

УДК 617.3-097:620.3

Г.О. Лазаренко<sup>1\*</sup>, О.М. Лазаренко<sup>1</sup>, В.Г. Гур'янов<sup>1</sup>, Т.А. Алексеєва<sup>2</sup>, О.Ю. Фурманов<sup>3</sup>

## Обробка поверхні ортопедичних імплантатів композицією на основі сироватки крові поліпшує їх біосумісність

UDC 617.3-097:620.3

G.O. Lazarenko<sup>1\*</sup>, O.M. Lazarenko<sup>1</sup>, V.G. Guryanov<sup>1</sup>, T.A. Alekseyeva<sup>2</sup>, O.Yu. Furmanov<sup>3</sup>

## Treatment of Orthopedic Implant Surface with Blood Serum-Based Composition Improves Their Biocompatibility

**Ключові слова:** імплантати, реакція відторгнення, біосумісні матеріали, адаптуюча композиція.

**Ключевые слова:** имплантат, реакция отторжения, биосовместимые материалы, адаптирующая композиция.

**Key words:** implant, rejection, biocompatible materials, adaptive composition.

У світі щороку проводяться більше ніж 100 000 операцій зі встановлення різних імплантатів, не враховуючи стоматологічні. У 25–30% випадках імплантати не сприймаються організмом реципієнта [4, 6, 9, 10].

Основа реакції відторгнення чужорідного матеріалу – асептичне запалення, яке є результатом імунної реакції організму на поверхню імплантатів. На поверхні імплантатів існують специфічні «місця зв'язування» – епітопи, що виявляються захисними елементами імунної системи (імуноглобулінами класу G (IgG)) реципієнта як чужорідні. В перший момент контакту тканин з імплантатом епітопи на поверхні останнього виявляються IgG-гуморальною імунною системою реципієнта. Сила утримання поверхнею IgG прямо пропорційна кількості на ній епітопів, які «чутливі» до певного пулу IgG. Утворення афінного зв'язку між поверхнею протеза та IgG призводить до активації клітинного імунітету реципієнта. У результаті формується ізолююча капсула, товщина якої прямо пропорційна ступеню запалення. Сама ж адгезія IgG до епітопів на поверхні імплантату супроводжується утворенням перекисних радикалів, які відіграють основну роль у руйнуванні поверхні протеза [5, 7].

У ряді досліджень було показано, що введення розчину альбуміну сироватки крові пацієнта модифікує поверхню імплантатів, знижуючи частоту розвитку побічних ефектів. Розчин альбуміну також успішно

More than 100,000 surgeries are annually performed in the world to fix different implants, excluding dental ones. In 25–30% of cases, the implants are rejected by a recipient's body [3, 5, 9, 10].

The foreign material rejection is based on an aseptic inflammation, resulting from a body's immune response to an implant surface. Implant surface has specific 'sites of binding', *i. e.* the epitopes, which are detected by defence agents of immune system, *i. e.* immunoglobulins G (IgG) of a recipient, as alien. Thus right after tissue contact with an implant its surface epitopes are detected by IgG-associated humoral immune system of a recipient. The retention strength of IgG by surface is directly proportional to the amount of epitopes on it, which are 'sensitive' to a specific IgG pool. The formation of affinity link between the prosthesis surface and IgG leads to activation of a recipient's cell immunity. As a result, an isolating capsule, the thickness of which is directly proportional to inflammation degree, has been formed. The IgG adhesion to epitopes on implant surface *per se* is accompanied by peroxide radical formation, playing a major role in prosthesis surface destruction [4, 6].

Several studies have demonstrated the administration of albumin solution of a patient's blood serum to modify the implant surface and to reduce the incidence of side effects. Albumin solution is also successfully used to

<sup>1</sup>Державна наукова установа «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами, м. Київ

<sup>2</sup>Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, м. Київ

<sup>3</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України, м. Київ

<sup>1</sup>State Scientific Institution 'Scientific and Practical Center for Preventive and Clinical Medicine' of the State Department of Affairs, Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>O.O. Chuiiko Institute of Surface Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Верхня, 5, м. Київ, Україна 01014;  
тел.: (+38 044) 286-47-00  
електронна пошта: lazarenko@gmail.com

Надійшла 26.01.2018

Прийнята до друку 19.02.2018

\*To whom correspondence should be addressed:

5, Verkhnia str., Kyiv, Ukraine 01014;  
tel.:+380 44 286 4700  
e-mail: lazarenko@gmail.com

Received January, 26, 2018

Accepted February, 19, 2018

© 2018 G.O. Lazarenko et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

застосовують із метою блокування епітопів, які не прореагували під час проведення імуноферментного аналізу [1, 8].

Мета роботи – дослідження можливості зниження ризику виникнення реакції запалення (відторгнення) після обробки ортопедичних імплантатів адаптуючою композицією на основі сироватки крові реципієнта.

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог локального Комітету з біоетики, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Експерименти на тваринах виконували у віварію ДУ «Інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України» відповідно до біоетичних принципів.

Дослідження проводили на 14 кроликах-самцях породи «сірий велетень» масою 2,5–3,0 кг. Тваринам під загальною анестезією були імплантовані металеві спиці. Для отримання доказових результатів у праву нижню кінцівку встановлювали спиці з нержавіючої сталі 316L, які попередньо були оброблені білками сироватки крові реципієнта – адаптуючою композицією (AdC), а в ліву нижню кінцівку – спиці без обробки.

Технологія приготування AdC та методика обробки поверхні імплантатів для поліпшення біосумісних властивостей описані у відповідних методичних рекомендаціях [2]. Основні етапи обробки включали наступні процедури. У реципієнта за допомогою вакуумтейнера набирали кров із вени, після формування згустку (10–16 хв) її центрифугували протягом 7 хв при 500g. Сироватку крові (2 мл) відбирали у стерильний шприц (5 мл) та пропускали для додаткової стерилізації через одноразовий мембранний фільтр із порами 0,22 мкм, насаджений на шприц, до стерильної ємності з 20 мл стерильного фізіологічного розчину.

Після розведення сироватки у 10 разів відбувається розкручення глобул альбуміну у лінійні молекули [3]. Крім того, у молярному відношенні концентрація альбуміну на порядок вища за концентрацію імуноглобулінів, які ще залишились у сироватці. Кінетика адсорбції альбуміну на поверхню також вища за таку у імуноглобулінів.

Після приготування AdC переливали у зручний для занурення протеза стерильний посуд (кювету, лоток, пакувальну для протезу ємність тощо) та витримували у ній 5 хв, після чого проводили імплантацію.

Такий посуд повинний мати об'єм, достатній для повного занурення протеза. Пакувальна ємність для занурення об'ємного протеза в AdC є оптимальною, оскільки потребується мінімальна їх кількість.

block the epitopes, which have not responded in the enzyme immunoassay performance [1, 8].

The research aim was to investigate the possibility to reduce the risk of inflammation (rejection) occurrence after treating orthopedic implants with a recipient's blood serum-based adaptive composition.

Experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasburg, 1986). Research in animals was conducted at the animal facility of O.O. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology of NAMS of Ukraine in accordance with the standards of bioethical principles.

The experiments were carried-out in 14 male Gray Giant rabbits, weighing 2.5–3.0 kg. The metal needles were implanted into animals under general anesthesia. For obtaining the evidence-based results, the 316L stainless steel needles, pretreated with a recipient's blood serum proteins adaptive composition (AdC), or non-treated needles were fixed in the right and left lower limbs, respectively.

The technology for AdC preparation and the technique of implant surface processing to improve the biocompatible properties are described in the relevant guidelines [7]. The main stages of the treatment included the following procedures. A recipient's venous blood was collected using a Vacutainer tube, after clot forming (10–16 min) it was centrifuged for 7 min at 500g. Blood serum (2 ml) was taken into a disposable syringe (5 ml) and passed for additional sterilization through a single syringe filter with a 0.22  $\mu\text{m}$  pore size into a sterile container filled with 20 ml sterile physiological saline.

After a 10-fold serum dilution the albumin globules are unfolded to linear chains [2]. In addition, the mole ratio of albumin concentration is 10 times higher than the concentration of immunoglobulins, being still present in serum. The kinetics of albumin adsorption to the surface was also higher than that in immunoglobulins.

After preparing, the AdC was poured into the sterile dishes, convenient to plunge the prosthesis (cuvette, tray, container for prosthesis packaging, etc.), with following 5-min prosthesis maintenance in it, completed with implantation.

The dishes for prosthesis incubation should have a sufficient volume for its full immersion. The packaging container for large prosthesis is an optimal solution to keep it in AdC, since its minimum amount is needed for immersion.



Склад AdC  
AdC composition

Білкові фракції сироватки реципієнта Protein fractions of a recipient's serum	Абсолютна кількість білків у 20 мл AdC, $\pm$ г/ 20 мл Absolute number of proteins in 20 ml AdC, $\pm$ g/20 ml	Співвідношення білкових компонентів, $\pm$ % Ratio of protein components, $\pm$ %
Альбуміни Albumins	0,94 $\pm$ 0,26	61,1 $\pm$ 16,7
$\alpha$ 1-глобуліни $\alpha$ 1-globulins	0,04 $\pm$ 0,002	2,4 $\pm$ 0,12
$\alpha$ 2-глобуліни $\alpha$ 2-globulins	0,14 $\pm$ 0,02	9,6 $\pm$ 1,3
$\beta$ -глобуліни $\beta$ -globulins	0,18 $\pm$ 0,015	11,5 $\pm$ 1,0
$\gamma$ -глобуліни $\gamma$ -globulins	0,24 $\pm$ 0,06	15,4 $\pm$ 3,9

Через 4 місяці після імплантації проводили рентгенографічне, імуногістохімічне та гістоморфологічне дослідження. Склад AdC представлено в таблиці.

Для статистичної обробки даних використовували пакет статистичного аналізу «MedCalc v.17.2» («MedCalc Software Inc.», Бельгія) та пакет «MedStat» (Ю.С. Лях, В.Г. Гурянов, 2004–2011 рр.). Вплив факторів ризику оцінювали за показником зниження абсолютного ризику (ЗАР), а також за методом побудови та аналізу логістичних моделей регресії, якість моделей – за методом побудови кривих операційних характеристик та визначенням площі під кривою (ППК), предиктивною цінністю позитивного та негативного результатів. Розраховували відповідні 95%-ві вірогідні інтервали (95% VI).

Результати рентгенологічного дослідження показали відсутність ознак періоститу в місці встановлення спиць, попередньо оброблених AdC, однак ортопедичні імплантати без обробки в 35,7% (5 із 14 випадків) викликали запалення надкисниці.

На правій кінцівці в місці встановлення ортопедичних спиць ознак місцевого запалення надкисниці виявлено не було, але на лівій кінцівці спостерігалася її потовщення, що характерно для ознак періоститу (рис. 1).

За результатами рентгенологічного дослідження доведено, що попереднє нанесення на спиці нанорозмірного шару білка сироватки крові експериментальної тварини не викликало розвитку періоститу у місці їх встановлення.

На рис. 2, А подано результати імуногістохімічного забарвлення досліджуваних тканин. Тканини здорової тварини були рівномірно забарвлені з чіткою візуалізацією колагенових волокон.

Four months after implantation, the X-ray, immunohistochemical and histomorphological examinations were carried-out. The composition of the proposed AdC is presented in the Table.

The data were statistically processed with the MedCalc v.17.2 (MedCalc Software Inc., Belgium) and the MedStat package (Liakh Yu.E., Guryanov V.G., 2004–2011). The threat impact was assessed by the absolute risk reduction index (ARR), as well as by the method of constructing and analyzing logistic regression models, the model quality was estimated by the method of plotting the operating characteristic curves and determining the area under curve (AUC), by predictive value of positive and negative results. The corresponding 95% significance intervals (95% SI) were calculated.

The results of X-ray examination showed no signs of periostitis at the place where the AdC-pretreated needles were mounted, but the untreated orthopedic implants caused a periosteal inflammation in 35.7% (5 of 14 cases).

No signs of local periosteal inflammation were revealed on the right limb, where the orthopedic needles were fixed, but on the left limb we observed its thickening, which was characteristic for periostitis (Fig. 1).

According to the X-ray study results, the pretreatment of needles with a nanosized layer of blood serum proteins of experimental animal was shown to cause no periostitis development at the site where they were fixed.

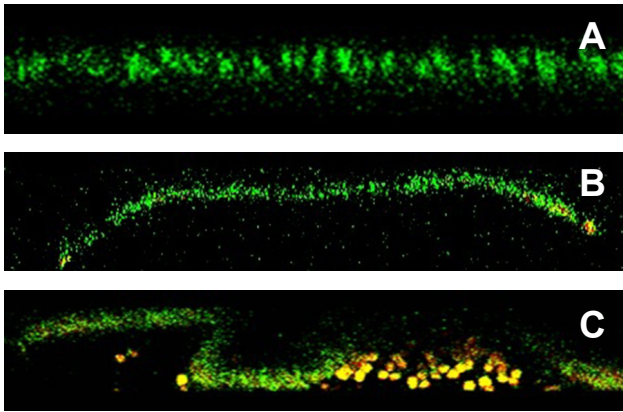
The Fig. 2A shows the results of immunohistochemical staining of studied tissues. The tissues of a healthy animal were evenly stained with a distinct visualization of collagen fibers. At the site of implant fixing, a slight



Рис. 1. Рентгенограма стегнових кісток кролика зі встановленими спицями через 4 місяці після операції: L – ліва кінцівка зі спицями без обробки AdC; R – права кінцівка з ортопедичними імплантатами, обробленими AdC.

Fig. 1. X-ray picture of rabbit femoral bones with fixed needles 4 months after surgery: L – left limb with untreated needles; R – right limb with AdC-treated orthopedic implants.





**Рис. 2.** Імуногістохімічне забарвлення тканин біля імплантату через 4 місяці після встановлення спиць: **А** – колагенові волокна; **В** – невелике накопичення лімфоцитів; **С** – інтенсивна лімфоцитарна інфільтрація.  
**Fig. 2.** Immunohistochemical staining of tissues near implant 4 months after needle mounting: **A** – collagen fibers; **B** – a slight lymphocyte accumulation; **C** – intense lymphocytic infiltration.

У місці введення імплантату виявлялося невелике накопичення лімфоцитів (рис. 2, В), а також інтенсивна лімфоцитарна інфільтрація (рис. 2, С).

Ми вважаємо, що білковий шар альбумінів на поверхні імплантатів може викликати екранування центрів зв'язування з IgG та їх блокування на початковій стадії імунної відповіді. Це може свідчити про відсутність реакції імунної системи на імплантат як на чужорідний об'єкт. Таким чином, попередня обробка імплантатів сироваткою реципієнта за запропонованою технологією дозволяє знизити рівень розвитку місцевого запалення ( $p = 0,04$ ), а отже, зменшити частоту виникнення інтра- та післяопераційних ускладнень при використанні AdC, ЗАР = 35,7% (6,8–61,2%) порівняно з імплантатами без обробки.

Таким чином, у жодної тварини не було виявлено патологічних гістоморфологічних змін, пов'язаних із обробкою спиць AdC. Результати імуногістохімічного та гістоморфологічного досліджень тканин навколо імплантату показали, що застосування запропонованої методики обробки AdC знижує рівень прозапальних змін: попередження формування фіброзносполучної капсули, відсутність ознак періоститу імплантату після обробки спиць AdC ( $p < 0,05$ ) порівняно з необробленими.

Протягом 12 місяців ймовірність розвитку ускладнень, асоційованих із реакцією відторгнення ортопедичних імплантатів після обробки AdC, складала 100% (95% ВІ = 78,2–100%), а рівень загальної клінічної ефективності запропонованої технології досягав середнього значення (ППК = 0,69;  $p < 0,001$ ).

У дослідженні підтверджено, що імплантація будь-якого екзогенного матеріалу є тригером активації

lymphocyte accumulation (Fig. 2B), as well as an intense lymphocytic infiltration (Fig. 2C), were found.

We believe that the protein layer of albumins on implant surface may result in shielding of the binding sites with IgG and their blocking at the initial stage of immune response. This may testify to the absence of immune system response to implant as an alien object. Thus, the implant pretreatment with a recipient's serum according to the proposed technology enables to reduce the level of local inflammation development ( $p = 0.04$ ), and therefore to decrease the incidence of intra- and postoperative complications when using AdC, ARR = 35.7% (6.8–61.2%), as compared with untreated implants.

Thus, no animal showed pathological histomorphological changes, associated with AdC treatment of needles. The findings of immunohistochemical and histomorphological studies of tissues around the implant demonstrated the application of the proposed technique of AdC treatment to reduce the level of proinflammatory changes, *i. e.* it prevented the formation of fibrous connective capsule, and there were no signs of implant periostitis after needle treatment with AdC ( $p < 0.05$ ) as compared with the untreated ones.

Within 12 months, the probability of complication development, associated with the orthopedic implant rejection after AdC treatment was 100% (95% SI = 78.2–100%), and the overall clinical efficiency rate of the proposed technology reached an average value (AUC = 0.69;  $p < 0.001$ ).

The study confirmed the implantation of any exogenous material to be a trigger for activation of immune response from a recipient's body, and the implant pretreatment with a recipient's blood serum solution blocked the active centers on its surface and prevented immunoglobulin adhesion and immune response activation on it. The proposed technology application resulted in a significant reduction of a recipient's body reaction extent to foreign material.

The data of AdC clinical application for implant treatment with the purpose to improve their biocompatible properties with a recipient's organism testify to no complications developed.

## References

1. Aleksyeyeva T.A., Lazarenko O.N., inventors. Composition to improve biocompatibility of implants and cells for transplantation with a recipient's body and the way for its preparation. Patent of Ukraine №104738. 2014 March 11.
2. Aleksyeyeva T.A., Lazarenko O.N., inventors. Substance enhancing biocompatibility of implants with recipient body and method of its preparation patent application European Patent 2709684B1. 2016 May 25.

імунної відповіді з боку організму реципієнта, а попередня обробка імплантату розчином сироватки крові реципієнта блокує активні центри на його поверхні та попереджає на ній адгезію імуноглобулінів та активацію імунної відповіді. Результатом використання запропонованої технології є суттєве зниження ступеня реакції організму реципієнта на чужорідний матеріал.

Одержані дані клінічного застосування AdC для обробки імплантатів із метою поліпшення їх біосумісних властивостей із організмом реципієнта підтверджують про відсутність ускладнень.

### Література

1. Алексеева Т.А., Лазаренко О.Н. Композиція для підвищення біосумісності імплантів та клітин для трансплантації з організмом реципієнта та спосіб її приготування. Патент України №104738 2014 Бер. 11.
2. Лазаренко О.Н., Смержевський В.Й., Галич С.П. та ін. Клінічне застосування обробки поверхні імплантатів адаптуючою композицією для поліпшення їх біосумісних властивостей у реконструктивно-відновлювальній хірургії; [методичні рекомендації]. Київ; 58.16/140.16. 2016: 1–23.
3. Aleksyeyeva T.A., Lazarenko O.N., inventors. Substance enhancing biocompatibility of implants with recipient body and method of its preparation patent application European Patent 2709684B1. 2016 May 25.
4. Dondossola E., Holzapfel B.M., Alexander S. et al. Examination of the foreign body response to biomaterials by nonlinear intravital microscopy. *Nat Biomed Eng* 2016; 1: 0007.
5. Fabre H., Mercier D., Galtayries A. et al. Impact of hydrophilic and hydrophobic functionalization of flat TiO<sub>2</sub>/Ti surfaces on proteins adsorption. *Appl Surf Sci* 2018; 432: 15–21.
6. Gallo J., Gibon E., Goodman S.B. Implants for Joint Replacement of the Hip and Knee. *Materials for Bone Disorders* 2017; 119–196.
7. Huhn S., Braem A., Neirinck B., et al. Albumin coatings by alternating current electrophoretic deposition for improving corrosion resistance and bioactivity of titanium implants. *Applied Surface Science Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017; 1 (73): 798–807.
8. Major M.R., Wong V.W., Nelson E.R. et al. The foreign body response: At the interface of surgery and bioengineering. *Plast Reconstr Surg*. 2015; 135 (5): 1489–1498.
9. Pezzotti G., Yamamoto K. Artificial hip joints: The biomaterials challenge. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014 Mar; 31:3–20.
10. Vadei L., Kieser D., Frampton C. et al. Survivorship of total hip joint replacements following isolated liner exchange for wear. *J Arthroplasty* 2017; 32(11): 3484–3487.
3. Dondossola E., Holzapfel B.M., Alexander S. et al. Examination of the foreign body response to biomaterials by nonlinear intravital microscopy. *Nat Biomed Eng* 2016; 1: 0007.
4. Fabre H., Mercier D., Galtayries A., et al. Impact of hydrophilic and hydrophobic functionalization of flat TiO<sub>2</sub>/Ti surfaces on proteins adsorption. *Appl Surf Sci* 2018; 432: 15–21.
5. Gallo J., Gibon E., Goodman S.B. Implants for joint replacement of the hip and knee. In: *Materials for Bone Disorders* 2017. p. 119–196.
6. Huhn S., Braem A., Neirinck B. et al. Albumin coatings by alternating current electrophoretic deposition for improving corrosion resistance and bioactivity of titanium implants. *Applied Surface Science Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 1 (73): 798–807.
7. Lazarenko O.M., Smorzhevsky V.I., Galych S.P. et al. Clinical application of implant surface treatment with adaptive composition to improve their biocompatible features [method guidelines]. Kyiv; 2012.
8. Major M.R., Wong V.W., Nelson E.R. et al. The foreign body response: At the interface of surgery and bioengineering. *Plast Reconstr Surg* 2015; 135(5): 1489–1498.
9. Pezzotti G., Yamamoto K. Artificial hip joints: The biomaterials challenge. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014; 31: 3–20.
10. Vadei L., Kieser D., Frampton C. et al. Survivorship of total hip joint replacements following isolated liner exchange for wear. *J Arthroplasty* 2017; 32(11): 3484–3487.

