

УДК 615.465-034.721.5:616-089.2-092.9:599.323.4](045)

Экспериментальная оценка общетоксического действия имплантатов из сплава на основе магния

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

Запорожский государственный медицинский университет. Украина

On the basis of previous studies we have proposed a new material, which is produced by alloying with silver of industrial magnesium alloy ML-10. But question about impact of products of the resolution of magnesium alloy on organism has not been fully elucidated. Objective: to evaluate experimentally general toxic effect of magnesium-based alloy implants on rats. Materials: Material of this study were experimental animals (n = 14) with above mentioned implants injected into the thigh muscles and intact (n = 6) rats. We investigated the performance of protein and nitrite in urine as well as behavioral responses. Results: The results of the study of the dynamics of change in body weight of animals showed no signs of intoxication, and during the regular studies of the scalp and mucous membranes any abnormalities were not detected. In assembled urine of animals with help of the metabolic chamber there were found only traces of protein. There was not found any significant differences of nitrite content in daily urine in intact and experimental groups in terms of monitoring. Evaluation of the tentative research behavior in the «open field» showed that on the 2nd day after surgery the overall rate of locomotor activity and research behavior in rats with implants decreased on 60.6% which may be explained by surgical trauma. Subsequently, indicators of locomotor activity in experimental and intact groups did not differ significantly which is important in terms from 2 to 6 months after surgery when one may expect maximum toxic effect from biodegradation of alloy. Conclusions: These results show an absence of toxic effects of products of biodegradation of magnesium-based alloy. They may serve as experimental rationale for clinical testing of implants made of this alloy. Key words: magnesium, osteosynthesis, intoxication, rats.

Раніше на підставі проведених досліджень ми запропонували новий матеріал, який отримують шляхом легування сріблом промислового сплаву магнію МЛ-10. Проте повністю не з'ясоване питання впливу продуктів розсмоктування сплаву магнію на організм. Мета роботи: вивчити в експерименті на щурах загальнотоксичну дію імплантатів зі сплаву на основі магнію. Матеріалом роботи стали експериментальні тварини (n = 14), яким у м'язи стегна вводили зазначені імплантати, та інтактні (n = 6) щури. Досліджували показники рівня білка і нітритів у сечі, а також поведінкові реакції. Результати вивчення динаміки зміни маси тіла тварин показали відсутність ознак інтоксикації, а під час регулярних спостережень за станом волосяного покриву і слизових не виявлено відхилень від норми. У зібраній за допомогою метаболічної камери сечі тварин виявлені лише сліди білка. Не встановлено достовірних відмінностей змісту нітритів у добовій сечі тварин інтактної і дослідної груп на термінах спостереження. Вивчення орієнтовно-дослідної поведінки в умовах «відкритого поля» показало, що на 2-у добу після операції в щурів з імплантатами знижувався сумарний показник рухової активності та дослідницької поведінки на 60,6 %, що можна пояснити операційною травмою. Надалі показники рухової активності дослідної та інтактної груп істотно не відрізнялися, що важливо в терміни від 2 до 6 міс. після операції, коли можна очікувати максимальний токсичний ефект біодеградації сплаву. Отримані результати демонструють відсутню токсичну дію продуктів біодеградації досліджуваного сплаву на основі магнію і є експериментальним обґрунтуванням для проведення клінічної апробації імплантатів з нього. Ключові слова: магній, остеосинтез, інтоксикація, щури.

Ключевые слова: магний, остеосинтез, интоксикация, крысы

Введение

В результате проведенных нами исследований предложен новый материал, получаемый путем легирования серебром промышленного сплава магния МЛ-10 [1, 2]. Несмотря на большое коли-

чество исследований, остается не до конца выясненным вопрос влияния продуктов рассасывания сплава магния на организм, что и послужило основанием для проведения данной работы. Магний в организме содержится в основном в виде солей

(в сыворотке крови, эритроцитах, скелете). Содержание магния в клетках многократно превышает его количество во внеклеточной жидкости. Он участвует в обменных процессах, тесно взаимодействуя с калием, натрием и кальцием, является активатором множества ферментативных реакций. Магний участвует в синтезе жирных кислот и белка, активации аминокислот, фосфорилировании глюкозы и ее производных по гликолитическому пути, окислительном декарбоксилировании цитрата. Нормальный уровень магния в организме необходим для обеспечения «энергетики» жизненно важных процессов: регуляции нервно-мышечной проводимости, тонуса гладкой мускулатуры (сосудов, кишечника, желчного и мочевого пузырей и т. д.). Магний требуется для формирования циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), он играет эссенциальную роль во многих фундаментальных клеточных реакциях, поэтому его дефицит может приводить к серьезным биохимическим и клиническим изменениям. Биологическое действие магния связано с секрецией и действием гормона паращитовидной железы, метаболизмом витамина D и функцией костной ткани. Магний известен также и как противострессовый биоэлемент, способный создавать положительный психологический настрой. Магний укрепляет иммунную систему, обладает антиаритмическим действием, способствует восстановлению сил после физических нагрузок. Комплексные соединения магния поступают в печень, где используются для синтеза биологически активных соединений [3–5].

В организме взрослого человека содержится около 140 г магния (0,2 % от массы тела), причем 2/3 от этого количества приходится на костную ткань. Главное «депо» магния находится в костях и мышцах. Магний нетоксичен. Летальная доза для человека не определена. При концентрациях магния в крови от 15 до 18 мг наступает сон.

Выводится магний из организма в основном с мочой и потом. Почки играют ключевую роль в гомеостазе магния. Приблизительно 75 % магния сыворотки фильтруется в почечных клубочках. Нарушение фильтрации уменьшает количество магния, поступающего в каналцы. Серьезное снижение функции клубочков служит причиной повышения концентрации магния в сыворотке и может привести к нарушению биохимических процессов. Именно поэтому необходимо установить биологическую безопасность продуктов биодеградации имплантатов, изготовленных из магниевых сплавов.

Цель работы: изучить в хроническом эксперименте на крысах общетоксическое действие про-

дуктов биодеградации имплантатов из сплава на основе магния.

Материал и методы

Модифицированный сплав на основе магния, получаемый путем легирования серебром стандартного магниевых сплава МЛ-10, создан с целью изготовления конструкций для остеосинтеза [1]. Ранее было проведено морфологическое исследование влияния имплантата из такого же сплава на остеогенез [6, 7].

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 магниевых сплава. 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 про використання тварин у біомедичних досліджах» [2]. Крысы обеих групп содержались в стандартных условиях вивария.

Наблюдения за животными, перенесшими манипуляцию по вживлению имплантата, осуществляли в течение 6 мес. Для выявления возможных признаков интоксикации проводили регулярное взвешивание животных (два раза в месяц), следили за их двигательной и жизненной активностью, характером потребления воды и пищи, состоянием волосяного покрова и слизистых оболочек [5]. При оценке изменений, наблюдаемых у животных в хроническом токсикологическом эксперименте, нужно было исключить возможное влияние всех побочных факторов, не связанных с предметом изучения (заболевание животных, их питание, содержание и т. п.), поэтому условия содержания и характер питания лабораторных крыс соответствовал существующим стандартам [7]. Для выявления нарушений мочевыделительной системы исследовали мочу животных на предмет содержания в ней белка и нитритов. Белок определяли стандартным биохимическим методом с использованием биуретового реактива. Содержание нитритов изучали с применением реактива Грисса. Для изучения поведенческих реакций с точки зрения токсикологии мы проводили тест «открытое поле» [2, 9]. Он заключается в исследовании двигательного компонента ориентировочной реакции и эмоциональной реактивности животных, перенесших операцию по вживлению магниевых имплантатов. Тест позволяет оценить выраженность и динамику отдельных поведенческих элементов, уровень эмоционально-поведенческой

реактивности животного («седацию-ажитацию»), привыкание, симптомы неврологического дефицита, локомоторную стереотипию, двигательную и исследовательскую активность, эмоциональное состояние. «Открытое поле» (ОП) часто используют как скрининговый тест. В токсикологических исследованиях метод применяют для выявления минимальных отклонений в организме животного, вызываемых токсическими агентами. Обычно в тесте ОП регистрируют горизонтальную и вертикальную двигательную активность, груминг (чистку шерсти), обнюхивание отверстий, дефекацию. Кроме того, в ОП удобно наблюдать за отклонениями в моторной сфере, такими как шаткость походки, тремор и т. п. Горизонтальная двигательная активность (ГДА) животных в ОП включает пробежки по разным траекториям вплоть до кружения вокруг одного места. Основным критерием для идентификации такой формы поведения является участие в перемещении животного всех четырех лап. Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в ОП представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (Climbing) или остаются на весу (Rearing). Уровень дефекации считается индексом «эмоциональности» животного.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Statistika 5,5» и «MS Excel».

Результаты и их обсуждение

Регистрация динамики массы животных (рис. 1) показала его снижение на 7 % у крыс опытной группы в течение первых двух недель после операции, что, по нашему мнению, связано с хирургической травмой и болью в месте вмешательства, а не вызвано токсическим влиянием продуктов биодegradации имплантатов.

При этом следует отметить, что обе группы животных имели свободный доступ к воде и пище и содержались на стандартном рационе питания. Дальнейшие наблюдения за крысами опытной группы показали существенное улучшение их аппетита и значительный прирост массы (рис. 1) по сравнению с первоначальными значениями изучаемого показателя. Таким образом, динамика изменения массы тела свидетельствует об отсутствии признаков интоксикации.

Кроме того, регулярное наблюдение за состоянием волосяного покрова и слизистых не выявило каких-либо отклонений от нормы.

Об отсутствии признаков токсического влияния на мочевыделительную систему продуктов

биодegradации имплантатов свидетельствует тот факт, что в моче животных, собранной при помощи метаболической камеры, были обнаружены лишь следы белка (рис. 2, а).

Протеинурия — один из важных лабораторных признаков патологии почек. Через мембрану почечных клубочков в норме большая часть белков не проходит, что объясняется большим размером белковых молекул, а также их зарядом и строением. При минимальных повреждениях в клубочках почек наблюдается прежде всего потеря низкомолекулярных белков (преимущественно альбумина), поэтому при большой потере белка часто развивается гипоальбуминемия. При выраженных патологических изменениях в моче попадают и более крупные белковые молекулы. В наших токсикологических исследованиях достоверных отличий по данному критерию между интактными и прооперированными крысами не выявлено.

Изучение содержания нитритов (стабильных метаболитов оксида азота) показало отсутствие достоверных отличий между животными интактной и опытной групп в 1-й день эксперимента, а также через 4, 5 и 6 мес. после хирургического вмешательства. Наиболее значимое повышение значений этого параметра по сравнению с группой интакта отмечали на 2 и 14-й дни эксперимента, а также через месяц после операции соответственно на 63, 52 и 61 % (рис. 2, б). Такую тенденцию можно считать благоприятным прогнозом при условии отсутствия признаков оксидативного стресса, поскольку оксид азота на сегодня считается одним из основных вазодилататоров, способствующим улучшению трофики тканей и органов.

Показатель объема суточного диуреза в опытной группе также достоверно превышал соответствующие значения данного параметра интактных животных только через 1 и 2 мес. после хирургического вмешательства (рис. 3) на 23 и 31 % соответственно.

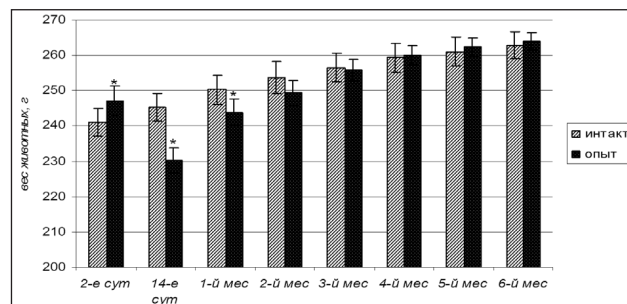


Рис. 1. Диаграмма динамики массы животных опытной и контрольной групп после операции (изменения достоверны по отношению к группе интактных крыс ($p < 0,05$))

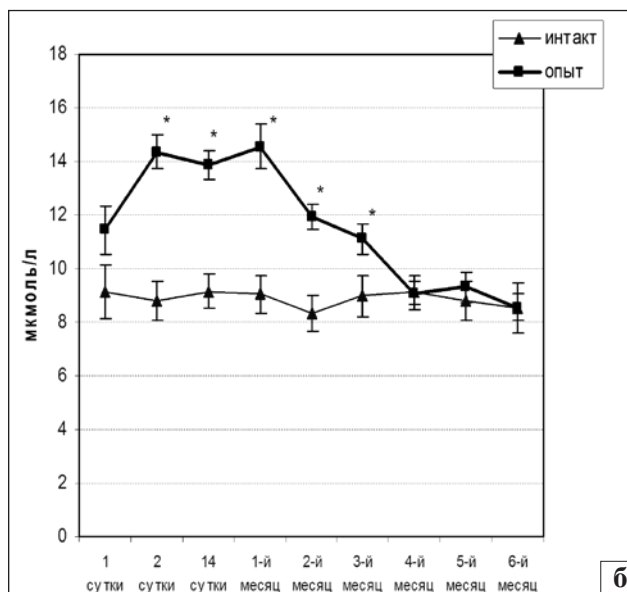
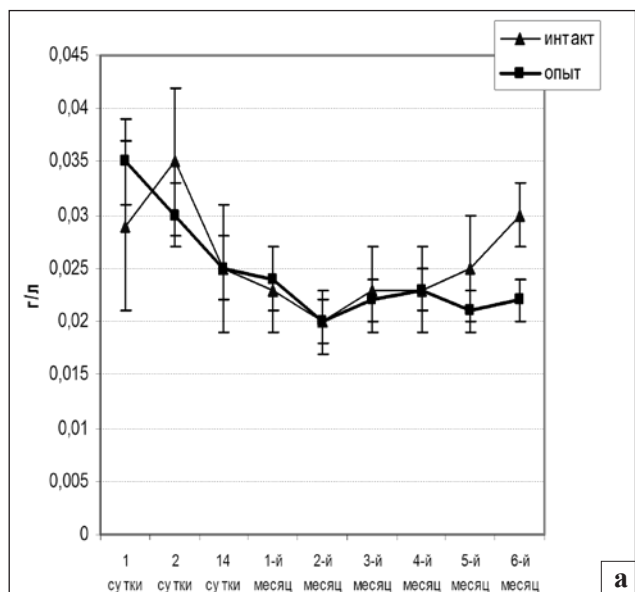


Рис. 2. Диаграммы содержания общего белка (а) и нитритов (б) в суточной моче крыс (изменения достоверны по отношению к группе интактных крыс ($p < 0,05$))

Изучение ориентировочно-исследовательского поведения в условиях «открытого поля» (рис. 4) показало снижение суммарного показателя двигательной активности и исследовательского поведения на 60,6 % на 2-е сутки после операции у крыс с имплантатами. На 14-й день после операции активность животных из опытной группы немного повысилась, но была достоверно ниже (на 35,3 %), чем в группе интактных крыс (рис. 4). Это явление можно объяснить операционной травмой. В дальнейшем показатели двигательной активности опытной и интактной групп существенно не отличались. Особенно это показательно в сроки со 2 по

6 мес. после операции, когда можно было ожидать максимальный токсический эффект биодеградации сплава на основе магния.

Анализ отдельно взятых показателей двигательной активности в «открытом поле» выявил наименьшую ГДА и ВДА у крыс с имплантатами на 2-й день после операции (таблица). Так, ГДА была в 3,5 ниже чем в интактной группе, а ВДА — в 2,5 раза ($p < 0,05$). Исследовательская активность (обследование отверстий) также существенно снизилась на 2-е сутки после операции (в 3,9 раза). Сходная тенденция сохранилась и на 14-й день эксперимента (таблица), несмотря на некоторый прирост изучаемых показателей.

Анализируя горизонтальную двигательную активность следует отметить, что на протяжении первых двух месяцев эксперимента прооперированные животные избегали центра арены, перемещаясь в основном по периферии. Крысы интактной группы

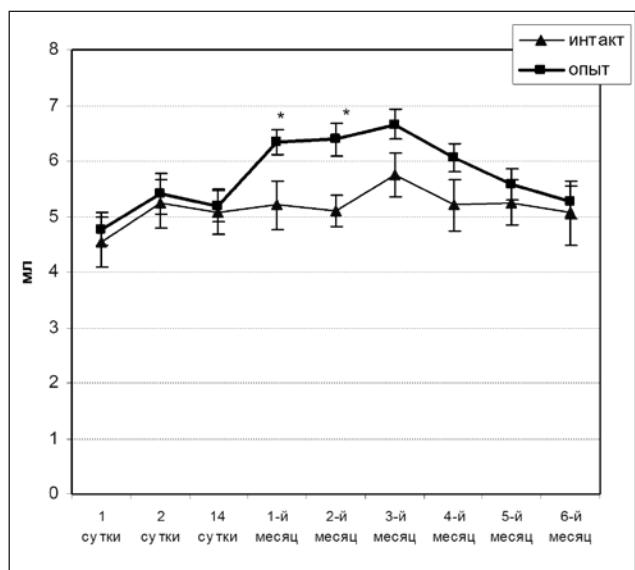


Рис. 3. Диаграмма объема суточного диуреза крыс (изменения достоверны по отношению к группе интактных крыс ($p < 0,05$))

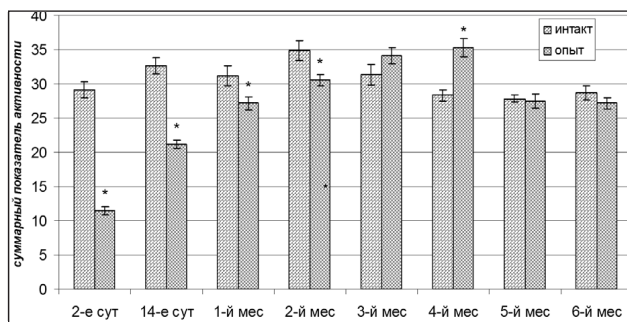


Рис. 4. Диаграмма динамики суммарной и двигательной и исследовательской активности крыс (изменения достоверны по отношению к группе интактных крыс ($p < 0,05$))

Таблица

Ориентировочно-исследовательское поведение и двигательная активность животных в условиях «открытого поля»

Срок после операции	Группа животных	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Груминг	Обследование отверстий	Количество актов дефекации
2-е сутки	Опыт (n = 14)	4,07 ± 0,32*	1,86 ± 0,25*	2,43 ± 0,33	1,14 ± 0,23*	2 ± 0,21
	Интакт (n = 6)	14,33 ± 0,71	4,67 ± 0,49	3,33 ± 0,33	4,5 ± 0,43	2,33 ± 0,33
14-е сутки	Опыт (n = 14)	6,21 ± 0,41*	4,64 ± 0,36*	4,36 ± 0,37	3 ± 0,26*	2,93 ± 0,19
	Интакт (n = 6)	14,17 ± 0,94	6,33 ± 0,49	5,33 ± 0,49	4 ± 0,37	2,83 ± 0,31
1-й мес.	Опыт (n = 14)	10,43 ± 0,57	5,57 ± 0,39	5 ± 0,28	3,64 ± 0,25*	2,5 ± 0,14
	Интакт (n = 6)	12 ± 0,58	5,83 ± 0,48	6,17 ± 0,54	5 ± 0,37	2,17 ± 0,31
2-й мес.	Опыт (n = 14)	12,5 ± 0,50	5,93 ± 0,37	5,5 ± 0,39	4,21 ± 0,26*	2,43 ± 0,20
	Интакт (n = 6)	13,33 ± 0,80	6,5 ± 0,43	5,83 ± 0,54	6,33 ± 0,49	2,33 ± 0,33
3-й мес.	Опыт (n = 14)	13,86 ± 0,58*	6,64 ± 0,37	5,86 ± 0,39	5,5 ± 0,25	2,21 ± 0,21
	Интакт (n = 6)	11,67 ± 0,84	7 ± 0,58	6 ± 0,45	4,67 ± 0,61	2 ± 0,26
4-й мес.	Опыт (n = 14)	14,5 ± 0,51*	7 ± 0,42	5,71 ± 0,37	6,14 ± 0,33*	1,93 ± 0,22
	Интакт (n = 6)	11 ± 0,52	6,33 ± 0,42	5,33 ± 0,33	4,33 ± 0,49	1,33 ± 0,21
5-й мес.	Опыт (n = 14)	11,21 ± 0,63	5,43 ± 0,37	4,86 ± 0,21	3,71 ± 0,32	2,28 ± 0,22
	Интакт (n = 6)	12 ± 0,58	5,17 ± 0,31	4,83 ± 0,31	4 ± 0,58	1,83 ± 0,31
6-й мес.	Опыт (n = 14)	10,78 ± 0,48	5,5 ± 0,31	5 ± 0,26	3,93 ± 0,32	1,93 ± 0,22
	Интакт (n = 6)	11,67 ± 0,56	5,83 ± 0,48	5,33 ± 0,42	4,17 ± 0,48	1,67 ± 0,21

Примечание.* — достоверность отличий по сравнению с группой интактных крыс ($p < 0,05$).

в процессе обследования пространства достоверно чаще пересекали квадраты в центральной части арены. Выход животного в центр арены в тесте ОП считается показателем относительно низкого уровня мотивации страха-тревоги. И обнаруживаемая на начальных этапах наблюдения боязнь открытого пространства у крыс с магниевыми имплантатами, которая заставляла животных воздерживаться от выхода в центр поля, существенно снизилась, начиная со 2-го мес. наблюдений. На 4-м мес. горизонтальная двигательная активность у крыс с магниевыми имплантатами уже достоверно превышала аналогичный показатель в группе интакта на 31,8 %. При этом значительно возросло количество выходов оперированных крыс в центр арены, что вероятнее всего свидетельствует о некотором седативном эффекте продуктов биодegradации имплантатов.

Подобная тенденция зафиксирована и относительно уровня эмоциональности, который выявляют по количеству актов дефекации (таблица). Наибольшие значения показателя эмоциональности отмечали на 14-й день после операции, причем достоверных отличий между контрольной и опытной группами выявлено не было. В дальнейшем уровень эмоциональности как в контрольной, так и в опытной группах постепенно снижался, что возможно связано с привыканием животных к условиям тестирования.

Еще одним показателем проявления мотивации страха-тревоги у грызунов является число эпизодов «замирания», когда животное сохраняет полную не-

подвижность в течение определенных промежутков времени. По нашим наблюдениям, к 3–4-му мес. эксперимента существенно уменьшилось число «замираний» у крыс из опытной группы. Статистическая обработка показала отсутствие достоверных отличий в опытной и интактной группах еще по одному из важнейших критериев эмоциональности животных — грумингу (чистке шерсти) на всех этапах наблюдения (таблица).

Чистка шерсти — важный компонент поведения крысы вообще, и в тесте ОП в частности. Груминг как элемент врожденного поведения грызунов имеет биологическое значение для поддержания чистоты шерстного покрова. Однако уже давно было показано, что у грызунов эпизоды груминга учащаются в обстановке, вызывающей у животного испуг и тревогу. В соответствии с классическими взглядами Н. Тинбергена, было высказано предположение, что груминг, в особенности в условиях помещения животного в новую обстановку, есть проявлением конфликта между исследовательской мотивацией и мотивацией страха-тревоги. Считают, что у крыс груминг в умеренно пугающей обстановке отражает уровень тревоги животного, точнее некий баланс между тревогой и исследовательской активностью, являясь, по терминологии этологов, «смещенной реакцией».

Дальнейшие наблюдения за выраженностью и динамикой отдельных поведенческих элементов показали постепенное увеличение всех видов двигательной и исследовательской активности у крыс с магниевыми имплантатами. Начиная со 2-го мес.

после операции, практически по всем изучаемым критериям активности не было достоверных отличий между животными опытной и интактной групп. Регистрация ГДА в опытной группе показала достоверное ($p < 0,05$) ее увеличение на 3 и 4-м мес. эксперимента (в 1,2 и 1,3 раза соответственно) по сравнению с группой интакта. В 1,4 раза повысилась активность обследования отверстий в группе оперированных животных на 4-м мес. эксперимента в сравнении с группой интакта. Отсутствие нейротоксичности продуктов биодеградации имплантатов подтверждено общим неврологическим статусом животных (высоким уровнем эмоционально-поведенческой реактивности, отсутствием симптомов неврологического дефицита, высокой двигательной и исследовательской активностью, локомоторной стереотипией и эмоциональным состоянием).

Выводы

Проведенная регистрация специфических и неспецифических симптомов интоксикации по изучению биологической безопасности продуктов биодеградации магниевых имплантатов показала отсутствие протеинурии и повышения содержания нитритов в моче в динамике. Не обнаружено неблагоприятное влияние на интегративные показатели животных (отсутствие изменений в потреблении пищи и воды, массы животных, температуры тела, цвета глаз, слизистых оболочек, шерсти). Отсутствие нейротоксичности подтвердил неврологический статус животных — в пределах физиологической нормы двигательная и ориентировочно-исследовательская активность, сон, психо-эмоциональное состояние, основные рефлексы, отсутствие признаков неврологического и когнитивного дефицита.

Полученные результаты демонстрируют отсутствие токсического действия продуктов биодеградации изучаемого сплава на основе магния и являются экспериментальным обоснованием для проведения клинической апробации имплантатов из сплава на его основе.

Список литературы

1. Пат. 66702 Україна, МПК С22С 23/00. Біодеградуючий ливарний сплав на основі магнію для остеосинтезу / Богуслаєв В. О., Беліков С. Б., Колесник Ю. М. та ін.; заявник та патентовласник Публічне Акціонерне товариство «Мотор Січ». — № u201108693; заявл. 11.07.2011; опубл. 10.01.2012; Бюл. № 1.
2. Морфогенез репаративної регенерації кісткової тканини в умовах застосування магній-резорбуючих імплантатів / С. І. Тертишний, К. Л. Дикий, М. Л. Головаха, В. М. Чорний, Є. В. Яцун // Патологія. — 2012. — Т. 24, № 1. — С. 85–88.
3. Верткин А. Л. Применение магния в кардиологии / А. Л. Верткин, В. В. Городецкий // Кардиология. — 1997. — Т. 37, № 11. — С. 96–99.
4. Городецкий В. В. Препараты магния в медицинской практике. Малая энциклопедия магния / В. В. Городецкий, О. Б. Талибов. — М.: Медпрактика, 2004. — 46 с.
5. Школьникова М. А. Метаболизм магния и терапевтическое значение его препаратов. Пособие для врачей / М. А. Школьникова. — М.: Медпрактика, 2002. — 32 с.
6. Дослідження токсичної дії продуктів біодеградації оригінального магнієвого сплаву в експерименті на щурах / М. Л. Головаха, І. Ф. Беленічев, В. М. Чорний, Є. В. Яцун // Збірник наукових праць Української військово-медичної академії. «Проблеми військової охорони здоров'я». — 2013. — Вип. № 36. — С. 152–158.
7. Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах // Наказ Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249, від 01.03.2012.
8. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. — М.: Высшая школа, 1991. — С. 119–122.
9. Hall C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity / C. S. Hall // J. comp. physiol. Psychol. — 1936. — Vol. 22. — P. 345–352.

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872014310-15>

Статья поступила в редакцию 22.10.2013

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF SYSTEMIC TOXICITY OF IMPLANTS ON MAGNESIUM ALLOY BASE

M. L. Golovakha, I. F. Belyenichev, G. A. Zhernovaya, V. N. Cherny, E. V. Yatsun

Zaporozhzhia State Medical University. Ukraine