

УДК 616-089.2-092.9:599.323.4]:615.465-034.721.5

Особенности метаболизма лабораторных крыс при биодеградации имплантата из сплава на основе магния

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

Запорожский государственный медицинский университет. Украина

The article contains information on the study of possible toxic effects of products of biodegradation of an original magnesium-based alloy on laboratory rats. Laboratory methods of examination are described. Plasma biochemical parameters, which were used for assessing the endogenous intoxication in rats, are characterized. It was found out that biological resorption products of the alloy did not cause any toxic effects on tissues of the organism and did not increase cell destruction, as it was evidenced by absence of signs of endogenous intoxication and oxidative damage of functional macromolecules.

У статті подано інформацію про можливу токсичну дію продуктів біодеградації оригінального сплаву на основі магнію, вивчену на лабораторних щурах. Представлені лабораторні методи дослідження. Охарактеризовані біохімічні показники плазми, за якими оцінювали ендогенну інтоксикацію у щурів. Встановлено, що продукти біологічної резорбції сплаву не спричиняють токсичної дії на тканини організму і не посилюють клітинної деструкції, про що свідчить відсутність ознак ендогенної інтоксикації і окислювального ушкодження функціональних макромолекул.

Ключевые слова: магний, имплантат, токсичность

Введение

Травмы занимают пятое место в структуре общей заболеваемости, четвертое среди причин инвалидности у работающих, второе среди всех причин временной нетрудоспособности и смертности и первое среди причин смертности населения трудоспособного возраста [1]. В структуре причин первичной инвалидности заболевания костно-мышечной системы на третьем месте и уступают только болезням органов дыхания и злокачественным новообразованиям [1]. Постоянный рост первичной и общей заболеваемости от травм, их последствий и заболеваний костно-мышечной системы, высокие показатели связанной с ними временной нетрудоспособности делают проблему лечения патологии опорно-двигательной системы приоритетной в системе здравоохранения.

С развитием науки и техники в современной травматологии и ортопедии все большее предпочтение отдают активной хирургической тактике лечения повреждений и заболеваний опорно-двигательной системы [2]. Для осуществления стабильной фиксации фрагментов кости при проведении открытой репозиции переломов используют раз-

личные имплантаты [2]. В настоящее время для их изготовления широко используют нержавеющие стали, титан и титановые сплавы, которые являются биоинертными материалами [2].

Применение при остеосинтезе имплантатов из биоинертных металлов тем не менее требует повторных хирургических вмешательств, направленных на удаление выполнивших свою роль фиксаторов, что нередко является значительно более травматичным процессом, чем сам остеосинтез [3]. Кроме того, нужно отметить ограниченное применение таких металлофиксаторов у детей и подростков, бактериальное обсеменение и отторжение биоинертных имплантатов [3].

Поэтому остается актуальным вопрос поиска биодеградирующих материалов с целью создания имплантатов для остеосинтеза, которые могли бы полностью метаболизироваться, не оказывая при этом патологического воздействия на окружающие ткани и организм в целом.

В медицине биодеградирующие материалы применяют достаточно давно. Но настоящий прорыв произошел только в конце XX века. За последние 30 лет предложено более 40 различных материалов

для лечения, восстановления и замены более 40 частей человеческого тела, включая кожные покровы, кровеносные сосуды, нервные волокна, мышечную и костную ткани. Однако требования к имплантатам, применяемым в травматологии и ортопедии, резко ограничивают круг возможных для использования биodeградирующих материалов.

Магниевые сплавы, благодаря своим прочностным характеристикам, являются пригодными для изготовления различных типов имплантатов, их модуль упругости около 45 ГПа наиболее соответствует механическим свойствам кости [5].

Сегодня на рынке представлено несколько коммерческих сплавов, обладающих сходными биокоррозийными и механическими свойствами: МЛ-5 и МЛ-10 (в отечественной промышленности), AZ91A, AZ91B, AZ91C, AZ91D, AZ91E, LAE442 (на мировом рынке). Наиболее часто используют в экспериментах сплав циркония и магния (AZ91), а также магния и кальция (LAE442) [6].

Остается недостаточно изученным вопрос токсического воздействия на организм сплавов на основе магния.

Цель исследования: изучить особенности метаболизма лабораторных крыс в условиях биологической резорбции имплантата из сплава на основе магния.

Материал и методы

В работе использовали белых беспородных крыс-самцов массой 220–270 г ($n = 20$). Животным из опытной группы ($n = 14$) в мышечный массив бедра вживляли имплантат из модифицированного магниевого сплава МЛ-10.

В качестве контрольной группы использовали белых беспородных крыс-самцов массой 230–250 г ($n = 6$), не подвергавшихся хирургическому вмешательству (группа интакта). Все манипуляции были проведены согласно «Положения об использовании животных в биомедицинских исследованиях». В дальнейшем крысы обеих групп содержались в стандартных условиях вивария на протяжении 6 мес.

Для установления факта, не являются ли продукты биodeградации имплантата причиной возникновения эндогенной интоксикации, в плазме крыс оценивали такие показатели: степень окислительного повреждения белков, содержание молекул средней массы (МСМ), а также нуклеиновых кислот (НК). Кроме того, оценивали содержание в плазме животных стабильных метаболитов оксида азота.

В основе определения степени окислительного повреждения белков лежит реакция взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-дифенилгидразином с образованием альдегидфенилгидразонов (АФГ), имеющих максимум поглощения при 270 нм, и кетонфенилгидразонов (КФГ) с максимумом поглощения при 363 нм. Результаты выражали в условных единицах оптической плотности в пересчете на общий белок с учетом коэффициента разведения пробы [12].

Метод спектрофотометрического определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, разработанный А. С. Спириным, основан на экстракции их из биологического материала горячей хлорной кислотой с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм [12].

Метод определения молекул средней массы (МСМ) базируется на осаждении белков из исследуемой жидкости 10 % раствором трихлоруксусной кислоты с последующим центрифугированием и определением абсорбции света супернатантом, в 10 раз разведенным дистиллированной водой. Благодаря наличию в структуре МСМ пептидных связей, в том числе и циклических аминокислот, содержание МСМ может быть установлено по регистрации вызываемого ими эффекта поглощения монохроматического светового потока. При этом возможно выделение нескольких фракций МСМ, выявляемых при длине волны 280, 272 и 254 нм [8].

Количественное определение стабильных метаболитов оксида азота основано на спектрофотометрии образующегося в процессе реакции нитрит-иона с компонентами реактива Грисса (раствор сульфаниламида и N-(1-нафтил)-этилендиамида в 2,5 % уксусной кислоте) азокрасителя в видимой и ультрафиолетовой части спектра, т. к. он имеет оптическую плотность, пропорциональную концентрации нитрит-ионов [6].

Статистическую обработку результатов проводили методами математической статистики с применением пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2003». Для каждого исследуемого признака определяли показатели среднего арифметического (M) и его стандартной ошибки (m). При условии соответствия нормальности распределения достоверность полученных различий сопоставляемых величин оценивали с использованием t -критерия Стьюдента и U -критерия Уитни-Манна. Достоверность отличий относительных величин оценивали с применением критерия χ^2 . Достоверными считали отличия с уровнем значимости более 95 % ($p \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Как известно, явление эндогенной интоксикации сопровождается повышенным распадом тканей,

Таблица 1. Содержание некоторых маркеров эндогенной интоксикации в крови белых беспородных крыс

Группа	Нуклеиновые кислоты, мкг/мл	Молекулы средней массы, у.е.			Стабильные метаболиты оксида азота, мкмоль/л
		254 нм	254 нм	280 нм	
Интакт, n = 6	3,550 ± 0,205	0,143 ± 0,003	0,066 ± 0,002	0,059 ± 0,001	9,786 ± 0,390
Опыт, n = 14	3,852 ± 0,202	0,170 ± 0,002*	0,086 ± 0,002*	0,075 ± 0,002*	13,696 ± 0,620*

Примечание. * — изменения достоверны по отношению к группе интакта ($p < 0,05$)

усиленными процессами катаболизма, недостаточностью функции печени и почек, снижением процессов микроциркуляции, деструкции клеточных и тканевых структур, разрушением белковых молекул [7]. Как указывают многие авторы, повышение уровня МСМ является неблагоприятным прогностическим признаком. В этой связи наш интерес к определению содержания МСМ объясняется высокой биологической активностью их отдельных фракций, которые ингибируют гликолиз, глюконеогенез, пентозный цикл, синтез гемоглобина, нуклеиновых кислот, мембранный транспорт, функцию фагоцитов, эритропоэз, микроциркуляцию, обладают иммунодепрессивными, цитотоксическими, нейро- и психотропными свойствами [8].

В результате проведенных исследований мы обнаружили достоверное (по отношению к группе интакта) повышение содержания всех фракций средномолекулярных пептидов в плазме крыс, в мышечный массив бедра которых вживляли имплантат из модифицированного магниевого сплава МЛ-10 (табл. 1). Так, фракция пептидов, имеющих максимум поглощения при 254 нм в опытной группе увеличилась в 1,19 раза, при 272 нм — в 1,3 раза, а при 280 нм — в 1,27 раза. Такое повышение свидетельствует лишь о том, что иммунная система животных с магниевыми имплантатами находится в реактивном состоянии и отвечает незначительным выбросом иммунокомпетентными клетками биологически активных субстанций в кровотока. При эндогенной интоксикации этот показатель обычно увеличивается в десятки раз [9], чего не выявлено в нашем случае.

Согласно данным ранее проводимых исследований точкой приложения эндотоксина являются эндотелиальные клетки, активация которых приводит к высвобождению ряда провоспалительных факторов. Для регулирования сосудистого тонуса и микроциркуляции в эндотелиоцитах поддерживается фоновый уровень экспрессии эндотелиальной NO-синтазы. В физиологических условиях этот фермент продуцирует монооксид азота — универсальный вазодилататор, но при стрессовых воздействиях фермент может переключаться на продукцию токсических метаболитов кислорода.

Метаболическим результатом этого является усиление окислительного повреждения белков, липидов, клеточной деструкции и другие патологические процессы. По данным нашего эксперимента (табл. 1), обнаружено незначительное (в 1,4 раза) повышение содержания стабильных метаболитов оксида азота, что свидетельствует скорее о запуске адаптационных сигнальных процессов, нежели о патологическом состоянии.

В подтверждение этого предположения свидетельствуют экспериментальные данные, касающиеся содержания НК в плазме животных с магниевыми имплантатами (табл. 1). Так, в опытной и интактной группах не обнаружено достоверных отличий этого показателя, а значит нет оснований полагать, что продукты биодеградации имплантата провоцируют клеточную гибель, ведь долгое время считалось, что в плазме крови рибонуклеиновые кислоты не могут долго циркулировать в связи с высоким уровнем рибонуклеазной активности [9]. Механизмы, приводящие к появлению и обеспечивающие долговременную циркуляцию внеклеточных НК, равно как и их биологические функции, в настоящее время мало исследованы. По данным одних авторов, основными механизмами, приводящими к появлению циркулирующих НК, являются апоптоз и некроз [10]. По мнению других, в этот процесс вносит вклад активная секреция клетками нуклеиновых кислот [11]. Одним из простых объяснений появления внеклеточных НК в крови могут быть постоянно идущие в организме процессы отмирания клеток и деградации их хроматина. Таким образом, в первую очередь источником внеклеточной ДНК крови может быть некроз или апоптоз ядродержащих клеточных элементов крови, эндотелиальных клеток. Тем не менее, в некоторых случаях, например при травме, некроз может играть значительную роль в генерации циркулирующих ДНК крови. Интерес к внеклеточной ДНК плазмы крови сегодня все более возрастает, что связано с прогностической и диагностической значимостью этого показателя при посттравматическом синдроме. Кроме того, определение концентрации ДНК в крови используют для оценки тяжести травмы и мониторинга эффективности хирургического

Таблица 2. Степень окислительной модификации белков плазмы

Группа	Спонтанная ОМБ, у.е./г белка		Стимулированная ОМБ, у.е./г белка	
	АФГсп	КФГсп	АФГст	КФГст
Интакт, n = 6	2,843 ± 0,117	1,9 ± 0,083	5,192 ± 0,136	2,87 ± 0,117
Опыт, n = 14	3,555 ± 0,124*	2,042 ± 0,081	5,677 ± 0,342	2,542 ± 0,102

Примечание. * — изменения достоверны по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$)

лечения. В нашем случае через полгода после операции содержание нуклеиновых кислот в плазме полностью нормализовалось, а это дает основание полагать, что интенсивной клеточной деструкции у крыс с магниевыми имплантатами не происходит.

Для более полной оценки про- и антиоксидантных процессов, протекающих в организме на фоне вживления имплантата, мы изучили степень окислительной модификации белков (ОМБ) плазмы экспериментальных животных (табл. 2). Известно, что оценка спонтанного окисления белка отражает окислительный потенциал организма. Стимулированная ОМБ характеризует степень резервно-адаптационных возможностей организма. Альдегидфенилгидразоны (АФГ) считают более ранними маркерами окислительной деструкции белков, а кетондинитрофенилгидразоны (КФГ) — поздними. КФГ характеризуют в случае спонтанной ОМБ степень окислительной деструкции белковой молекулы, а при стимулированной ОМБ свидетельствуют об истощении резервно-адаптационных возможностей организма [12].

Достоверных отличий содержания в плазме животных опытной и интактной групп таких маркеров ОМБ, как МСМ, НК и стабильные метаболиты оксида азота, получено не было. Только содержание АФГ в спонтанной пробе повысилось в 1,25 раза у крыс с биодеградирующими магниевыми имплантатами по сравнению с интактными крысами. Учитывая многообразие функций, выполняемых белками в организме, отсутствие усиления их окисления говорит о нормально протекающих метаболических процессах без признаков эндогенной интоксикации.

Выводы

Экспериментально установлено, что продукты биокоррозии модифицированного магниевого сплава МЛ-10 не оказывают токсического действия на ткани организма и не усиливают клеточную деструкцию, о чем свидетельствует отсутствие признаков эндогенной интоксикации и окислительного повреждения функциональных макромолекул.

Постепенная (в течение 7 мес.) метаболизация металлических фиксаторов из биодеградирующего магниевого сплава МЛ-10 в организме белых

беспородных крыс-самцов сопровождалась отсутствием нарушений физиологических проявлений у экспериментальных животных. Исходя из результатов эксперимента можно сделать благоприятный прогноз для возможности изучения применения металлических фиксаторов из биодеградирующего магниевого сплава МЛ-10 у человека.

Список литературы

1. Мухаметов У. Ф. Морфологическое и клиническое обоснование применения новых наноструктурных материалов в травматологии и ортопедии: автореф. дис. на соискание ученой степени докт. мед. наук / У. Ф. Мухаметов. — Уфа, 2010. — 23 с.
2. Мовшович И. А. Оперативная ортопедия / И. А. Мовшович. — М.: Медицина, 1983. — 416 с.
3. Ткаченко С. С. Остеосинтез полимерами [Электрон. ресурс] / С. С. Ткаченко. — 1993. — Режим доступа: http://bone-surgery.ru/view/osteosintez_polimerami/.
4. Биорезорбтивные свойства сплавов магния / А. И. Чемирис, Э. И. Цвирко, В. Н. Черный [и др.] // Травма. — 2011. — Т. 12, № 3. — С. 144–146.
5. Reifennath J. Magnesium alloys as promising degradable implant materials in orthopaedic research, magnesium alloys [Электронный ресурс] / J. Reifennath, D. Bormann, A. Meyer-Lindenberg // Corrosion and surface treatments // Frank Czerwinski. — 2001. — Available from: <http://www.intechopen.com/>.
6. Горбунов Н. В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток зерен мозжечка / Н. В. Горбунов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1995. — № 7. — С. 40–48.
7. Кузнецов Н. Н. Синдром эндогенной интоксикации при критических состояниях организма, новые диагностические и прогностические возможности / Н. Н. Кузнецов, Е. В. Девайкин, В. М. Егоров // Анестезиология и реаниматология. — 1996. — № 6. — С. 21–27.
8. Николайчик В. В. «Средние молекулы» — образование и способы определения / В. В. Николайчик, В. В. Кировский, Г. А. Лобачева // 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 et al. // *Ann. NY 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 et al. // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 892–895.
12. Губский Ю. И. Токсические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю. И. Губский, И. Ф. Беленичев, С. В. Павлов // Сучасні проблеми токсикології — 2005. — № 3. — С. 20–26.