

УДК 66.098

## ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО И АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ СИЛИКОНА, ОБРАБОТАННОГО СИЛИКОНОВЫМ МАСЛОМ

<sup>1</sup>Мельников В.Л., <sup>1</sup>Митрофанова Н.Н., <sup>1,2</sup>Агейкин А.В., <sup>2</sup>Сурнина М.А.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза, e-mail: meidpgumi@yandex.ru;

<sup>2</sup>Лазерный центр, Ганновер (Германия)

Хирургия и анестезиология являются одними из самых ответственных областей медицины, так как работа в этих направлениях подразумевает под собой вмешательство в организм человека в его критическом состоянии. Следовательно, оборудование, которое используют медицинские работники в этой области, должно соответствовать всем необходимым требованиям, предъявляемым к ним. Хирургический и анестезиологический материал должен быть минимально токсичен и не контаминирован микроорганизмами. Цель настоящего исследования – определение токсичных свойств силикона, дополнительно обработанного силиконовым маслом, с использованием LDH-тестирования. Установлено, что LDH-тестирование с применением Plate Reader для количественной оценки погибших клеток позволяет с высокой достоверностью выявить токсичность тех или иных медицинских материалов. Токсичность экспериментальных образцов после их нахождения в силиконовом масле не превышает допустимых значений и существенно ниже группы с максимальной летальностью клеток. Использование данных видов силикона, обработанных дополнительно силиконовым маслом, в качестве медицинского материала предполагается возможным.

**Ключевые слова:** лактатдегидрогеназный тест, медицинские материалы, силикон, токсичность, силиконовое масло

## CYTOTOXICITY INTRAOPERATIVE AND ANESTHETIC MATERIAL SILICONE-BASED, SILICONE OIL TREATED

<sup>1</sup>Melnikov V.L., <sup>1</sup>Mitrofanova N.N., <sup>1,2</sup>Ageykin A.V., <sup>2</sup>Surnina M.A.

<sup>1</sup>Penza State University, Penza, e-mail: meidpgumi@yandex.ru;

<sup>2</sup>Laser Zentrum Hannover e.V. (Germany)

Surgery and anesthesiology are some of the most critical areas of medicine, since the work in these areas implies an interference with the human body in its critical condition. Consequently, the equipment used health professionals in this field, must meet all the necessary requirements to them. Surgical and anesthetic material should be minimally toxic and contaminated with microorganisms. The purpose of this study was to determine the toxic properties of silicone, silicone oil is further processed using LDH – testing. It is found that LDH – Testing with Plate Reader for quantifying dead cells allows high certainty to identify the toxicity or other medical supplies. Toxicity test specimens after their stay in the silicone oil does not exceed the allowable values and significantly lower than the group with maximal cell lethality. Using these types of silicone, silicone oil is further processed, as a medical material, it is assumed possible.

**Keywords:** lactate dehydrogenase test, medical materials, silicon, toxicity, silicone oil

Современные медицинские материалы, используемые в практике любого врача, а также среднего медицинского персонала, на сегодняшний день очень разнообразны, поэтому при приобретении того или иного материала необходимо производить четкий анализ всех свойств, ожидаемых от него. К таким свойствам можно отнести устойчивость к действию внешних температур, токсичность, наличие антибактериальных свойств и т.д.

Зачастую современные материалы практически лишены всех нежелательных свойств, но при их использовании имеется вероятность возникновения ряда побочных эффектов у пациентов. До сих пор существует риск инфицирования медицинского материала в условиях стационара. В данном случае речь идет о различных катетерах, интубационных трубках и других

материалах, полученных из такого материала, как силикон. Следовательно, многие ученые стремятся минимизировать нежелательные отрицательные свойства, присущие этому материалу.

Имеется предположение, рассматриваемое в статье, что силиконовое масло придает силикону повышенные антибактериальные свойства путем впитывания в силикон части силиконового масла, что препятствует инфицированию катетерного и дренажного материала [6].

Большую опасность представляют такие микроорганизмы, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* [2, 4, 5, 7, 8].

Присутствие данных микроорганизмов на катетерах и дренажах, а также последующая их контаминация в живом организме вызывают ряд бактериальных инфекций.

Хотя предположение о повышении антибактериальных свойств силикона при обработке его силиконовым маслом и является существенным, но оно не позволяет использовать данный обработанный материал в медицинской практике. Для этого необходимо провести ряд тестов, определяющих безопасность его использования [1, 3, 9–11].

**Цель исследования** – определение токсичных свойств силикона, дополнительно обработанного силиконовым маслом, с использованием LDH-тестирования для определения возможности его использования в медицинской практике.

#### **Материалы и методы исследования**

LDH-тест (лактатдегидрогеназный тест) используется для определения токсичности тех или иных материалов, химических соединений, растворов.

В данном случае имелись 2 образца различного вида силикона (кружки цилиндрической формы, диаметром 1 см), используемого в медицинских целях (в качестве интубационных трубок). В качестве первого экспериментального материала использовался Material Silicon Tubes, полученный из Высшей медицинской школы г. Ганновера (Medizinische Hochschule Hannover, МНН, Germany), применяемый для послеоперационного дренажа пациентов. Вторым экспериментальным материалом был стандартный полидиметилсилоксан – PDMS Sylgarol 184. Силиконовое масло – Silicone Oil 317667 – 250 ml.

Для выполнения эксперимента использовались следующие материалы и оборудование:

1. Инкубатор Thermo HERA cell 150.
2. 2 штуки 96 well-plate.
3. 3Т3 клетки (мышинные фибробласты).
4. Чистый медиум (DMEM) – питательная среда для клеток.
5. Тритон X-100 – неионное поверхностно-активное вещество, перфорирующее клеточную мембрану с последующей гибелью клеток.
6. LDH-субстрат – субстрат, необходимый для колориметрической оценки погибших клеток.
7. Plate Reader – прибор для количественного определения по числовому показателю постоянного LDH (в случае, когда все клетки убиты, следовательно, LDH максимальный) и спонтанного LDH (в случае варьирования количества убитых клеток).

Исследовательская работа выполнялась в 2 этапа.

1 этап. Подготовка обработанных силиконовым маслом образцов силикона.

Сначала были приготовлены чашки Петри с предварительно выращенными 3Т3 клетками (мышинными фибробластами) в растворе чистого медиума (DMEM) в количестве 100 тыс. клеток в 1 мл, инкубированные в течение 1 суток в инкубаторе при температуре 37°C и газовом соотношении 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>.

Имеющиеся силиконовые кружки помещались в силиконовое масло на 1 сутки. После этого они извлекались из силиконового масла и промокались стерильными салфетками. Затем они помещались на 2 суток в раствор медиума (DMEM) в 1-ую 96 well-plate в 1-й и 2-й ряды соответственно с целью определения отсутствия или же наличия силиконового масла с последующим удалением его остатков с поверхности материала.

В этой же 1-й 96 well-plate в 7-й ряд добавлялось 230 чистого медиума и 50 мкл тритона X-100.

2 этап. Окончательное приготовление экспериментальных образцов для непосредственного исследования.

Работа проводилась во 2-й новой 96 well-plate.

В 1-й ряд добавлялся клеточный медиум, полученный на первоначальном этапе подготовки материала в размере 50 мкл. Во 2-й ряд добавлялся чистый медиум в объеме 50 мкл. В 3-й ряд добавлялось 50 мкл смеси чистого медиума с тритоном X-100 из 7 ряда 1-й 96 well-plate. Затем в 4-й и 5-й ряды соответственно добавлялись полученные перемешанные растворы медиума и силиконового масла с двух образцов силиконовых трубок в объеме 50 мкл каждого из 1-й 96 well-plate. 6-й ряд – смесь клеточного медиума с тритоном X-100 (по 25 мкл каждого). 7-й ряд – чистый, а 8-й – чистый медиум в объеме 200 мкл.

Ко всем первым 6-ти рядам 2-й 96 well-plate в объеме 150 мкл добавлялся LDH-субстрат. После этого производилось погружение well-plate в Plate Reader для считывания информации.

#### **Результаты исследования и их обсуждения**

Измерения в Plate Reader производились каждые 15 минут в течение 1 часа. Визуально уже через 5–10 минут наблюдалось изменение окраски в 6-м ряду: желтый цвет изменялся на красный. Это связано со способностью тритона X-100 перфорировать клеточную мембрану, вызывая гибель клеток, которая визуализируется на рис. 1 в 6-м ряду.

Для более точной верификации результатов был убран «шум», исходящий от чистого медиума, и нормированы результаты, которые были получены из Plate Reader. Для этого выполнено следующее: из средних значений 1-го ряда (контрольной группы), 4-го ряда (1-го экспериментального образца) и 5-го ряда (2-го экспериментального образца) вычиталось среднее значение 2-го ряда (шум, который исходил от чистого медиума). После этого были получены окончательные результаты (табл. 2).

По результатам, полученным с помощью Plate Reader, была составлена диаграмма, на которой графически изображено соотношение токсических свойств двух экспериментальных образцов, погруженных в силиконовое масло (рис. 2).

Числовые значения, представленные в табл. 1 и диаграмме (рис. 2), указывают на то, что токсичность экспериментальных образцов практически в 2 раза ниже токсичности контрольной группы, что в свою очередь является практически невозможным. Следовательно, данный факт позволяет сделать вывод о том, что, скорее всего, силиконовое масло связывает с собой LDH-субстрат, что и приводит к двукратной разнице по сравнению с экспериментальной группой.

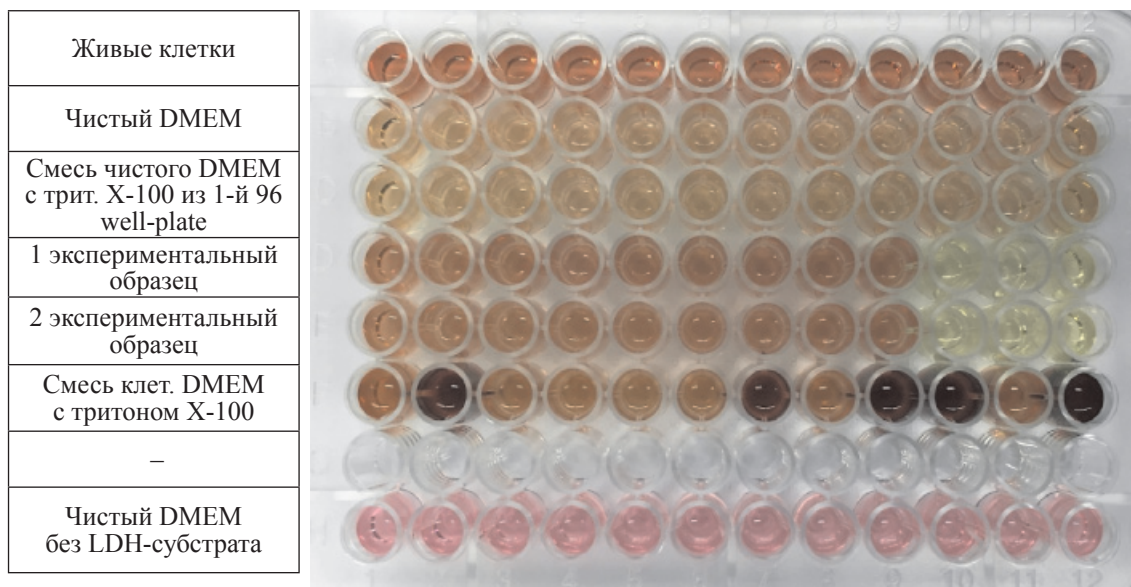


Рис. 1. Графическое изображение 2-й 96 well-plate через 10 минут после добавления LDH-субстрата

**Таблица 1**

Графическое изображение результатов, полученных с использованием Plate Reader (усредненные значения после 4-х измерений в течение часа с интервалом 15 + минут)

Среднее значение	1 ряд 0,1207	2 ряд 0,025517	3 ряд 0,027533	4 ряд 0,078678	5 ряд 0,081122	6 ряд 0,747925	7 ряд	8 ряд
1	0,1316	0,0236	0,0269	0,0741	0,0777	0,1736		0,0004
2	0,12	0,0261	0,0273	0,0775	0,0778	1,3635		0,0004
3	0,1164	0,0261	0,0273	0,0842	0,0745	0,1289		0,0001
4	0,1294	0,0228	0,0243	0,0712	0,0798	0,1165		0
5	0,1113	0,0247	0,0274	0,0819	0,0807	0,1034		0,0009
6	0,1285	0,0233	0,0279	0,0727	0,0825	0,1186		-0,0003
7	0,1164	0,0262	0,027	0,0758	0,0819	1,0448		0,0002
8	0,1179	0,0306	0,0306	0,0835	0,0866	0,1438		0,0005
9	0,1228	0,0255	0,0295	0,0872	0,0886	1,7159		0,0005
10	0,1122	0,0267	0,0273			2,241		0,0007
11	0,1211	0,0204	0,0265			0,1907		-0,0002
12	0,1208	0,0302	0,0284			1,6344		1E-04

**Таблица 2**

Графическое изображение окончательной обработки полученных результатов из Plate Reader

	Контр. гр.	ЭО1	ЭО2	Мертвые клетки
Среднее значение	0,095183	0,053161	0,055606	0,747925
1	0,106083	0,048583	0,052183	0,1736
2	0,094483	0,051983	0,052283	1,3635
3	0,090883	0,058683	0,048983	0,1289
4	0,103883	0,045683	0,054283	0,1165
5	0,085783	0,056383	0,055183	0,1034
6	0,102983	0,047183	0,056983	0,1186
7	0,090883	0,050283	0,056383	1,0448
8	0,092383	0,057983	0,061083	0,1438
9	0,097283	0,061683	0,063083	1,7159
10	0,086683			2,241
11	0,095583			0,1907
12	0,095283			1,6344

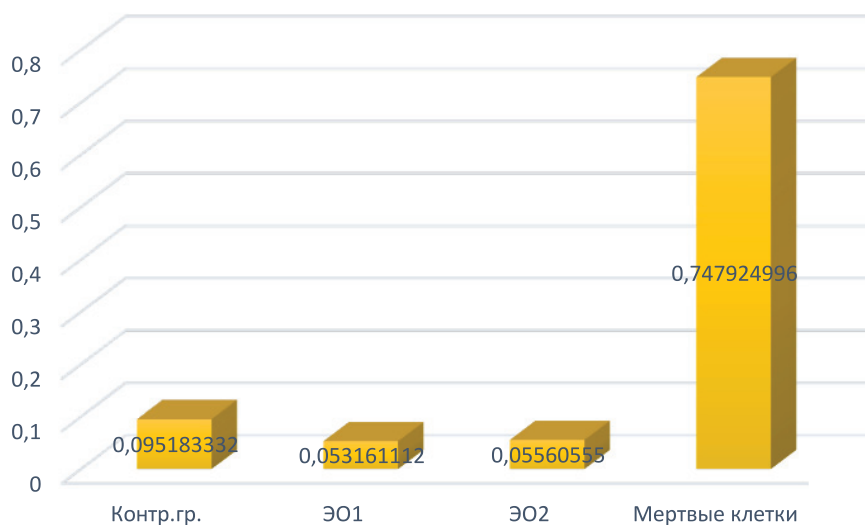


Рис. 2. Графическое изображение определения токсичности исследуемых материалов по сравнению с контрольной группой (клеточный медиум) и группой мертвых клеток (смеси клеточной DMEM с тритоном X-100)

Использование данных видов силикона, обработанных дополнительно силиконовым маслом, предполагается возможным, несмотря даже на некую специфичность методики для этого эксперимента, описанной выше. Даже в случае отсутствия связывания LDH-субстрата с силиконовым маслом двукратное увеличение концентрации убитых клеток в экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой будет также меньше, чем в группе с максимальной летальностью клеток.

Проведение дополнительных исследований в данной области с применением методик, позволяющих оценить как антибактериальные, так и токсические свойства комбинации силиконового масла с различными медицинскими материалами, поможет с более высокой точностью сделать заключение о свойствах экспериментальных образцов.

### Выводы

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что LDH-тестирование с применением Plate Reader для количественной оценки погибших клеток позволяет с высокой достоверностью выявить токсичность тех или иных медицинских материалов посредством определения количественного соотношения

погибших клеток в экспериментальных и контрольных образцах.

Токсичность экспериментальных образцов после их нахождения в силиконовом масле не превышает допустимых значений и существенно ниже группы с максимальной летальностью клеток, поэтому данные виды силикона могут быть использованы в качестве интраоперационного и анестезиологического материала.

*Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках программы «Стипендия Президента РФ для обучения за рубежом». Коллектив авторов выражает благодарность за предоставление научно-технической базы для проведения исследований и получение результатов руководителю отдела нанотехнологии Лазерного центра г. Ганновер д.ф.-м.н., проф. Б.Н. Чичкову.*

### Список литературы

1. Соловьев В.Б., Федорова М.Г., Любченко О.Д., Тартинов В.Ф. Морфологические изменения в зоне имплантации углеродсодержащих материалов в отдаленные сроки после операции // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2014. – № 3 (31). – С. 39–48.
2. Blanc D.S., Petignat C., Janin B., Bille J., Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study // Clin. Microbiol. Infect. – 1998. – № 4 (5). – P. 242–247.

3. Colas A., Curtis, J. *Silicone Biomaterials: History and Chemistry*. In *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. – 2nd ed. – Elsevier: Amsterdam, 2004. – P. 80–85, 697–701.
4. Fernández L., Gooderham W.J., Bains M., McPhee J.B., Wiegand I., Hancock R.E.W. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – № 54 (8). – P. 3372–3382.
5. Hancock R.E., Speert D.P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment // *Drug Resistance Updates.* – 2000. – № 3 (4). – P. 247–255.
6. Noah MacCallum, Caitlin Howell, Philseok Kim, Derek Sun, Ronn Friedlander, Jonathan Ranisau, Onye Ahanotu, Jennifer J. Lin, Alex Vena, Benjamin Hatton, Tak-Sing Wong, and Joanna Aizenberg *Liquid– Infused Silicone as a Biofouling-Free Medical Material* *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2015. – № 1. – P. 43–51.
7. Rosenthal V.D., Todi S.K., Álvarez-Moreno C., Pawar M., Karlekar A., Zeggwagh A.A., Mitrev Z., Udvardia F.E., Navoa-Ng J.A., Chakravarthy M. et al. Impact of a multidimensional infection control strategy on catheter-associated urinary tract infection rates in the adult intensive care units of 15 developing countries: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) // *Infection.* – 2012. – № 40 (5). – P. 517–526.
8. Seral C., Yolanda S., Algarate S., Duran E., Luque P., Torres, C., Castillo F.J. Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolidresistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2011. – № 301 (4). – P. 354–358.
9. Snelling A.M., Kerr K.G. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary // *J. Hosp. Infect.* – 2009. – № 73 (4). – P. 338–344.
10. Strateva T., Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – № 58 (9). – P. 1133–1148.
11. Swartjes J.J., Veeregowda D.H., van der Mei, H.C., Busscher H.J., Sharma P.K. Normally Oriented Adhesion versus Friction Forces in Bacterial Adhesion to Polymer-Brush Functionalized Surfaces Under Fluid Flow // *Adv. Funct. Mater.* – 2014. – № 24 (28). – P. 4425– 4441 DOI: 10.1002/adfm.201400217.