

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 615.468.6:615.372:620.3-034.22

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА, МОДИФИЦИРОВАННОГО НАНОЧАСТИЦАМИ СЕРЕБРА

Б. О. Кабешев¹, Д. Н. Бонцевич¹, А. Ю. Васильков²¹Гомельский государственный медицинский университет, Гомель²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия

Цель: получение нового шовного материала, модифицированного наночастицами серебра, обладающего антибактериальным эффектом, и изучение гемолитического эффекта в отношении эритроцитов человека и токсического воздействия на половые клетки крупного рогатого скота.

Материал и методы. В работе использовали капрон, модифицированный наночастицами серебра. Использовали методику определения гемолитического действия полимерных материалов «in vitro» и методику определения токсического воздействия вытяжек на сперматозоиды быка. Методика определения гемолитического действия полимерных материалов была воспроизведена в отношении вытяжек, полученных на 3 и 10 сутки экспозиции.

Результаты. Процент гемолиза во всех пробах составил менее 2, что позволяет сделать заключение об отсутствии гемолитического действия вытяжек. При исследовании действия вытяжек на сперматозоиды быка было выявлено значительное увеличение времени подвижности сперматозоидов в пробах как с 3-, так и с 10-суточной вытяжкой по сравнению с контрольными: 55, 45 и 32,5 минуты соответственно.

Заключение. Вытяжки из шовного материала, модифицированного наночастицами серебра, не обладают гемолитическим действием и не оказывают токсического воздействия на половые клетки крупного рогатого скота.

Ключевые слова: наночастицы серебра, шовный материал, гемолиз, половые клетки быка, токсикология.

STUDY OF TOXIC EFFECT ON SUTURE MATERIAL
MODIFIED BY SILVER NANOPARTICLESB. O. Kabeshev¹, D. N. Bontsevich¹, A. Yu. Vasilkov²¹Gomel State Medical University²Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Russia

The aim of research: to obtain new suture material modified by silver nanoparticles, which has an antibacterial effect, and to study the hemolytic effect on human erythrocytes and toxic effect on the germ cells of cattle.

Material and methods. Nylon modified by silver nanoparticles has been used in the research. The methods to determine the hemolytic effect of polymeric materials in vitro and the toxic effects of extracts on bull's sperm cells were used. The method to determine the hemolytic effect of polymeric materials was reproduced on the extracts obtained on the third and tenth days of the exposure.

The results. The hemolysis percentage in all the samples made up less than 2, which made it possible to draw a conclusion about the absence of hemolytic effect of the extracts. The investigation of the effect of the extracts on the bull's sperm cells revealed a significant increase in the time of sperm motility in the third- and tenth-day exposure samples compared with the control ones: 55, 45 and 32.5 minutes, respectively.

Conclusion. The extracts from the suture material modified by silver nanoparticles do not possess a hemolytic effect and do not exert a toxic impact on the germ cells of cattle.

Key words: silver nanoparticles, suture material, hemolysis, bull's germ cells, toxicology.

Введение

Основным способом соединения тканей в ходе любого хирургического вмешательства является сшивание, качество выполнения которого зависит от используемого шовного материала. В ряде случаев, когда нельзя полностью исключить наличие в ране инфекции, необходимо не только сопоставить ткани, но и оказать бактерицидное действие на присутствующие в тканях микроор-

ганизмы. Системное введение антибиотиков малоэффективно, в связи с чем становятся очень актуальными антибактериальные свойства шовного материала [1–6]. Общеизвестны антибактериальные свойства серебра. Сомнительно, что микроорганизмы способны вырабатывать к нему резистентность, так как его ионы атакуют большое количество разнообразных объектов в клетке. Повышенное внимание к серебру сегодня

обусловлено появлением множества штаммов бактерий, устойчивых к современным антибактериальным препаратам.

В современном научном мире быстро развивается такое направление, как нанотехнологии. Нанотехнологии — это общий термин, применимый к исследованиям и инженерным разработкам, проводимым в наномасштабе, другими словами, на атомарном или молекулярном уровне. Повышенный интерес к наночастицам обусловлен их уникальными свойствами, позволяющими создавать на их основе новые материалы и устройства. Наночастицы серебра представляют собой один из наиболее распространенных и быстро занимающих свое место на рынке продукт индустрии нанотехнологий. Они уже широко используются в текстильной промышленности, известно их применение в изготовлении лакокрасочной продукции и даже в производстве хлеба [3, 7]. Доказано, что наночастицы серебра обладают выраженной антибактериальной активностью [8–11]. В этой связи возник интерес в производстве шовного материала, модифицированного наночастицами серебра.

Известно о токсических эффектах солей серебра в отношении печени, почек, крови. Однако в литературных источниках содержатся противоречивые данные о токсических свойствах веществ, в частности, серебра, в наноразмерном состоянии [12–15]. Учитывая возможную область применения шовного материала, модифицированного наночастицами серебра, очевидна актуальность такого рода исследований. Существует множество методик, демонстрирующих токсическое влияние исследуемых материалов на клетки и ткани (клетки крови, половые клетки, клеточные культуры и т. п.)

Цель

Изучение гемолитического эффекта в отношении эритроцитов человека и токсического воздействия на половые клетки крупного рогатого скота шовного материала на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра, полученного методом металло-парового синтеза.

Материалы и методы исследования

Для исследования мы использовали капрон 3 метрического размера, условный номер 2/0 (производитель Волоть (РФ), ТУ 9432-001-24648800-95), модифицированный наночастицами серебра. Суспензия наночастиц серебра получена путем металло-парового синтеза. Предварительно готовят изопропанол кипячением и перегонкой в атмосфере инертного газа, дегазируют в вакууме чередованием циклов «замораживание-размораживание», перед началом металло-парового синтеза колбу реактора с серебром охлаждают погружением в сосуд с жидким азотом, затем подают в колбу реактора изопропанол, выполняют металло-паровой синтез в вакууме не выше 10–4 мм рт. ст. в течение 2 ча-

сов, подачей инертного газа убирают вакуум, соконденсат наночастиц металла и изопропанола разогревают до температуры его плавления, пропитывают шовный материал полученным органозолем, удаляя его избыток сушкой в вакууме 10⁻¹ мм рт. ст.

Распределение размеров частиц серебра носит бимодальный характер и характеризуется средним размером 4 и 30 нм.

Вытяжку из шовного материала готовили в соответствии с методической и нормативной документацией для конкретной группы материалов, путем экспозиции 0,4 м исследуемого образца модифицированной нити в 100 мл изотонического раствора натрия хлорида в течение 3 и 10 дней при постоянной температуре 37 °С.

Для исследования токсического воздействия вытяжек на эритроциты человека использовали методику определения гемолитического действия полимерных материалов «in vitro». Готовили 10 % взвесь эритроцитов. Для этого 5 мл эритроцитарной массы центрифугировали 10 минут при 900 об./мин, надосадочную жидкость отделяли, к осадку добавляли 8 мл изотонического натрия хлорида, содержимое взбалтывали и центрифугировали в том же режиме. Отмывание клеток повторяли дважды, при этом надосадочная жидкость не должна иметь признаков гемолиза. Для получения 10 % взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивали с 9 мл 0,9 % раствора натрия хлорида. Следующим этапом было изготовление контрольной пробы и пробы со 100 % гемолизом. Контрольная проба: 0,5 мл 10 % взвеси эритроцитов и 5 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. Проба со 100 % гемолизом: 0,5 мл 10 % взвеси эритроцитов и 5 мл дистиллированной воды. Происходит полное разрушение эритроцитов, что соответствует 100 % гемолизу. Контрольная проба и проба со 100 % гемолизом готовятся для каждого образца эритроцитарной взвеси.

Опытные пробы представляли собой смесь 5 мл вытяжки и 0,5 мл 10 % взвеси эритроцитов. Затем контрольные, опытные пробы и пробы со 100 % гемолизом ставили в термостат на 1 час при температуре 37 °С, после чего центрифугировали в течение 20 минут при 2000 об./мин. Надосадочная жидкость отделялась, и проводилось исследование оптической плотности на фотоэлектроколориметре (КФК) при длине волны 640 нм против «холостой» пробы (вода). Толщина кюветы 1 см. Расчет процента гемолиза производили по формуле:

$$\% \text{гемолиза} = \frac{E_{on} - E_k}{E_{100}} * 100$$

где:

E_{on} — оптическая плотность опытной пробы;

E_k — оптическая плотность контрольной пробы;

E_{100} — оптическая плотность пробы со 100 % гемолизом.

Испытуемое изделие признается свободным от гемолитически действующих веществ, если процент гемолиза во всех опытных пробах не превышает 2.

Следующим этапом исследования явилось определение токсического воздействия вытяжек из шовного материала, модифицированного наночастицами серебра, на половые клетки крупного рогатого скота. Принцип методики заключается в визуализации под микроскопом (Nikon Eclipse E200) двигательной активности сперматозоидов быка, подвергшихся воздействию вытяжек до полного прекращения их прямолинейно-поступательного движения. В качестве биологического объекта использовали гранулированную сперму быка по 0,1–0,2 г, замороженную в парах жидкого азота. Сперму получали на станции искусственного осеменения. Приготовление пробы спермы производили следующим образом: в четыре пробирки с 0,5 мл 0,9 % раствора хлористого натрия, расположенные на водяной бане при температуре 40 °С, длинным анатомическим пинцетом, охлажденным до температуры жидкого азота, извлекали гранулу спермы и помещали в нагретый раствор. В одной пробирке оттаивали только одну гранулу спермы. Сразу после оттаивания содержимое пробирок сливали в одну колбу и перемешивали, поучая маточный раствор. Из него брали 0,3 мл суспензии сперматозоидов и смешивали с 1 мл вытяжки из модифицированного шовного материала — опытная проба. Контрольная проба представляла собой смесь 0,3 мл суспензии сперматозоидов и 1 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. Конечная концентрация сперматозоидов в образцах составляла 6–7 млн/мл. Все пробирки с контрольной и опытными пробами были помещены в водяную баню с температурой 40 °С в течение всего эксперимента. Главным критерием оценки функционального состояния сперматозоидов принимается длительность их движения. Оценка подвижности производится микроскопированием капли из опытных и контрольной проб каждые 10–15 минут. Время подвижности определяли как

среднее между двумя измерениями, первое из которых регистрирует наличие хотя бы одной-двух поступательно-подвижных клеток, а второе — полное прекращение поступательного движения. Степень токсичности испытуемого раствора определяли по формуле:

$$T = \frac{\text{опыт.}}{\text{контр.}} * 100,$$

где:

T — степень токсичности;

опыт. — время подвижности сперматозоидов в испытуемом растворе;

контр. — время подвижности сперматозоидов в контрольном растворе.

Эти методики относятся к экспресс-методам определения токсичности материалов и изделий медицинского назначения.

Данные исследований обрабатывали с использованием программного обеспечения для статистической обработки данных «Statistica», 6.0 с использованием t-test Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ и высокодостоверными при $p < 0,01$. P — показатель достоверности, вероятность ошибочно отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий.

Результаты

Методика определения гемолитического действия полимерных материалов «in vitro» была воспроизведена в отношении двух образцов вытяжек из модифицированного шовного материала, полученных на 3 и 10 сутки экспозиции, и эритроцитов крови человека. Были приготовлены по три опытных пробы, одна контрольная и одна проба со 100 % гемолизом для каждого образца вытяжки из шовного материала с наночастицами серебра. В ходе проведенных исследований оказалось, что оптическая плотность контрольной и опытных проб была практически одинакова в обоих образцах вытяжки. Следовательно, процент гемолиза, согласно формуле, стремился к нулю. Результаты теста сведены в таблицу 1, где пробы № 1 — пробы с 3-суточной вытяжкой, а пробы № 2 — пробы с вытяжкой после 10 суток экспозиции модифицированного шовного материала.

Таблица 1 — Оптическая плотность и процент гемолиза 10 % взвеси эритроцитов человека при взаимодействии с образцами вытяжек из шовного материала на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра

Проба	Оптическая плотность	Процент гемолиза, %
Проба со 100 % гемолизом №1	0,975	100
Контрольная проба № 1	0,021	—
Опытная проба № 1.1	0,03	0,92
Опытная проба № 1.2	0,022	0,1
Опытная проба № 1.3	0,029	0,8
Проба со 100 % гемолизом № 2	0,95	100
Контрольная проба № 2	0,024	—
Опытная проба № 2.1	0,027	0,3
Опытная проба № 2.2	0,031	0,7
Опытная проба № 2.3	0,029	0,5

Процент гемолиза опытных проб во всех образцах составил менее 2, что позволяет сделать заключение об отсутствии гемолитического действия 3- и 10-суточных вытяжек из шовного материала на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра, на эритроциты человека. Таким образом, могут быть проведены дальнейшие испытания токсических свойств вытяжек из модифицированного шовного материала.

Следующим этапом нашей работы стало исследование токсического воздействия 3- и 10-суточных вытяжек из шовного материала на основе полиамида, модифицированного нано-

частицами серебра, на половые клетки крупного рогатого скота. В результате проведенных исследований было выявлено значительное увеличение времени подвижности сперматозоидов крупного рогатого скота в опытных пробах как с 3-, так и с 10-суточной вытяжкой по сравнению с контрольными. Для каждой вытяжки были приготовлены по десять контрольных и опытных проб. Исходя из методики исследования, среднее время подвижности сперматозоидов в опытных и контрольных пробах, а также степень токсичности были идентичны в каждом из десяти повторений как для 3-, так и для 10-суточной вытяжки (таблица 2).

Таблица 2 — Время подвижности сперматозоидов опытных и контрольных проб, степень токсичности 3- и 10-суточных вытяжек шовного материала на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра

3-суточная вытяжка			10-суточная вытяжка		
t _{опыт.} , мин	t _{контр.} , мин	T, степень токсичности	t _{опыт.} , мин	t _{контр.} , мин	T, степень токсичности
55	32,5	169,23	45	32,5	138,46

Статистическая обработка с использованием t-test Стьюдента при α 0,01 показала достоверность различий степени токсичности вытяжек. 3-суточная вытяжка обладает менее выраженной токсичностью по сравнению с 10-суточной. Кроме того, достоверны различия времени подвижности сперматозоидов опытных и контрольных проб. И хотя методика относится к экспресс-методам и не доказывает отсутствие токсического эффекта в отношении тканей человека, результаты исследований позволяют сделать такое предположение и мотивируют на проведение современных дорогостоящих испытаний в отношении культур клеток и тканей организма человека.

Таким образом, в результате проведенных исследований мы можем сделать следующие **выводы**:

1. Вытяжки из шовного материала на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра, полученного методом металло-парового синтеза, не обладают гемолитическим действием в отношении 10 % взвеси эритроцитов человека. Причем, это свойство одинаково выражено как у 3-, так и 10-суточной вытяжки.

2. Вытяжки из шовного материала на основе полиамида, модифицированного наночастицами серебра, полученного методом металло-парового синтеза, не оказывают токсического воздействия на половые клетки крупного рогатого скота. Об этом свидетельствует достоверное увеличение времени подвижности сперматозоидов быка в опытных пробах, по сравнению с контрольными как в случае с 3-суточной, так и 10-дневной вытяжкой. При этом, в случае с 3-суточной вытяжкой продолжительность подвижности сперматозоидов быка оказалась достоверно выше, чем с 10-дневной: 55 и 45 минут соответственно.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абаев, Ю. К. Раневая инфекция в хирургии / Ю. К. Абаев. — Мн.: Беларусь. — 2003. — 293 с.
2. Байчоров, Э. Х. Современный шовный материал, применяемый в хирургии / Э. Х. Байчоров, Л. М. Дубовой, А. Д. Пасечников // Здоровье — системное качество человека: сб. ст. — Ставрополь, 1999. — С. 328–334.
3. Нанонаука и нанотехнология в производстве и материаловедении волокнистых материалов и изделий / Б. А. Бузов [и др.] // Швейная промышленность. — 2006. — № 4. — С. 46–47.
4. Буянов, В. М. Хирургический шов / В. М. Буянов, В. Н. Егив, О. А. Удотов. — М.: График Групп, 2000. — 93 с.
5. Толстых, П. И. Биологически активные перевязочные и хирургические шовные материалы / П. И. Толстых, В. К. Гостищев, А. Д. Вирник // Хирургия. — 1988. — № 4. — С. 3–8.
6. Шотт, А. В. Кишечный шов / А. В. Шотт, А. А. Запорожец, В. Ю. Клиничевич. — Мн.: Беларусь, 1983. — 160 с.
7. Патент на изобретение № 2178029, Состав для придания антимикробных свойств текстильным материалам / В. Ю. Мишаков [и др.] // Бюл. № 1, от 10.01.2002.
8. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / R. Ahmad [et al.] // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. — 2007. — № 3. — P. 168–171.
9. Sonochemical coating of silver nanoparticles on textile fabrics (nylon, polyester and cotton) and their antibacterial activity / H. Perelstein [et al.] // Nanotechnology. — 2008. — № 19. — P. 1–6.
10. Chopra, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? / I. Chopra // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2007. — Vol 59. — P. 587–590.
11. Antibacterial Characterization of Silver Nanoparticles against *E. Coli* ATCC-15224 / M. Raffi [et al.] // J. Mater. Sci. Technol. — 2008. — Vol. 24. — № 2. — P. 192–196.
12. Глушкова, А. В. Нанотехнологии и нанотоксикология — взгляд на проблему / А. В. Глушкова, А. С. Радилов, В. Р. Рембовский // Токсикологический вестник. — 2007. — № 6. — С. 4–8.
13. Измеров, Н. Ф. Нанотехнологии и наночастицы — состояние проблемы и задачи медицины труда / Н. Ф. Измеров, А. В. Ткач, Л. А. Иванова // Медицина труда и промышленная экология. — 2007. — № 8. — С. 1–4.
14. Курляндский, Б. А. О нанотехнологии и связанных с нею токсикологических проблемах / Б. А. Курляндский // Токсикологический вестник. — 2007. — № 6. — С. 2–3.
15. Chen, X. Mini review. Nanosilver: A nanoparticle in medical application / X. Chen, H. J. Schluessener // Toxicology Letters. — 2008. — Vol. 176. — P. 1–12.