-практична конференція молодих вчених «Сучасні досягнення і перспективи розвитку профілактичної та клінічної медицини» 21.04.2021., Київ.

12. **Лазаренко Г.О.**, Гузик М.М., Савосько С.І. Визначення реакції гіперчутливості до ортопедичних імплантатів (експериментальне дослідження): «Tissue reactions in the norm, experiment and clinic» All-Ukrainian scientific and practical conference with international participation dedicated to the memory of professor Yu. B. Chaikovsky, 8–9.06.2023., Київ.