

ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПРОДУКТІВ БІОДЕГРАДАЦІЇ ОРИГІНАЛЬНОГО МАГНІЄВОГО СПЛАВУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ НА ЩУРАХ

Головаха М.Л., Белєничев І.Ф., Чорний В.М., Яцун Є.В.

Запорізький державний медичний університет

Резюме. У статті подано інформацію стосовно вивчення можливої токсичної дії продуктів біодеградації оригінального сплаву на основі магнію на лабораторних щурих. Надано опис застосованих лабораторних методів дослідження. Охарактеризовані біохімічні показники плазми по яким проводилось дослідження ендогенної інтоксикації у щурів. Встановлено, що продукти біологічної резорбції сплаву не спричиняють токсичної дії на ткашини організму і не посилюють клітинної деструкції, про що свідчить відсутність ознак ендогенної інтоксикації і окислювального ушкодження функціональних макромолекул.

Ключові слова: магній, імплантат, токсичність.

Вступ. Травми займають п'яте місце в структурі загальної захворюваності; четверте – серед причин інвалідності тих, хто працює; друге – поміж 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 займають третє місце, поступаючись тільки хворобам органів дихання і злоякісним новоутворенням [1]. Постійне зростання первинної і загальної захворюваності від травм, їх 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 все ж перевага більше надається активній оперативній тактиці лікування ушкоджень і захворювань опорно-рухової системи [2]. Для здійснення стабільної фіксації фрагментів кістки при проведенні відкритої репозиції переломів використовуються різні імплантати [2]. Нині для їх виготовлення широко використовуються нержавіючі сталі, титан і титанові сплави, які є біоінертними матеріалами [2].

Застосування при остеосинтезі таких фіксаторів з біоінертних металів потребує повторних оперативних втручань з видалення вже відпрацьованих фіксаторів, і, нерідко, це є значно більше травматичним процесом, ніж сам остеосинтез [3]. Також треба відмітити обмежене застосування таких металофіксаторів у дітей і підлітків, можливість бактеріального обсіменіння і відторгнення біоінертних імплантатів [3].

Тому актуальним залишається питання пошуку біодеградуючих матеріалів, придатних для створення імплантатів, що використовуються в остеосинтезі, які могли б повністю метаболізуватися, не спричиняючи при цьому патологічної дії на прилеглі тканини і організм в цілому.

У медицині біодеградуючі матеріали використовуються достатньо давно. Та справжній прорив відбувся лише наприкінці ХХ століття. За останні 30–ть 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. Проте вимоги до імплантатів, що використовуються в травматології й ортопедії різко зростають коло можливих для застосування біодеградуючих матеріалів.

Магнієві сплави завдяки своїм міцним характеристикам є придатними для виготовлення різних типів імплантатів, їх модуль пружності майже 45 ГПа, що найбільше відповідає механічним властивостям кістки [4,5].

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

Залишається недостатньо вивченим питання токсичної дії сплавів на основі магнію на організм.

Мета дослідження: визначення можливої токсичної дії продуктів біокорозії модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 на живий організм.

Матеріали і методи. У роботі використовували білих безпородних щурів-самців масою 220–270 г (n=20). Тваринам з дослідної групи (n=14) в м'язовий масив стегна, імплантували фіксатор з модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10.

За контрольну групу взяли білих безпородних щурів-самців масою 230–250 г (n=6), які не піддавалися оперативному втручанню (інтактна група). Усі маніпуляції було проведено відповідно до "Положення про використання тварин у біомедичних дослідках". Надалі щури обох груп утримувались в стандартних умовах віварію упродовж 6 місяців.

Для встановлення факту, чи не є продукти біодеградації імплантату причиною виникнення ендогенної інтоксикації, у плазмі щурів оцінювалися такі 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 з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням альдегідфенілгідразонів (АФГ), що мають максимум поглинання при 270 нм і кетонфенілгідразонів (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 Спірінім А.С., лежить екстракція їх з біологічного матеріалу гарячою хлорною кислотою з подальшим визначенням поглинання екстрактів в ультрафіолетовій області спектру при 270 і 290 нм.

Метод визначення молекул середньої маси (МСМ) ґрунтується на осадженні білків з 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 встановлено за ресстрацією ефекту поглинання монохроматичного світлового потоку, що викликається 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 сульфаниламідів і N - (1-нафтил) - етилендіаміду в 2,5%-ій оцтовій кислоті) у видимій і ультрафіолетовій частині спектру, оскільки азобарвник, що утворюється, має оптичну щільність, пропорційну концентрації нітрит-іонів.

Статистичну обробку результатів проводили методами математичної статистики із застосуванням пакету 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 Стюдента і U - критерію Уїтні-Манна. Достовірність відмінностей відносних величин оцінювалася із застосуванням критерію χ^2 . Достовірними вважали відмінності з рівнем значущості більше 95% ($p < 0,05$).

Результати та обговорення. Відомо, що явище ендогенної інтоксикації супроводжується підвищенням розпадом тканин, посиленнями процесами катаболізму, недостатністю функції печінки і нирок, зниженням процесів мікроциркуляції, деструкцією клітинних і тканинних структур, руйнуванням білкових молекул [7]. Як зазначає багато авторів, підвищення рівня МСМ є несприятливою прогностичною ознакою. У зв'язку з цим наш інтерес до визначення вмісту МСМ пояснюється високою біологічною активністю їх окремих фракцій, які інгібують гліколіз, глюконеогенез, пентозний цикл, синтез гемоглобіну, нуклеїнових кислот, мембранний транспорт, фагоцити, еритропоез, мікроциркуляцію, мають імунодепресивний, цитотоксичний, нейро- і психотропний властивості [8].

У результаті проведених досліджень нами було виявлено достовірне (по відношенню до інтактної групи) підвищення вмісту усіх фракцій середньомолекулярних пептидів у плазмі білих щурів, у м'язовий масив стегна яких імплантували фіксатор з модифікованого магнієвого сплаву МЛІ-10 (табл. 1). Так, фракція пептидів, що мають максимум поглинання при 254 нм у дослідній групі збільшилася в 1,19 раза; при 272 нм – в 1,3 раза, а при 280 нм – в 1,27 раза. Таке збільшення свідчить лише про те, що імунна система тварин з магнієвими імплантатами знаходиться в реактивному стані і відповідає незначним викидом біологічно активних субстанцій в кровотік

імункомпетентними клітинами. При ендогенній інтоксикації цей показник зазвичай збільшується в десятки разів [9], чого не спостерігалося в нашому випадку.

Таблиця 1

Вміст деяких маркерів ендогенної інтоксикації в крові білих безпородних щурів

Група	Нуклеїнові кислоти	Молекули середньої маси, у.о			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 по відношенню до інтактної групи (p<0,05)

Згідно з даними досліджень, що раніше проводилися, точкою прикладення ендотоксину є ендотеліальні клітини, активація 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 перемикатися на продукцію токсичних метаболітів кисню. Метаболічним результатом цього є посилення окислювального ушкодження білків, ліпідів, посилення клітинної деструкції і інші патологічні процеси. За даними нашого експерименту (таб.1) виявлено незначне (у 1,4 рази) підвищення вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту, що, ймовірно, свідчить про запуск адаптаційних сигнальних процесів, ніж про патологічний стан. На підтвердження цього припущення свідчать експериментальні дані, що стосуються вмісту нуклеїнових кислот в плазмі тварин з магнісними імплантатами (таб. 1).

Так, в 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 вважалося, що 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 довготривалу циркуляцію позаклітинних нуклеїнових кислот, також як і їх біологічні функції, нині мало досліджені. За даними одних авторів основними процесами, що призводять до появи циркулюючих нуклеїнових кислот є апоптоз і некроз [10]. За даними інших авторів, клітини можуть активно секретувати нуклеїнові кислоти і цей процес також призводить до виникнення позаклітинних нуклеїнових кислот в кровотоці [11]. Одним з простих пояснень появи позаклітинних нуклеїнових кислот у крові можуть бути процеси відмирання клітин і деградації їх хроматину, що постійно відбуваються в організмі. Таким чином, першочерговим джерелом позаклітинної ДНК крові може бути некроз або апоптоз ядромісних клітинних елементів крові, ендотеліальних клітин. Проте,

у деяких випадках, наприклад, при травмі, некроз може вносити значний вклад в генерацію циркулюючої ДНК крові. Інтерес до позаклітинної ДНК плазми крові нині все більше зростає, що пов'язано з прогностичною і діагностичною значущістю цього показника при посттравматичному синдромі. Крім того, відмічена діагностична значущість концентрації циркулюючої в крові ДНК при оцінці тяжкості травми. Визначення концентрації ДНК в крові може бути використане для моніторингу ефективності хірургічного лікування. У нашому випадку, після закінчення піврічного терміну після операції вміст нуклеїнових кислот в плазмі повністю нормалізувався, а це дає підстави вважати, що інтенсивної клітинної деструкції у щурів з магнієвими імплантатами не відбувається.

Для більш повної оцінки про- і антиоксидантних процесів, що протікають в організмі на тлі імплантованого фіксатора ми 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 (АФГ) вважаються більше ранніми маркерами окислювальної деструкції білків. Кегондинітрофенілгідрозони (КФГ) - пізні маркери окислювальної деструкції білка, що характеризують, у випадку спонтанної ОМБ - ступінь окислювальної деструкції білкової молекули, а при стимульованій ОМБ - свідчить про виснаження резервно-адаптаційних можливостей організму [12].

Таблиця 2

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 по відношенню до групи інтактних тварин (p<0,05)

Достовірних відмінностей за вмістом у плазмі тварин дослідної та інтактної груп таких маркерів ОМБ як молекули середньої маси (МСМ), нуклеїнові кислоти (НК) і стабільні метаболіти оксиду азоту отримано не було. Тільки вміст АФГ в спонтанній пробі в 1, 25 рази підвищився у щурів з біодеградуєчими магнієвими імплантатами, порівняно з інтактними щурами. Враховуючи усе різноманіття функцій, що виконуються білками в організмі, відсутність посилення їх окислення говорить про нормальні метаболічні процеси, що протікають, і відсутність ознак ендогенної інтоксикації.

Висновки:

1. Експериментально встановлено, що продукти біокорозії модифікованого магнієвого сплаву МЛ-10 не спричиняють токсичної дії на тканини організму і не посилюють клітинної деструкції, про що свідчить відсутність ознак ендогенної інтоксикації і окислювального ушкодження функціональних макромолекул.

2. Поступова (впродовж семи місяців) метаболізація металевих фіксаторів з біодеградуючого магнієвого сплаву МЛ-10 організмом білих безпородних шурів-самців супроводжувалася також відсутністю порушень фізіологічних проявів у експериментальних тварин.

3. Виходячи з результатів експерименту можна зробити сприятливий прогноз для можливості вивчення застосування металевих фіксаторів з біодеградуючого магнієвого сплаву МЛ-10 у людини.

Література:

1. Мухаметов У.Ф. Морфологічне і клінічне обґрунтування застосування нових наноструктурних матеріалів у травматології й ортопедії: автореф. дис докт.мед.наук/ Мухаметов У.Ф.// – Уфа, – 2010. – 23 с.

2. Мовшович І.А. Оперативна ортопедія / Мовшович І.А. – М.: Медицина, – 1983. – 416 с.

3. Ткаченко С.С. Остеосинтез полімерами [Електрон. ресурс] – 1993. – Режим доступу: http://bone-surgery.ru/view/osteosintez_polimerami/.

4. Чемирис А.І. Біорезорбтивні властивості сплавів магнію / А.І. Чемирис, О.І. Цивирко, В.Н. Чорний, В.А. Шаломеев, Е.В. Яцун // Травма. – 2011. – Т.12. № 3. – С. 144-146.

5. Janin Reifenrath, Dirk Bormann and Andrea Meyer-Lindenberg (2011). Magnesium Alloys as Promising Degradable Implant Materials in Orthopaedic Research, Magnesium Alloys - Corrosion and Surface Treatments, Frank Czerwinski (Ed.), ISBN: 978-953-307-972-1, InTech, DOI: 10.5772/14143. Available from: <http://www.intechopen.com/>.

6. Горбунов Н.В. Активация образования окиси азота, опосредованная метаболитами глутаматными рецепторами в первичных культурах клеток зёрен мозжечка //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. Девайкин, В.М. Егоров //Анестезіологія і реаніматологія. – 1996. – №6. – С. 21-27.

8. Ніколайчик В.В. Середні молекули – освіта і способи визначення / В.В. Ніколайчик, В.В. Кирковський, Г.А. Лобачева // Лабораторна справа. – 1989. – №8. – С. 31-33.

9. Bannet E.V. Peptides of the “middle molecules” group / E.V. Bannet, D. Chia, C. Restivo et al. // *Analyt. Biochem.* – 1994. – Vol. 86. – P. 271-278.

10. Rainer T.H. 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. Sanchez-Cespedes M. 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. Беленичев, С.В. Павлов // Суч. пробл. токсикол. - 2005. - №3. - №3. - С. 20-26.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОДУКТОВ БИОДЕГРАДАЦИИ ОРИГИНАЛЬНОГО МАГНИЕВОГО СПЛАВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

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

Резюме. В статье представлена информация относительно изучения возможного токсического действия продуктов биodeградации оригинального сплава на основе магния на лабораторных крыс. Предоставлено описание применяемых методов исследования. Охарактеризованы биохимические показатели плазмы по которым проводилось 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.

TOXICITY PRODUCTS BIODEGRADATION ORIGINAL MAGNESIUM ALLOY IN EXPERIMENTS ON RATS

M.Golovakha, I.Belyenichev, V.Chorny, E.Yatsun

Summary. The article presents information on the study of possible toxic effects of products of biodegradation of original alloy magnesium-based on laboratory rats. Courtesy description applied laboratory methods. Author examined biochemical parameters of plasma in which the study was conducted endogenous intoxication in rats. Found that biological resorption alloy products do not cause toxic effects on tissues and enhance cell destruction, as evidenced by the absence of signs of intoxication and endogenous oxidative damage of functional macromolecules.

Keywords: magnesium, implant, toxicity.

УДК 617.55-072.1:616.346.2-002-089.819

ОПЕРАТИВНІ ДОСТУПИ ПРИ ЛАПАРОСКОПІЧНІЙ АПЕНДЕКТОМІЇ

¹Калина Р.А., ²Іванько О.В.

¹ПВНЗ «Київський медичний університет УАНМ»

²Центр хірургії Київської міської клінічної лікарні №1

Резюме. У статті проведена оцінка ефективності оперативних доступів при лапароскопічній апендектомії. Вивчені 93 лапароскопічних і 185 відкритих операцій у хворих з гострим апендицитом. Встановлено, що запропоновані авторами точки оперативного доступу при лапароскопічній апендектомії є ефективними і зручними.

Ключові слова: гострий апендицит, лапароскопія, апендектомія.

Вступ. За останнє десятиріччя все частіше застосовуються лапароскопічні методики апендектомії [1, 2]. Не зважаючи на можливість технічних труднощів під час лапароскопії існуючі способи, оперативні прийоми з кожним роком призводять до зменшення кількості конверсій та підвищенню ефективності лапароскопічної апендектомії. З метою мінімізації оперативного втручання при апендектомії деякі автори використовують різні методики [3, 4].