

О.С. Куколевська¹, І.В. Сіора¹, Р.М. Чернопищук², І.І. Геращенко¹

МЕДИКО-БІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НАНОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРІАЛУ «ПОЛІДЕНС»

¹ Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, E-mail: igorgera57@ukr.net

² Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова
вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна

Проведено тестування медико-біологічних властивостей нанокompозитного матеріалу «Поліденс», матрицею якого слугують взаємопроникні полімерні сітки з поліуретану та полі-2-гідроксіетилметакрилату, а наповнювачем – модифікований антимікробними речовинами кремнезем. Вивчено кінетику вивільнення активних речовин у водне середовище, вплив на життєдіяльність дріжджових клітин, антимікробні властивості, загальнотоксичну дію та реакцію оточуючих тканин після підшкірної імплантації матеріалу лабораторним тваринам. За результатами випробувань встановлено, що нанокompозит є нетоксичним, не спричиняє вираженої місцевої запальної реакції і не поступається стандартним зразкам за кінетикою вивільнення активних речовин та за антимікробними властивостями. Нанокompозит на полімерній основі «Поліденс» є перспективним матеріалом для виготовлення медичних виробів – імплантатів, катетерів, дренажів тощо.

Ключові слова: нанокремнезем, поліуретан, полі-2-гідроксіетилметакрилат, нітрат срібла, метронідазол, декаметоксин, дріжджі, кінетика вивільнення, антимікробна дія, імплантація, токсичність

ВСТУП

Серйозну проблему сучасної практичної медицини становить інфікування пацієнтів під час введення різноманітних функціональних виробів (пристроїв) – імплантів, стентів, дренажів, катетерів тощо. Із згаданих виробів чи не наймасовішими за застосуванням є катетери. Так, щорічно в світі хворим установлюють мільйони центрально-венозних катетерів. Найчастішими й тяжкими ускладненнями при цьому вважаються гематогенні інфекції [1, 2]. Повідомляється, що близько 40 % внутрішньошпитальної інфекції виникає в сечостатевих шляхах [3]. Більшості пацієнтів з цією інфекцією (~80 %) були встановлені уретральні катетери [4, 5]. Одним з шляхів вирішення проблеми є створення катетерів з антисептичними властивостями, що досягається іммобілізацією антимікробних речовин на поверхні чи в об'ємі виробу. При цьому іммобілізована сполука повинна мати певний «профіль вивільнення», що надає катетеру пролонгованої антимікробної дії [6], а гнучкість, достатня механічна міцність та біосумісність виробу забезпечуються вибором відповідного полімерного матеріалу.

Спільними зусиллями співробітників Інституту хімії високомолекулярних сполук НАН України (керівник проекту – д.х.н. Карабанова Л.В.) та Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України (відповідальний виконавець – д.х.н. Воронін Є.П.) розроблено нанокompозитний матеріал «Поліденс», призначений для використання в медичній галузі як носій активних субстанцій, що повільно вивільняються. Основою композиту слугують взаємопроникні полімерні сітки з поліуретану та полі-2-гідроксіетилметакрилату (ВПС ПУ/ПГЕМА), а наповнювачем – нанокремнезем, поверхню якого модифіковано біоактивними сполуками: амінокислотами, солями металів, антимікробними речовинами тощо [7].

Мета роботи: провести фармако-технологічне, мікробіологічне та токсикологічне вивчення «Поліденсу» – нанокompозитного матеріалу на основі ПУ/ПГЕМА полімерної матриці та нанокремнезему, модифікованого антимікробними речовинами – сполуками срібла, метронідазолом або декаметоксином; за результатами дослідження зробити висновок щодо доцільності впровадження нанокompозиту «Поліденс» як матеріалу для виготовлення катетерів з антимікробними властивостями.

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі досліджували декілька серій нанокompatитів у вигляді плівок з різним співвідношенням ПУ/ПГЕМА в складі полімерної матриці, різною кількістю наповнювача (нанокремнезему) та вмістом активної речовини в наповнювачі. Активними речовинами – модифікантами поверхні нанокремнезему – слугували нітрат срібла (Макрохім, Київ, Україна), метронідазол (Китай), декаметоксин (ТОВ Фармхім, Шостка, Україна).

Вивчення кінетики вивільнення речовин.

Було досліджено три нанокompatитні матеріали, полімерна основа яких представлена матрицями складу 63 %ПУ/37 %ПГЕМА, 83 %ПУ/17 %ПГЕМА і 100 % ПУ. Композити містили відповідно 9,5, 11,1 і 15,0 % наповнювача, до складу якого входило 9 % AgNO_3 .

Серія нанокompatитів з метронідазолом (18 зразків) була представлена двома матрицями – 83 %ПУ/17 %ПГЕМА і 100 % ПУ, в яких дисперговано 5, 10 або 15 % нанокремнезему, поверхню якого модифіковано 1, 5 або 10 «шарами» метронідазолу. При цьому вміст метронідазолу в складі наповнювача становив відповідно 12 % (1 шар); 41 % (5 шарів) чи 58 % (10 шарів).

Нанокompatити з іммобілізованим декаметоксином (24 зразка) також були на основі двох матриць – 83 %ПУ/17 %ПГЕМА і 100 % ПУ, в яких дисперговано 3, 5, 10 або 15 % наповнювача, модифікованого 1, 2 або 3 «шарами» декаметоксину. При цьому вміст декаметоксину в складі наповнювача становив 12 % (1 шар), 22 % (2 шари) або 30 % (3 шари).

Як стандартні зразки порівняння використовували матеріали, з яких виготовлені уретральний катетер з іммобілізованим нітрофуразоном (фурациліном) і центрально-венозний срібломісний катетер.

Зразки нанокompatитів та фрагменти катетерів занурювали у водне середовище – дистильовану воду або 0,9 % розчин NaCl – з наступним відбором проб та вимірюванням в них концентрації досліджуваних речовин.

Для визначення концентрації іонів Ag^+ використовували екстракційно-фотометричний метод, що ґрунтується на реакції з дитизоном у кислому середовищі. Дитизонати срібла

екстрагували чотирихлористим вуглецем, після цього визначали оптичну густину екстрактів [8]. Концентрацію метронідазолу визначали спектрофотометричним методом, за оптичною густиною в максимумі поглинання за довжини хвилі 318 нм. Концентрацію декаметоксину визначали фотоколориметричним методом, що ґрунтується на реакції з еозином [9, 10].

Спостереження за вивільненням речовин проводили в широкому часовому діапазоні, від двох тижнів до 1 місяця. Паралельно реєстрували зміну маси зразків.

Вплив на життєдіяльність дріжджових клітин. Суспензію дріжджів (Саф-Момент, Франція), із концентрацією $17,2 \cdot 10^6$ клітин/ cm^3 , готували на 5 %-вому розчині сахарози. Підрахунок клітин здійснювали в камері Горяєва за стандартною методикою [11, 12]. Суспензію залишали на час, достатній для початку фази експоненціального росту клітин. Плівкові зразки нанокompatитів для набухання занурювали в 5 %-вий розчин сахарози на 18 год, після чого обсушували фільтрувальним папером. На предметне скло клали плівку, на неї наносили по одній краплині суспензії дріжджів і 0,4 % розчину трипанового синього (Sigma) та накривали покрівельним склом. У контрольному досліді клітини і розчин барвника наносили на предметне скло. Для мікроскопічного спостереження використовували мікроскоп МИКМЕД-2, реєструючи зображення цифровою камерою VISION CAM V300, закріпленою на окулярі мікроскопа. Мікроскопічні дослідження здійснювали через 0,5, 1,5, 2,5 та 3,5 год. У полі зору живі клітини залишалися світлими, тоді як мертві зафарбовувались барвником [13]. З кожного зразка робили 4–6 мікрофотографій, вибираючи різні ділянки поверхні. Показник життєздатності клітин розраховували як відношення кількості живих клітин до сумарної кількості живих і мертвих клітин, виражене у відсотках.

Мікробіологічні дослідження. Для вивчення антимікробних властивостей й реакції організму тварин на імплантацію були відібрані нанокompatити, склад яких наведено в табл. 1. Зразками порівняння служили відомі катетери з антимікробними властивостями.

Визначення антибактеріальних властивостей виконували методом дифузії в агар. Для

цього у чашці Петрі заливали шар поживного агаризованого середовища Мюллера-Хінтона із внесеною добовою культурою тест-мікроорганізму, об'ємом 14–16 мл. Згідно з рекомендаціями ВООЗ, використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653. Мікробне навантаження становило 10^7 – 10^8 мікробних тіл на 1 мл середовища, що визначалось апаратним методом за стандартом McFarland. Після

застигання на середовище поміщали зразки матеріалів масою по 40 мг, які попередньо стерилізували 8 % розчином Лізоформіну 3000. Чашки підсушували 10–20 хв за кімнатної температури і поміщали в термостат на 24 год. Оцінку антимікробної дії проводили на 1, 3, 5, 7, 14, 18, 22, 30, 35, 42, 50 та 57 добу за діаметром зони затримки росту мікроорганізмів навколо зразка, використовуючи загально-вживані критерії [14, 15]. У проміжках між дослідженнями матеріал на агаризованому середовищі зберігали в умовах холодильної камери за температури 4 °С.

Таблиця 1. Матеріали, задіяні в мікробіологічному дослідженні та у випробуванні на тваринах

№ зразка	Склад полімерної матриці	Склад наповнювача та його вміст у композиті
1	ВПС 83 % ПУ/17 % ПГЕМА	без наповнювача
2	ВПС 83 % ПУ/17 % ПГЕМА	SiO ₂ +9 % AgNO ₃ ; 11.1 %
3	ВПС 83 % ПУ/17 % ПГЕМА	SiO ₂ +30 % декаметоксину; 15 %
4	100 % ПУ	без наповнювача
5	100 % ПУ	SiO ₂ +9 % AgNO ₃ ; 15 %
6	100 % ПУ	SiO ₂ +30 % декаметоксину; 15 %
7	Поліуретан (центральный венозный/ артериальный катетер)	розподілений в об'ємі полімера цеоліт, пори якого містять іони срібла
8	Силіконовий полімер (уретральний катетер)	нанесене на поверхню полімера розчинне покриття, яке містить нітрофуразон
9	Латекс (інертний полімер)	без наповнювача
10	Силікон (інертний полімер)	без наповнювача

Тест на аномальну токсичність виконували згідно з вимогами Державної фармакопеї України [16]. Дорослі самці мишей масою 50–80 г були поділені на 4 групи, по 5 тварин у групі, залежно від досліджуваного матеріалу: 1 група – ВПС 83ПУ/17ПГЕМА; 2 група – ВПС 63ПУ/37ПГЕМА; 3 група – поліуретан; 4 група – контрольна. Фрагменти матеріалів площею 6.25 см² витримували в 50 мл 0.9 % розчину NaCl протягом 24 год. Одержані розчини, а також 0.9 % розчин NaCl (контроль), вводили внутрішньоочередово в об'ємі 1.0 мл зі швидкістю 0.1 мл/с. Спостереження за станом тварин проводили протягом 24 год.

Дослідження реакції оточуючих тканин на імплантат проводили на дорослих самцях щурів роду Wistar масою 150–200 г. Під час виконання експериментів на тваринах дотримувались основних міжнародних

біоетичних норм й вимог щодо біомедичних експериментів, відповідних положень ВООЗ та законів України. Тварини були поділені на групи, по 15 тварин у кожній, залежно від імплантованого в підшкірний простір матеріалу (табл. 1). Як зразки порівняння, окрім катетерів, додатково використовували латекс (фрагмент гумової рукавички) і силікон (напівпродукт для виготовлення дренажних систем) – інертні полімери, які зазвичай залишають в тканинах у післяопераційному періоді як дренажі. До 11-ї, контрольної, групи увійшли тварини, яким виконували лише формування підшкірного каналу.

Перед імплантацією матеріали стерилізували шляхом замочування у 8 % розчині Лізоформіну 3000 протягом 60 хв з подальшим промиванням стерильним 0.9 % розчином NaCl. Під загальним знеболенням 5 % розчином кетаміну, після депіляції, шкіру

спини щура обробляли розчином антисептика Бетадин. Хірургічним шляхом формували підшкірний канал довжиною 1.5 см, у який вводили досліджуваний матеріал. Шкіру ушивали наглухо.

Забір крові для **гематологічних досліджень** (визначення рівнів лейкоцитів, серомукоїду і С-реактивного білка) та матеріалу для **гістологічного вивчення** виконували під загальним знеболенням 5 % розчином кетаміну на 1, 3, 7, 10 та 14 добу. Виведення тварин з експерименту здійснювали шляхом передозування засобів для знеболення.

Забрані масиви тканин з імплантованими матеріалами фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, зневоднювали, заливали в парафін та на мікротомі готували зрізи завтовшки 7 мкм. Гістологічні препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином, після чого вивчали під світловим мікроскопом OLYMPUS BX-41. Виявлені зміни у досліджуваних тканинах документували шляхом мікрофотозйомки, одержані світліни обробляли за допомогою програми Quick PHOTO MICRO 2.3.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати вивчення швидкості вивільнення у водне середовище активних речовин вибірково представлені на рис. 1–3.

Як видно, серед срібловмісних нанокомпозитів найменший ступінь вивільнення іонів Ag^+ , який становить лише 30 % на 14–15 добу, спостерігається для зразка на основі поліуретану. Зразки на основі ВПС 63ПУ/37ПГЕМА і 83ПУ/17ПГЕМА демонструють приблизно однакову кінетику з виходом близько 50 % Ag^+ на 14–16 добу (рис. 1).

Для серії нанокомпозитів з метронідазолом встановлено, що всі без винятку зразки на основі матриці зі 100 % поліуретану демонструють краще вивільнення активної речовини, ніж матеріали на основі ВПС 83ПУ/17ПГЕМА, типові кінетичні криві представлені на рис. 2 а. Загалом, для всіх зразків максимальний (рівноважний) ступінь вивільнення досягається на 2–3 добу спостереження. Не виявлено суттєвої різниці в швидкостях вивільнення активної речовини в дистильовану воду і 0.9 % розчин NaCl. Найбільший ступінь вивільнення, від 42 до

52 %, демонструють матеріали на основі поліуретану з найвищим, порівняно з іншими зразками, вмістом метронідазолу. Отже, можна припустити, що в цих матеріалах значна частина метронідазолу не зв'язана з поверхнею кремнезему і тому може безперешкодно вивільнятися з матриці.

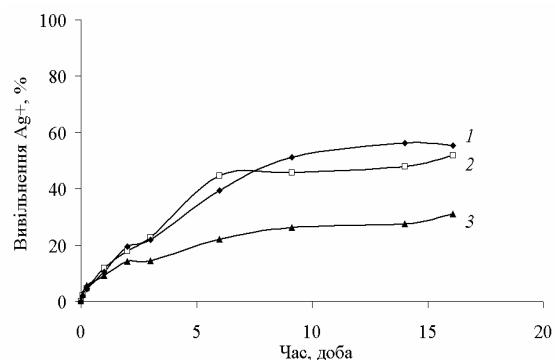


Рис. 1. Кінетичні криві вивільнення іонів срібла. Склад композитів: 1 – 63ПУ/37ПГЕМА + 9.5 % ($SiO_2/9\%AgNO_3$); 2 – 83ПУ/17ПГЕМА + 11.1 % ($SiO_2/9\%AgNO_3$); 3 – ПУ + 15.0 % ($SiO_2/9\%AgNO_3$)

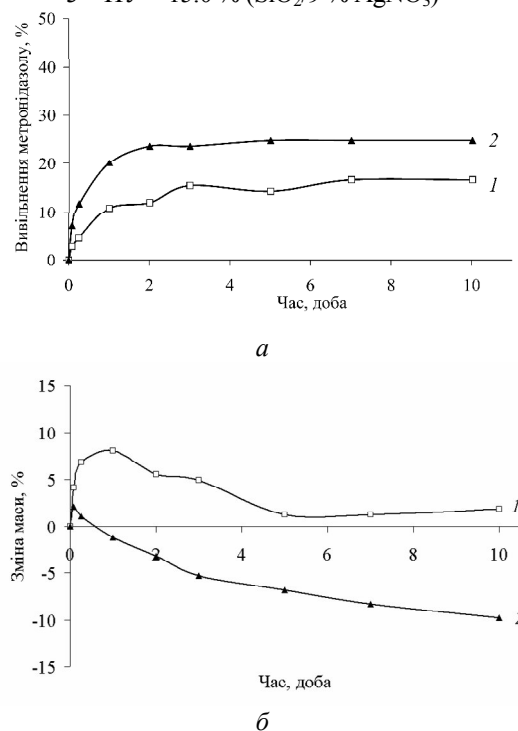


Рис. 2. Кінетичні криві вивільнення метронідазолу (а) та динаміка зміни маси матеріалів (б), занурених у водне середовище. Склад нанокомпозитів: 1 – 83ПУ/17ПГЕМА+3 % ($SiO_2/12\%$ метронідазолу); 2 – ПУ+3 % ($SiO_2/12\%$ метронідазолу)

Характер зміни маси для всіх зразків є одноманітним, а саме, протягом перших 1–2 діб спостерігається її зростання (фаза набухання), а потім – поступове зменшення (фаза десорбції). Порівняння матеріалів з наповнювачем однакового складу, але на основі різних матриць, свідчить, що зразки на основі ВПС 83ПУ/17ПГЕМА завжди є гідрофільнішими, ніж на основі 100 % ПУ. При цьому, для матеріалів на основі поліуретану маса зразків після її поступової втрати стає навіть меншою (на 8–10 %) за масу вихідних зразків. Типовий результат представлено на рис. 2 б.

Кінетичні криві для нанокompозитів з декаметоксином мають особливість. Для матеріалів з малим вмістом наповнювача, 3 і 5 %, і частини матеріалів з 10 % наповнювача (з 1 і 2 шарами декаметоксину) визначити анти-септик у водному середовищі не вдалось, що може свідчити про міцний зв'язок речовини з поверхнею кремнезему і відсутність його вільної фракції, яка мала б безперешкодно надходити в розчин. Для решти зразків – з 10 % наповнювача (3 шари декаметоксину) і 15 % наповнювача (2 і 3 шари декаметоксину) – спостерігається незвична двохфазна кінетика вивільнення: після певного «латентного» періоду (від 1 до 4 діб) декаметоксин починає поступово надходити в розчин, максимальний ступінь вивільнення при цьому незначний, не більше 22 %. Подібно до композитів з метронідазолом, краще вивільнення демонструють зразки на основі 100 % ПУ (рис. 3).

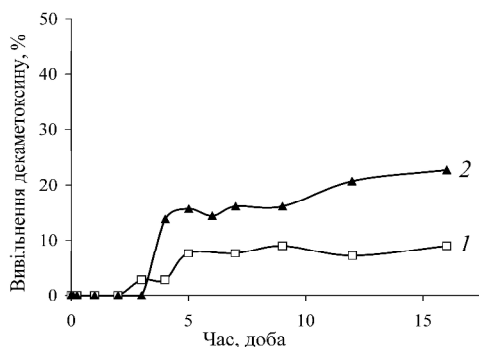


Рис. 3. Кінетичні криві вивільнення декаметоксину. Склад нанокompозитів: 1 – 83ПУ/17ПГЕМА + 10 % (SiO_2 /30 % декаметоксину); 2 – ПУ + 10 % (SiO_2 /30 % декаметоксину)

Кінетика вивільнення фурациліну (нітрофуразону) з матеріалу стандартного зразка хоча й відрізняється рівномірністю, але є дещо повільною (рис. 4). За першу добу вивільняється близько 20 % субстанції, а потім протягом 10 діб досягається 60 % вивільнення. Не помічено суттєвої різниці в швидкостях вивільнення активної речовини в дистильовану воду і в ізотонічний 0.9 % розчин NaCl.

Як було встановлено, протягом усього терміну спостереження (понад 2 тижні) іони срібла зі стандартного срібловмісного зразка взагалі не вивільнюються. Підвищення температури до 37 °C або заміна дистильованої води на 0.9 % розчин NaCl також не сприяли надходженню іонів срібла у рідке середовище. Втім, остаточний висновок про ефективність даного матеріалу можна зробити лише за результатами вивчення антимікробних властивостей.

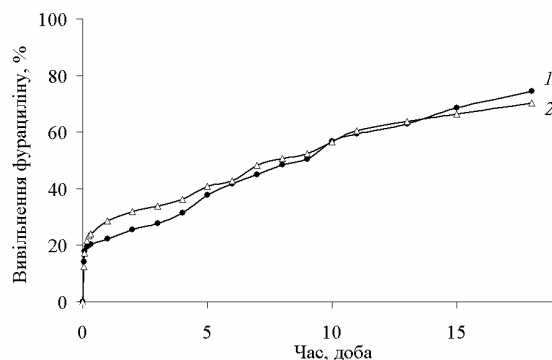


Рис. 4. Кінетика вивільнення фурациліну зі стандартного зразка: 1 – у дистильовану воду; 2 – в 0.9 % розчин NaCl

Результати впливу поверхні нанокompозитів на життєдіяльність дріжджових клітин вибірково наведені на рис. 5. Показано, що ненаповнені полімерні матриці ПУ/ПГЕМА, а також поліуретанова плівка характеризуються високою біосумісністю. Доволі великі скупчення клітин (рис. 5 а, б) свідчать про активний процес їхнього поділу та здатність до самоадгезії.

Срібловмісні нанокompозити натомість виявляють виражений негативний вплив на клітини: з часом кількість мертвих клітин на поверхні плівок зростає; серед клітин чимало слабо розвинених, із зменшеним майже в 2 рази об'ємом; на мікрофотографіях іноді складно розрізнити живі та мертві клітини

(рис. 5 в, з). Ці результати цілком узгоджуються з відомостями про біоцидні властивості сполук срібла. Встановлено, що в ряду срібловмісних композитів на основі матриць 63ПУ/37ПГЕМА, 83ПУ/17ПГЕМА, ПУ спостерігається монотонне збільшення пошкоджуючої дії на клітини. Відтак, найнегативніший вплив на дріжджі чинить композит зі складом ПУ+15.0 % ($\text{SiO}_2/9\% \text{AgNO}_3$) – підраховано, що через 3.5 год на його поверхні залишається тільки 25 % життєздатних клітин. При порівнянні результатів дріжджового тесту з кінетичними даними виходить, однак, що цей

композит характеризується повільнішою, порівняно з іншими композитами швидкістю вивільнення іонів срібла в часовому інтервалі 0–16 діб (рис. 1). Проте, детальний аналіз кінетичних кривих свідчить, що на початковому часовому відрізку (0–6 год) він суттєво випереджає за вивільненням срібла інші композити, а після 24 год починає відставати. Таким чином, нанокompозит на основі ПУ призначений для швидкої дії, а на основі ВПС ПУ/ПГЕМА – для тривалої дії, що слід урахувати під час розробки медичних виробів.

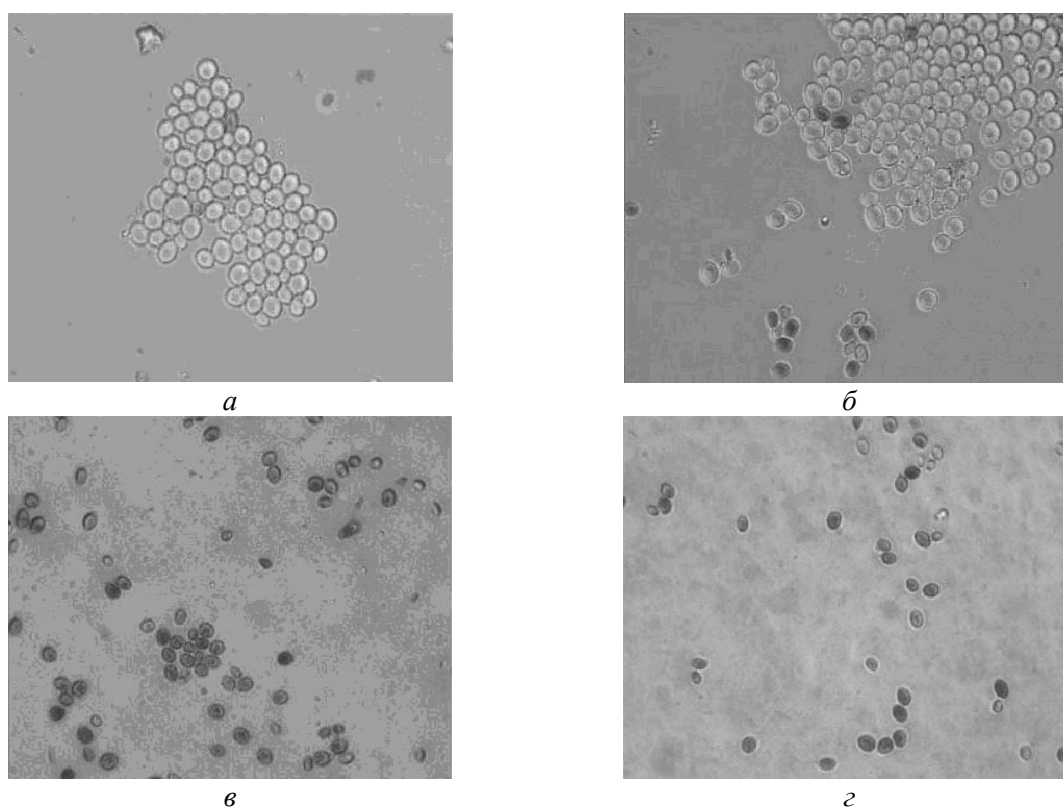


Рис. 5. Дріжджові клітини на поверхні полімерних плівок без наповнювача і срібловмісних нанокompозитів: 63ПУ/37ПГЕМА (а); 83ПУ/17ПГЕМА (б); 83ПУ/17ПГЕМА+11.1 % ($\text{SiO}_2/9\% \text{AgNO}_3$) (в); ПУ+15.0 % ($\text{SiO}_2/9\% \text{AgNO}_3$) (з). Терміни інкубації 1.5 год (а, б) і 3.5 год (в, з)

За результатами мікробіологічного дослідження найтривалішу антимікробну дію зберігають матеріали з іммобілізованим декаметоксином. Так, для нанокompозиту № 3 (83ПУ/17ПГЕМА+15 % ($\text{SiO}_2/30\% \text{декаметоксину}$)) затримка росту культури *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 виявляється навіть на 50 добу спостереження. Досить ефективно пригнічує ріст патогенних мікроорганізмів (за винятком *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

протягом перших трьох діб стандартний зразок з іммобілізованим нітрофуразоном (№ 8). Зовсім не виявляє антимікробних властивостей стандартний срібловмісний зразок (№ 7), що підтверджується даними кінетичного дослідження. Результати візуального спостереження на першу добу, коли із зразків відбувається найінтенсивніше вивільнення діючих речовин, вибірково представлені на рис. 6.

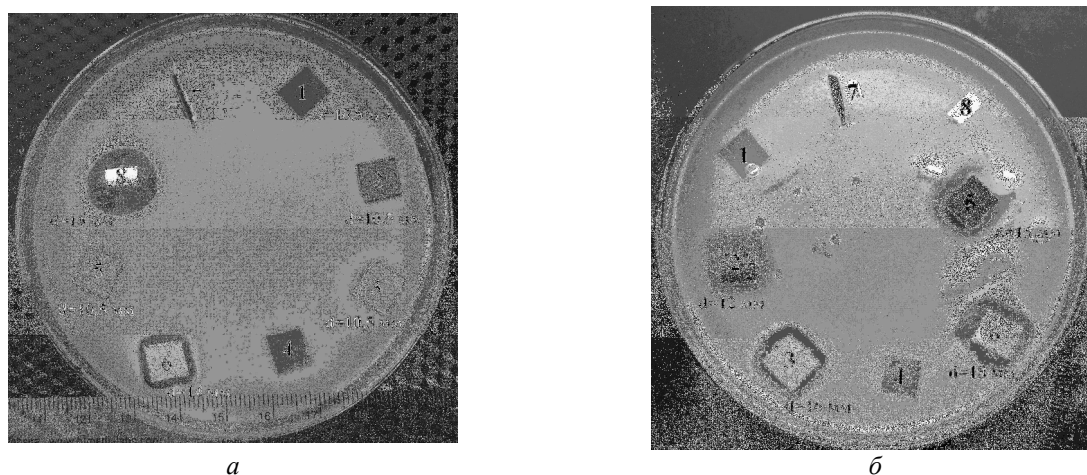


Рис. 6. Вплив досліджуваних матеріалів (№ 1–8 згідно з табл. 1) на ріст культур *Basillus subtilis* ATCC 6633 (а) і *Candida albicans* ATCC 885/653 (б)

Усі досліджувані матеріали витримали тест на аномальну токсичність: протягом 24 год після внутрішньочеревинного введення екстрактів, здобутих з полімерних плівок, тварини всіх дослідних груп залишилися живими, видимих проявів ознак інтоксикації не виявлено. Таким чином, вміст токсичних речовин (мономерів, продуктів неповної полімеризації тощо) у складі досліджуваних полімерів не перевищує загрозового для тварин рівня або ж вони взагалі відсутні.

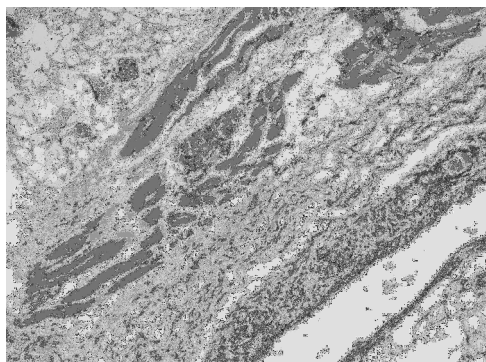
Після проведеної імплантації у всіх тварин, з контрольною групою включно, рана загоювалась без ускладнень, первинним натягом: на 14 добу спостерігалось формування рубця та відновлення морфологічної структури тканин. Найкращі результати відмічені при застосуванні матеріалів № 1–3, № 4 і № 7 (табл. 1). У тканинах тварин, яким імплантували ці матеріали, спостерігається найменш виражена запальна реакція, без значного нагноєння та некрозів, на 7–10 добу відмічається посилення проліферативних процесів. Наприклад, після вживлення ВПС 83ПУ/17ПГЕМА+15 % (SiO₂/30 % декаметоксину) (матеріал № 3) на 7 добу визначається незначний набряк без розволокнення сполучної фіброзної тканини дерми та жирової тканини гіподерми. У прилеглих до імплантату тканинах зберігається незначна інфільтрація лише лімфоїдно-гістіоцитарними елементами без домішок сегментоядерних лейкоцитів. Визначаються незначні поодинокі крововиливи

та повнокровні судини (рис. 7 а). Відносно гірші результати були в групі, де тваринам імплантували латекс (матеріал № 9) і, особливо, в контрольній групі № 11. Так, у препаратах тканин, отриманих від тварин контрольної групи на 3–10 добу між дермою та гіподермою, визначається значний набряк із розволокненням фіброзної тканини дерми та жирової клітковини гіподерми, поширені крововиливи та рясна запальна інфільтрація клітинами із значною кількістю сегментоядерних лейкоцитів. Спостерігається формування вогнищ абсцедування (гостре гнійне запалення), що особливо виражене у тканинах, прилеглих до ранового каналу, та визначаються поширені зони некрозів. У порожнині ранового каналу визначаються значні фібринозні нашарування із великою кількістю сегментоядерних лейкоцитів (рис. 7 б).

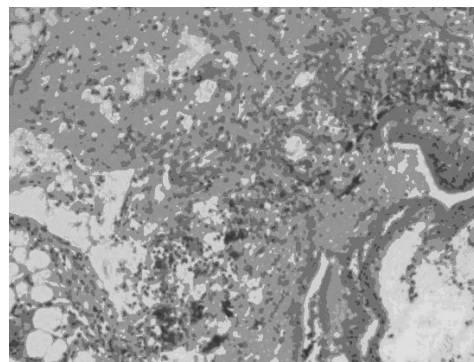
Результати лабораторних досліджень крові експериментальних тварин представлені в табл. 2. Як видно, протягом першої доби в усіх групах спостерігається підвищення рівня серомукоїду з негативною реакцією на С-реактивний білок, що може бути оцінено як відповідь організму тварини на механічну травму, нанесену під час створення підшкірного каналу. Починаючи з 3 доби, в усіх групах тварин відбувається нормалізація рівня гострофазових показників та концентрації лейкоцитів, що свідчить про відсутність запального процесу в ділянці підшкірного каналу та загальної реакції у відповідь на

імплантацію досліджуваних матеріалів. Загалом, зміни у системі крові корелюють з

результатами гістологічного дослідження тканин.



а



б

Рис. 7. Морфологічна картина тканин після імплантації композиту 83ПУ/17ПГЕМА +15 % (SiO₂/30 % декаметоксину) на 7 добу (а) та після формування підшкірного каналу без імплантації (контроль) на 10 добу (б). Пояснення в тексті

Таблиця 2. Результати гематологічних досліджень

Номер імпланту згідно з табл. 1	Лабораторні показники крові					
	1 доба		3 доба		14 доба	
	С/м, од	Л, г/л	С/м, од	Л, г/л	С/м, од	Л, г/л
1	0.35 ± 0.03*	10.4 ± 0.7	0.18 ± 0.01	8.5 ± 0.2	0.14 ± 0.01	7.0 ± 0.5
2	0.37 ± 0.04*	10,1 ± 0.5*	0.16 ± 0.02	6.9 ± 0.6	0.14 ± 0.01	7.5 ± 0.7
3	0.34 ± 0.03*	9.8 ± 0.3	0.16 ± 0.01	8.1 ± 0.6	0.14 ± 0.02	7.1 ± 0.7
4	0.36 ± 0.02*	9.5 ± 0.4	0.16 ± 0.01	8.8 ± 0.4	0.15 ± 0.01	7.6 ± 0.5
5	0.31 ± 0.04*	10.3 ± 0.8*	0.14 ± 0.02	7.5 ± 0.4	0.13 ± 0.01	6.4 ± 0.1
6	0.35 ± 0.03*	9.7 ± 0.3*	0.15 ± 0.01	6.9 ± 0.6	0.14 ± 0.01	6.7 ± 0.5
7	0.36 ± 0.04*	8.5 ± 0.2	0.16 ± 0.01	8.4 ± 0.3	0.16 ± 0.01	7.2 ± 0.4
8	0.40 ± 0.04*	13.4 ± 0.4	0.16 ± 0.01	10.5 ± 0.7	0.15 ± 0.01	8.2 ± 0.3
9	0.35 ± 0.03*	15.3 ± 0.3	0.18 ± 0.02	13.1 ± 0.2	0.16 ± 0.01	8.1 ± 0.6
10	0.33 ± 0.05*	11.4 ± 0.3*	0.15 ± 0.01	7.4 ± 0.3	0.14 ± 0.01	8.1 ± 0.3
11 (контроль)	0.39 ± 0.05*	14.9 ± 0.5	0.17 ± 0.01	11.4 ± 2.1	0.17 ± 0.01	6.5 ± 0.3

Примітка. Нормальна концентрація серомукоїду (С/м) становить 0.1–0.2 од [17]; лейкоцитів (Л) – 5.0–14.0 г/л (Г = 10⁹) [18]. В усіх пробах крові рівень С-реактивного білка (СРБ) був менше за 1 мг/л (результат негативний). * – p < 0.05 порівняно зі значеннями наступних періодів

ВИСНОВКИ

Нанокompозитний матеріал «Поліденс», матрицею якого слугує ВПС ПУ/ПГЕМА, а наповнювачем – кремнезем, модифікований нітратом срібла, метронідазолом або декаметоксином, демонструє пролонговану кінетику вивільнення цих речовин у водне середовище.

За допомогою прижиттєвого фарбування трипановим синім показано, що срібловмісні нанокompозитні матеріали суттєво пригнічують життєдіяльність дріжджових клітин, нанесених на їхню поверхню. Ненаповнені полімери ПУ

та ВПС ПУ/ПГЕМА практично не впливають на життєдіяльність дріжджів.

За даними мікробіологічного дослідження нанокompозитний матеріал «Поліденс» з інкорпорованим декаметоксином характеризується тривалою антимікробною дією, не поступаючи при цьому стандартним зразкам – полімерним матеріалам, з яких виготовлено уретральний та центрально-венозний катетери.

Результати гістоморфологічного та гематологічного досліджень свідчать, що матеріал «Поліденс» незалежно від типу інкорпорованої активної речовини (нітрат

срібла, метронідазол, декаметоксин) після імплантації під шкіру не виявляє місцевої запальної реакції та не чинить загальної токсичної дії на організм дослідних тварин – щурів та мишей.

Таким чином, нанокompозит на полімерній основі «Поліденс» є перспективним матеріалом

для виготовлення медичних імплантатів, а саме різноманітних трубчастих виробів (катетерів, дренажів).

Робота виконана в рамках проекту № 6.22.7.21 ДЦНТП «Нанотехнології та наноматеріали».

Медико-биологическое исследование нанокompозитного материала «Полиденс»

Е.С. Куколевская, И.В. Сиора, Р.Н. Чернопищук, И.И. Геращенко

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, igorgera57@ukr.net
Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова
ул. Пирогова, 56, Винница, 21018, Украина

Проведено тестирование медико-биологических свойств нанокompозитного материала «Полиденс», матрицей которого служат взаимопроникающие полимерные сетки из полиуретана и поли-2-гидроксиэтилметакрилата, а наполнителем – модифицированный антимикробными веществами кремнезем. Изучена кинетика высвобождения активных веществ в водную среду, влияние на жизнедеятельность дрожжевых клеток, антимикробные свойства, общетоксическое действие и реакцию окружающих тканей после подкожной имплантации материала лабораторным животным. По результатам испытаний установлено, что нанокompозит является нетоксичным, не вызывает выраженной местной воспалительной реакции и не уступает стандартным образцам по кинетике высвобождения активных веществ и антимикробным свойствам. Нанокompозит на полимерной основе «Полиденс» является перспективным материалом для изготовления медицинских изделий – имплантатов, катетеров, дренажей и т.п.

Ключевые слова: нанокремнезем, полиуретан, поли-2-гидроксиэтилметакрилат, нитрат серебра, метронідазол, декаметоксин, дрожжи, кинетика высвобождения, антимикробное действие, имплантация, токсичность

Medical and biological research of nanocomposite material «Polydens»

O.S. Kukolevska, I.V. Siora, R.M. Chornopyshchuk, I.I. Gerashchenko

Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, igorgera57@ukr.net
Pirogov Vinnitsa National Medical University
56 Pirogov Str., Vinnitsa, 21018, Ukraine

Nowadays one of the perspective trends in manufacturing technology of prolonged release surgical materials is introduction of bioactive substances into the polymer matrix. Earlier we synthesized the nanocomposite material "Polydens", which is an interpenetrating polymer network of polyurethane and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) filled with silica modified by antimicrobial substances, namely metronidazole, decametoxin and silver nitrate. In this work we examined medical and biological properties of the synthesized material. The release kinetics of antimicrobial substances into the aqueous medium was studied by absorption spectrophotometry and chemical methods. The influence on the vital activity of yeast cells, antimicrobial properties, general toxic effect and reaction of the surrounding tissues of "Polydens" were investigated microscopically, by agar diffusion method and after subcutaneous implantation of material "Polydens" to test animals, respectively. It has been found that the nanocomposite is non-toxic, causes no severe local inflammatory reaction, and the release kinetics of bioactive

substances does not inferior to the standard samples. Research of antimicrobial properties has shown that considered material significantly suppresses the vital activity of yeast cells and is characterized by a prolonged antibacterial effect. Polymer-based nanocomposite "Polydens" is a promising material in manufacturing of different medical devices, such as implants, catheters, drainages etc.

Keywords: nanosilica, polyurethane, poly(2-hydroxyethyl methacrylate), silver nitrate, metronidazole, decamethoxin, yeast, release kinetics, antimicrobial action, implantation, toxicity

ЛІТЕРАТУРА

1. Rosental K. Guarding against vascular site infection: arm yourself with the latest knowledge on equipment and technique to protect patients from catheter-related bloodstream infections // *Nursing Management*. – 2006. – V. 36. – P. 1249–1272.
2. Warren D. K., Quadir W. W., Hollenbear C. S. et al. Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital // *Crit. Care Med*. – 2006. – V. 34. – P. 2084–2089.
3. Bonza E., San Juan R., Munoz P. et al. Co-operative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2001. – V. 7. – P. 532–542.
4. Johnson J.R., Kuskowski M.A., Wilt T.J. Systematic review: antimicrobial urinary catheters to prevent catheter-associated urinary tract infection in hospitalized patients // *Annals of Internal Medicine*. – 2006. – V. 144. – P. 116–126.
5. Дмитриева Н.В., Петухова И.Н., Александрова И.А. и др. Послеоперационные инфекционные осложнения: диагностика, лечение, профилактика. Практическое руководство. – Москва: Практическая медицина, 2013. – 422 с.
6. Римша О.В., Сорокоумова Л.К. Характеристика ефективності використання уретральних катетерів з протимікробним покриттям // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2012. – № 22. – С. 160–163.
7. Карабанова Л.В., Гомза Ю.П., Несин С.Д. и др. Наноструктурированные полимерные материалы и нанокомпозиты на основе взаимопроникающих полимерных сеток для биомедицинского применения // *Наноразмерные системы и наноразмерные материалы: исследования в Украине / под ред. А.Г. Наумовца*. – Киев: Академперіодика, 2014. – С. 724–730.
8. Пятницкий И.В., Сухан В.В. Аналитическая химия серебра. – Москва: Наука, 1975. – 264 с.
9. Жебентяев А.И. Спектрофотометрическое определение декаметоксина с эозином // *Изв. вузов СССР. Сер. Хим. и химич. технология*. – 1984. – Т. 27, Вып. 4. – С.412–414.
10. Когет Т.О., Ковальчук В.П., Сидорук А.В. та ін. Відповідасмо на запитання практичних працівників // *Фармацевтичний журнал*. – 1994. – № 2. – С.107–111.
11. Путинцева О.В. Иммунология: практикум – В 2-х ч. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2008. – Ч. 2. – 44 с.
12. Анিকেєв В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – Москва: Просвещение, 1977. – 146 с.
13. Coder D.M. Assessment of Cell Viability / Robinson J.P., Darzynkiewicz Z., Hoffman R., Nolan J.P., Rabinovitch P.S., Watkins S., eds. *Current Protocols in Cytometry*. – New York (NY): Core Publication, John Wiley & Sons, Inc., 1997. – P. 9.2.1–9.2.14.
14. Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Широбоков В.П. та ін. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. Метод, рекомендації. – Київ: МОЗ України, Держ. фарм. центр, 2004. – 38 с.
15. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»: наказ Міністерства охорони здоров'я України № 167 від 05. 04. 2007 р. – Київ: МОЗ України, 2007. – 63 с.
16. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
17. Минухин В.В., Косилова О.Ю., Ткаченко В.Л. Уровень белков острой фазы как критерий эффективности антибактериальной терапии эшерихиозного экспериментального перитонита // *Запорожский медицинский журнал*. – 2013. – Т. 79, № 4. – С.99–101.
18. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1983. – 383 с.

REFERENCES

1. Rosental K. Guarding against vascular site infection: arm yourself with the latest knowledge on equipment and technique to protect patients from catheter-related bloodstream infections. *Nursing Management*. 2006. **36**: 1249.
2. Warren D.K., Quadir W.W., Hollenbear C.S., Elward A.M., Cox M.J., Fraser V.J. Attributable cost of catheter-associated bloodstream infections among intensive care patients in a nonteaching hospital. *Crit. Care Med*. 2006. **34**: 2084.
3. Bonza E., San Juan R., Munoz P., Voss A., Kluytmans J. Co-operative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001. **7**: 532.
4. Johnson J.R., Kuskowski M.A., Wilt T.J. Systematic review: antimicrobial urinary catheters to prevent catheter-associated urinary tract infection in hospitalized patients. *Annals of Internal Medicine*. 2006. **144**: 116.
5. Dmitrieva N.V., Petukhova I.N., Aleksandrova I.A. et al. *Postoperative infectious complications: diagnosis, treatment, prevention. Practical Guide*. (Moscow: Prakticheskaya Meditsina, 2013). [in Russian].
6. Rymsha O.V., Sorokoumova L.K. Characteristics of effectiveness of urethral catheters with antimicrobial coating. *Biomedical and Biosocial Anthropology*. 2012. **22**: 160. [in Ukrainian].
7. Karabanova L.V., Gomza Y.P., Nesin S.D., Bondaruk O.N. Nanostructured polymer materials and nanocomposites based on interpenetrating polymer networks for biomedical application. *Nanosized systems and nanosized materials: research in Ukraine*. (Kyev: Academperiodika, 2014). [in Russian].
8. Pyatnitski I.V., Sukhan V.V. *Analytical chemistry of silver*. (Moscow: Nauka, 1975). [in Russian].
9. Zhebentyaev A.I. Spectrophotometric determination of decamethoxine with eosin. *Reports of universities of the USSR. Series: Chemistry and Chem. Technology*. 1984. **27**(4): 412. [in Russian].
10. Kohet T.A., Kovalchuk V.P., Sidoruk A.V., Koltun P.S., Paliy I.G. Answers to the questions of practical workers. *Pharmaceutical J*. 1994. **2**: 107. [in Ukrainian].
11. Putintseva O.V. *Immunology: Practicum*. V. 2. (Voronezh: Publishing house of Voronezh State University, 2008). [in Russian].
12. Anikeyev V.V., Lukomskaya K.A. *Guide to practical lessons in microbiology*. (Moscow: Prosveshchenie, 1977). [in Russian].
13. Coder D.M. *Assessment of Cell Viability. Current Protocols in Cytometry*. (NY: Core Publication, John Wiley & Sons, Inc., 1997).
14. Volianskyi Y.L., Gritsenko I.S., Shyrobokov V.P. et al. *Study the specific activity of antimicrobial medications. Methodical recommendations*. (Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, State Pharm. Center., 2004). [in Ukrainian].
15. On approval of methodical instructions «Determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial preparations»: Order of the Ministry of Health of Ukraine N 167, 05.04.2007. (Kyiv, 2007). [in Ukrainian].
16. State Pharmacopoeia of Ukraine. (Kharkiv: RIREG, 2001). [in Ukrainian].
17. Minukhin V.V., Kosilova O.Y., Tkachenko V.L. Level of proteins of acute phase as criterions of antibacterial therapy effectiveness in the *E. coli* associated experimental peritonitis. *Zaporizhia Med. J*. 2013. **79**(4): 99. [in Russian].
18. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakharia E.A., Zapadnyuk B.V. *Laboratory animals. The Breeding, keeping, use in experiment*. (Kiev: Vyshcha Shkola, 1983). [in Russian].

Надійшла 02.07.2015, прийнята 31.03.2016