

Ю.М. Нерянов, М.Л. Головаха, І.Ф. Беленічев, В.М. Чорний, Є.В. Яцун

Дослідження токсичної дії продуктів біодеградації магнієвого сплаву в експерименті

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: магній, імплантат, токсичність.

Вивчено можливу токсичну дію продуктів біодеградації оригінального сплаву на основі магнію на лабораторних щурів. Описано використані лабораторні методи дослідження. Охарактеризовано біохімічні показники плазми, за якими здійснювали дослідження ендогенної інтоксикації у щурів. Встановлено, що продукти біологічної резорбції сплаву не мають токсичної дії на тканини організму і не посилюють клітинної деструкції, про що свідчить відсутність ознак ендогенної інтоксикації і окислювального ушкодження функціональних макромолекул.

Исследование токсического действия биодеградации магниевого сплава в эксперименте

Ю.М. Нерянов, М.Л. Головаха, И.Ф. Беленичев, В.Н. Черный, Е.В. Яцун

Изучено возможное токсическое действие продуктов биодеградации оригинального сплава на основе магния на лабораторных крыс. Предоставлено описание применяемых методов исследования. Охарактеризованы биохимические показатели плазмы, по которым проводили исследование эндогенной интоксикации у крыс. Установлено, что продукты биологической резорбции сплава не вызывают токсического действия на ткани организма и не усиливают клеточную деструкцию, о чем свидетельствует отсутствие признаков эндогенной интоксикации и окислительного повреждения функциональных макромолекул.

Ключевые слова: магний, имплантат, токсичность.

Патология. – 2013. – №2 (28). – С. 68–71

Toxicity of magnesium alloy biodegradation products in experiment

Yu.M. Neryanov, M.L. Golovakha, I.F. Belyenichev, V.N. Chorny, E.V. Yatsun

The article presents information on the study of possible toxic effects of biodegradation products of original magnesium-based alloy on laboratory rats. The used laboratory methods of investigation are described. Author has examined biochemical parameters of plasma on the base of which endogenous intoxication in rats was studied. It was found out that products of alloy biological resorption don't cause toxic effects on tissues and don't enhance cell destruction, that is evidenced by the absence of signs of endogenous intoxication and oxidative damage of functional macromolecules.

Key words: magnesium, implant, toxicity.

Pathologia. 2013; №2 (28): 68–71

Травми посідають п'яте місце в структурі загальної захворюваності, четверте – серед причин інвалідності тих, хто працює, друге – серед усіх причин тимчасової непрацездатності і смертності, і перше місце – серед причин смертності населення працездатного віку [1]. У структурі причин первинної інвалідності хвороби кістково-м'язової системи посідають третє місце, поступаючись тільки хворобам органів дихання і злоякісним новоутворенням [1]. Постійне зростання первинної і загальної захворюваності від травм, їхніх наслідків і захворювань кістково-м'язової системи, високі показники пов'язаної з ними тимчасової непрацездатності роблять проблему лікування патології опорно-рухової системи пріоритетною в системі охорони здоров'я населення.

У результаті розвитку науки і техніки в сучасній травматології й ортопедії перевагу віддають активній оперативній тактиці лікування ушкоджень і захворювань опорно-рухової системи [2]. Для здійснення стабільної фіксації фрагментів кістки при виконанні відкритої репозиції переломів застосовують різні імплантати [2], для виготовлення яких широко використовують нержавіючі сталі, титан і титанові сплави, котрі є біоінертними матеріалами [2].

Застосування при остеосинтезі таких фіксаторів із

біоінертних металів потребує повторних оперативних втручань із видалення вже відпрацьованих фіксаторів, і нерідко такі втручання набагато травматичніші, ніж сам остеосинтез [3]. Також треба відзначити обмежене застосування таких металофіксаторів у дітей і підлітків, можливість бактеріального обсіменіння й відторгнення біоінертних імплантатів [3].

Тому актуальним залишається питання пошуку біодеградуючих матеріалів, придатних для створення імплантатів, що використовуються в остеосинтезі. Важливою є здатність таких матеріалів до повної метаболізації без патологічного впливу на прилеглі тканини і організм загалом.

У медицині біодеградуючі матеріали використовують достатньо давно, та справжній прорив відбувся лише наприкінці ХХ століття. За останні 30 років запропоновано понад 40 різних матеріалів для лікування, відновлення і заміни більше 40 різних частин людського тіла, включаючи шкірні покриви, м'язову тканину, кровоносні судини, нервові волокна, кісткову тканину. Однак вимоги до імплантатів, що використовуються в травматології й ортопедії, різко звужують коло можливих для застосування біодеградуючих матеріалів.

Магнієві сплави завдяки своїм характеристикам при-

датні для виготовлення різних типів імплантатів, їхній модуль пружності складає майже 45 ГПа, що найбільше відповідає механічним властивостям кістки [5].

Зараз на ринку представлено кілька комерційних сплавів, що мають подібні біокорозійні й механічні властивості, наприклад, МЛ-5 і МЛ-10 у вітчизняній промисловості і AZ91A, AZ91B, AZ91C, AZ91D, AZ91E, LAE442 на світовому ринку. Найчастіше в експериментах використовують сплав цирконію і магнію (AZ91) і сплав магнію і кальцію (LAE442) [6].

Недостатньо вивченим залишається питання токсичної дії сплавів на основі магнію на організм.

Мета роботи

Визначення можливої токсичної дії продуктів біокорозії модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 на живий організм.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували білих безпородних щурів-самців масою 220–270 г ($n=20$). Тваринам із дослідної групи ($n=14$) у м'язовий масив стегна імплантували фіксатор із модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10.

За контрольну групу взяли білих безпородних щурів-самців масою 230–250 г ($n=6$), яких не піддавали оперативному втручанню (інтактна група). Усі маніпуляції виконані відповідно до «Положення про використання тварин у біомедичних дослідках». Надалі щурів обох груп утримували в стандартних умовах віварію протягом 6 місяців.

Для встановлення факту, чи не є продукти біодеградації імплантату причиною виникнення ендогенної інтоксикації, у плазмі щурів оцінювали показники: ступінь окислювального ушкодження білків, вміст молекул середньої маси (МСМ), а також нуклеїнових кислот (НК). Крім того, оцінювали вміст у плазмі тварин стабільних метаболітів оксиду азоту.

В основі визначення ступеня окислювального ушкодження білків лежить реакція взаємодії окислених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідразиним із утворенням альдегідфенілгідрозонів (АФГ), що мають максимум поглинання при 270 нм, і кетонфенілгідрозонів (КФГ), що мають максимум поглинання при 363 нм. Результати виражали в умовних одиницях оптичної щільності у перерахунку на загальний білок з урахуванням коефіцієнта розведення проби.

В основі методу спектрофотометрії визначення сумарного вмісту нуклеїнових кислот, розробленого А.С. Спіріним, лежить екстракція їх із біологічного матеріалу гарячою хлорною кислотою з подальшим визначенням поглинання екстрактів в ультрафіолетовій області спектра при 270 і 290 нм.

Метод визначення молекул середньої маси (МСМ) ґрунтується на осадженні білків із досліджуваної рідини 10% розчином трихлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням і визначенням абсорбції світла супернатантом у 10 разів розведеним дистильованою водою. Завдяки наявності в структурі МСМ пептидних

зв'язків і циклічних амінокислот, вміст МСМ може бути встановлений за реєстрацією ефекту поглинання монохроматичного світлового потоку, викликаного ними. При цьому можливе виділення кількох фракцій МСМ, що виявляються при довжині хвилі 280 нм, 272 нм і 254 нм.

Кількісне визначення стабільних метаболітів оксиду азоту ґрунтується на спектрофотометрії барвника, що утворюється в ході реакції нітрит-іона з компонентами реактиву Грісса (розчин сульфаміду і N-(1-нафтил)-етилендіаміду в 2,5% оцтовій кислоті) у видимій і ультрафіолетовій частині спектра, оскільки азобарвник, що утворюється, має оптичну щільність, пропорційну концентрації нітрит-іонів.

Статистичну обробку результатів виконано методами математичної статистики із застосуванням пакета прикладних програм «Microsoft Excel 2003». Для кожної досліджуваної ознаки визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної помилки середнього арифметичного (m). За умови відповідності нормального розподілу достовірність отриманих відмінностей величин, що зіставляються, оцінювали з використанням t -критерію Ст'юдента і U -критерію Уїтні-Манна. Достовірність відмінностей відносних величин оцінювали із застосуванням критерію χ^2 . Достовірними вважали відмінності з рівнем значущості більше 95% ($p < 0,05$).

Результати та їх обговорення

Відомо, що явище ендогенної інтоксикації супроводжується підвищенням розпадом тканин, посиленнями процесами катаболізму, недостатністю функцій печінки і нирок, зниженням процесів мікроциркуляції, деструкцією клітинних і тканинних структур, руйнуванням білкових молекул [7]. Як зазначають багато дослідників, підвищення рівня МСМ є несприятливою прогностичною ознакою. У зв'язку з цим інтерес до визначення вмісту МСМ пояснюється високою біологічною активністю їх окремих фракцій, що інгібують гліколіз, глюконеогенез, пентозний цикл, синтез гемоглобіну, нуклеїнових кислот, мембранний транспорт, фагоцитоз, еритропоез, мікроциркуляцію, мають імунодепресивні, цитотоксичні, нейро- і психотропні властивості [8].

У результаті здійснених досліджень виявили достовірне (стосовно до інтактної групи) підвищення вмісту всіх фракцій середньомолекулярних пептидів у плазмі білих щурів, у м'язовий масив стегна яких імплантували фіксатор із модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 (табл. 1). Так, фракція пептидів, що мають максимум поглинання при 254 нм, у дослідній групі збільшилась у 1,19 раза, при 272 нм – в 1,3, а при 280 нм – в 1,27 раза. Таке збільшення свідчить лише про те, що імунна система тварин із магнієвими імплантатами знаходиться в реактивному стані і відповідає незначним викидом біологічно активних субстанцій у кровотік імунокомпетентними клітинами. При ендогенній інтоксикації цей показник зазвичай збільшується в десятки разів [9], чого не спостерігали протягом дослідження.

Згідно з даними попередніх досліджень точною прикладення ендотоксину є ендотеліальні клітини, активація

Вміст деяких маркерів ендогенної інтоксикації в крові білих безпородних щурів

Група	Нуклеїнові кислоти	Молекули середньої маси, уо			Стабільні метаболіти оксиду азоту мкмоль/л
		254 нм	272 нм	280 нм	
Інтактна, n=6	3,55±0,205	0,143±0,003	0,066±0,002	0,059±0,001	9,786±0,39
Дослідна, n=14	3,852±0,202	0,17±0,002*	0,086±0,002*	0,075±0,002*	13,696±0,62*

Примітка: * – зміни достовірні стосовно до показників інтактної групи (p<0,05).

Ступінь окислювальної модифікації білків плазми

Група	Спонтанна ОМБ, у.о./ г білка		Стимульована ОМБ, у.о./ г білка	
	АФГсп	КФГсп	АФГст	КФГст
Інтактна, n=6	2,843±0,117	1,9±0,083	5,192±0,136	2,87±0,117
Дослідна, n=14	3,555±0,124*	2,042±0,081	5,677±0,342	2,542±0,102

Примітка: * – зміни достовірні стосовно до показників групи інтактних тварин (p<0,05).

яких призводить до вивільнення ряду прозапальних чинників. Для регулювання судинного тонуусу і мікроциркуляції в ендотеліоцитах підтримується фоновий рівень експресії ендотеліальної NO-синтази. У фізіологічних умовах цей фермент продукує монооксид азоту – універсальний вазодилататор, але при стресових діях фермент може перемикається на продукцію токсичних метаболітів кисню. Метаболічним результатом цього є посилення окислювального ушкодження білків, ліпідів, посилення клітинної деструкції та інші патологічні процеси. Протягом експерименту (табл. 1) виявили незначні (в 1,4 раза) підвищення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту, що, ймовірно, свідчить про запуск адаптаційних сигнальних процесів, а не про патологічний стан. Підтвердженням припущення є експериментальні дані, що стосуються вмісту нуклеїнових кислот у плазмі тварин із магнієвими імплантатами (табл. 1).

Так, у дослідній та інтактній групах не виявлено достовірних відмінностей за цим показником, тобто немає підстав вважати, що продукти біодеградації імплантату провокують клітинне відмирання, адже тривалий час вважали: в плазмі крові рибонуклеїнові кислоти не можуть довго циркулювати у зв'язку з високим рівнем рибонуклеазної активності [9].

Механізми, що призводять до появи і забезпечують тривалу циркуляцію позаклітинних нуклеїнових кислот, як і їхні біологічні функції, нині досліджено недостатньо. За даними одних авторів, основними процесами, що призводять до появи циркулюючих нуклеїнових кислот, є апоптоз і некроз [10]. За даними інших дослідників, клітини можуть активно секретувати нуклеїнові кислоти, і цей процес також призводить до виникнення позаклітинних нуклеїнових кислот у кровотоку [11]. Одним із простих пояснень появи позаклітинних нуклеїнових кислот у крові можуть бути процеси відмирання клітин і деградації їх хроматину, що постійно відбуваються в організмі. Отже, першочерговим джерелом позаклітинної ДНК крові може бути некроз або апоптоз ядровмісних клітинних елементів крові, ендотеліальних клітин. Втім у деяких випадках, наприклад, при травмі, некроз може робити значний внесок у генерацію циркулюючої ДНК крові.

Інтерес до позаклітинної ДНК плазми крові нині все більше зростає, а це пов'язують із прогностичним і діагностичним значенням даного показника при посттравматичному синдромі. Крім того, визначено діагностичне значення концентрації циркулюючої в крові ДНК при оцінюванні тяжкості травми. Визначення концентрації ДНК у крові може бути використане для моніторингу ефективності хірургічного лікування. У виконаному дослідженні після закінчення піврічного терміну після операції вміст нуклеїнових кислот у плазмі повністю нормалізувався, а отже, є підстави вважати: інтенсивної клітинної деструкції у щурів із магнієвими імплантатами не відбувається.

Для детальнішої оцінки про- і антиоксидантних процесів, що відбуваються в організмі на тлі імплантованого фіксатора, вивчали ступінь окислювальної модифікації білків (ОМБ) плазми експериментальних тварин (табл. 2). Як відомо, оцінка спонтанного окислення білка характеризує окислювальний потенціал організму. Стимульована ОМБ характеризує ступінь резервно-адаптаційних можливостей організму. Альдегідфенілгідрозони вважають ранніми маркерами окислювальної деструкції білків. Кетондинітрофенілгідрозони – пізні маркери окислювальної деструкції білка, що у випадку спонтанної ОМБ характеризують ступінь окислювальної деструкції білкової молекули, а при стимульованій ОМБ свідчать про виснаження резервно-адаптаційних можливостей організму [12].

Не отримали достовірних відмінностей за вмістом у плазмі тварин дослідної та інтактної груп таких маркерів ОМБ, як молекули середньої маси, нуклеїнові кислоти і стабільні метаболіти оксиду азоту. Тільки вміст альдегідфенілгідрозонів у спонтанній пробі в 1,25 раза підвищився у щурів із біодеградуючими магнієвими імплантатами порівняно з інтактними щурами. Враховуючи усе різноманіття функцій білків в організмі, відсутність посилення їх окислення свідчить про нормальний перебіг метаболічних процесів і відсутність ознак ендогенної інтоксикації.

Висновки

1. Експериментально встановлено, що продукти біоко-розії модифікованого магнієвого сплаву МЛІ-10 не мають

токсичного впливу на тканини організму і не посилюють клітинної деструкції, про що свідчить відсутність ознак ендогенної інтоксикації і окислювального ушкодження функціональних макромолекул.

2. Поступова (протягом семи місяців) метаболізація металевих фіксаторів із біодеградуючого магнієвого сплаву МЛІ-10 організмом білих безпородних щурів-самців не супроводжувалась порушеннями фізіологічних проявів у експериментальних тварин.

3. Виходячи з результатів експерименту, можна говорити про сприятливий прогноз для можливості вивчення застосування металевих фіксаторів із біодеградуючого магнієвого сплаву МЛІ-10 у людини.

Список літератури

1. Мухаметов У.Ф. Морфологічне і клінічне обґрунтування застосування нових наноструктурних матеріалів у травматології й ортопедії: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / У.Ф. Мухаметов. – Уфа, 2010. – 23 с.
2. Мовшович І.А. Оперативная ортопедия / И.А. Мовшович. – М.: Медицина, 1983. – 416 с.
3. Ткаченко С.С. Остеосинтез полімерами [Електрон. ресурс] – 1993. – Режим доступу: http://bone-surgery.ru/view/osteosintez_polimerami/.
4. Біорезорбтивні властивості сплавів магнію / А.І. Чемирис, О.І. Цвирко, В.М. Чорний, В.А. Шаломєєв, Є.В. Яцун // Травма. – 2011. – Т. 12, №3. – С. 144–146.
5. Reifernath J. Magnesium Alloys as Promising Degradable Implant Materials in Orthopaedic Research, Magnesium Alloys. Corrosion and Surface Treatments / Reifernath J., Bornmann D., Meyer-Lindenberg A. // Frank Czerwinski [Електроний ресурс]. – 2001. – Available from: <http://www.intechopen.com/>.
6. Горбунов Н.В. Активация утворення окису азоту, опосередкована метаболічними глутаматними рецепторами в первинних культурах клітин зерен мозжечка / Н.В. Горбунов // Бюлетень експериментальної біології і медицини. – 1995. – №7. – С. 40–48.
7. Кузнецов Н.Н. Синдром ендогенної інтоксикації при критичних станах організму, нові діагностичні і прогностичні можливості / Н.Н. Кузнецов, Е.В. Девайкін, В.М. Єгоров // Анестезіологія і реаніматологія. – 1996. – №6. – С. 21–27.
8. Николайчик В.В. «Средние молекулы» – образование и способы определения / В.В. Николайчик, В.В. Кирковский, Г.А. Лобачова // Лабораторное дело. – 1989. – №8. – С. 31–33.
9. Peptides of the «middle molecules» group / E.V. Bannet, D. Chia, C. Restivo et al. // *Analyt. Biochem.* – 1994. – Vol. 86. – P. 271–278.
10. Derivation of a prediction rule for posttraumatic organ failure using plasma DNA and other variables / T.H. Rainer, Y.M. Lo, L.Y. Chan, N.Y. Lam, L.C. Lit, R.A. Cocks // *Ann N Y Acad Sci.* – 2001. – Vol. 945. – P. 211–220.
11. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients / M. Sanchez-Cespedes, M. Esteller, L. Wu, H. Nawroz-Danish, G.H. Yoo, W.M. Koch, J. Jen, J.G. Herman, D. Sidransky // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60. – P. 892–895.
12. Губський Ю.І. Токсичні наслідки окислювальної модифікації білків при різних патологічних станах / Ю.І. Губський, І.Ф. Беленічев, Є.В. Павлов // Суч. пробл. токсикол. – 2005. – №3. – С. 20–26.

Відомості про авторів:

Нерянов Ю.М., к. мед. н., доцент каф. травматології та ортопедії, перший проректор ЗДМУ.
Головаха М.Л., д. мед. н., професор, зав. каф. травматології та ортопедії ЗДМУ.
Беленічев І.Ф., д. біол. н., професор, зав. каф. фармакології та медрецептури.
Чорний В.М., к. мед. н., доцент каф. травматології та ортопедії ЗДМУ.
Яцун Є.В., асистент каф. травматології та ортопедії ЗДМУ.

Надійшла в редакцію 06.06.2013 р.