

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ СОСТАВА НИТЕЙ ЭНДОПРОТЕЗОВ С ПОКРЫТИЕМ ИЗ СЕРЕБРА И ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА СЕРЕБРА В ТКАНЯХ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ ПРИ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ ПЕРЕДНЕЙ БРЮШНОЙ СТЕНКИ

Мишина Е. С., Затолокина М. А., Нетяга А. А., Ярмamedов Д. М., Прусаченко А. В., Миронов С. Н.

*ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск,
e-mail:katusha100390@list.ru*

В статье представлены данные экспериментального исследования, выполненного на крысах-самцах линии Wistar с использованием новых сетчатых эндопротезов с нанесением ионов серебра. Было проведено ионометрическое исследование образцов брюшной стенки с имплантированным материалом. Достоверно доказано ($p \leq 0,05$), что изменение концентрации ионов серебра в тканях, окружающих эндопротез, уменьшается прямопропорционально срокам эксперимента. Установлено, что максимальная диффузия ионов серебра в ткань наблюдается на 14 сутки эксперимента, как в стерильных условиях, так и в условиях микробной обсемененности. Далее происходит фагоцитоз ионов серебра и достоверное ($p \leq 0,05$) снижение его концентрации. При этом нанесение ионов серебра не оказывает цитотоксического действия на окружающую ткань, окружающую эндопротез. Результаты исследования позволяют рекомендовать для дальнейшей клинической апробации эндопротезы с нанесением ионов серебра как материала при выборе для эндопротезирования брюшной стенки.

Ключевые слова: ионы серебра, сетчатые эндопротезы, наночастицы, протезы с биоцидными свойствами.

RESULTS OF ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF THE COMPOSITION OF THE ENDOPROSTHESIS THREADS COATED SILVER AND DYNAMICS OF CHANGE THE AMOUNT OF SILVER IN TISSUES OF THE ANTERIOR ABDOMINAL WALL IN HERNIA REPAIR

Zatolokina M. A., Mishina E. S., Netyaga A. A., Yarmamedov D. M., Prusachenko A. V., Mironov S. N.

Kursk State Medical University, Kursk, e-mail:katusha100390@list.ru

The article presents the results of experimental studies performed on male Wistar rats c using the new mesh implants for hernia repair with application of silver ions. ionometric study samples of abdominal wall was carried implanted material. It is authentically proved ($p \leq 0,05$) that changes in the concentration of silver ions in the tissues surrounding the prosthesis is reduced in direct proportion to the terms of the experiment. It is found that the maximum diffusion of silver ions in the tissue observed at day 14 of the experiment, in a sterile environment, and in terms of microbial contamination. Further there is the phagocytosis of silver ions and a significant ($p \leq 0,05$) reducing its concentration. In this application the silver ion has no cytotoxic effect on surrounding tissue surrounding the prosthesis. Results of the study can be recommended for further clinical testing of implants with the application of silver ions as the material in the selection for the replacement of the abdominal wall.

Keywords: silver ions, mesh implants, nanoparticles, implants with biocidal properties.

Для устранения послеоперационных дефектов брюшной стенки. На протяжении нескольких десятилетий широко используются сетчатые протезы из различных синтетических полимерных материалов. Все используемые в герниопластике сетчатые материалы обладают высокой физической и химической инертностью, малой реактогенностью, отсутствием канцерогенных свойств [3]. Однако основным недостатком этих протезов является высокий процент развития послеоперационных осложнений [8].

Большинство известных бактерий способны эффективно колонизировать поверхность эндопротезов, в результате чего развиваются инфекционные осложнения, при которых основным очагом инфекции служит биопленка микроорганизмов [2]. Новые представления о ходе развития микроорганизмов на поверхности имплантатов под защитой биопленки от внешнего антимикробного воздействия легли в основу разработки имплантатов, оказывающих биоцидное действие на биопленку изнутри [7]. Наиболее изученными и используемыми в биомедицинских исследованиях являются наноматериалы на основе серебра. Соединения серебра проявляют высокие биоцидные свойства по отношению к большому спектру микроорганизмов, что позволяет их широко использовать в медицине в виде нанопокровов различных имплантов [9,10]. Несмотря на то, что бактерицидные свойства соединений серебра хорошо известны и давно используются человеком, биохимические механизмы их действия изучены лишь частично [5,6,9]. В последнее время в литературе появились данные исследований наночастиц металлов и их действия на микроорганизмы, определены перспективы их использования в биомедицине [5]. Также встречаются единичные работы об использовании в герниопластике протезов с серебряным покрытием, но представленные в них данные разрознены и требуют дополнения. В изученной литературе нами не было получено данных о действии ионов серебра, нанесенных на различные полимеры, на окружающую их ткань, как в стерильных, так и в условиях микробной обсемененности.

Такое состояние проблемы и определило **цель нашего исследования**: провести сравнительное изучение электронно-микроскопического состава нитей экспериментальных образцов эндопротезов с нанесением ионов серебра, проанализировать динамику изменения количества серебра в тканях, окружающих эндопротезы в стерильных условиях и условиях микробной обсемененности.

Материалы и методы: Материалом для настоящего исследования явились образцы 3-х сеток с антибактериальным покрытием. Покрытие 2-х сеток состояло из ионов серебра («Унифлекс Ag», «Эсфил Ag»), и покрытие 3-его образца включало в свой состав антисептик повидон («Плазмофилт»). Образцы имплантов были предоставлены нам ООО «Линтекс» г. Санкт-Петербург и ЗАО «Плазмофилт» г. Санкт-Петербург. Сведения о производителях, химическом составе и способах изготовления сравниваемых образцов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика исследуемых образцов

Эндопротез	Материал	Диаметр нити	Толщина протеза	Поверхностная плотность	Кол-во серебра	Время напыления

Эсфил	ПП	0,12 мм	0,50 мм	75 г/м ²	-	-
Унифлекс	ПВДФ	0,12 мм	0,48 мм	160 г/м ²	-	-
Плазмофильтр	лавсан	0,10 мм	0,35 мм	105 г/м ²	повиаргол	-
Эсфил Ag	ПП	0,12 мм	0,50 мм	75 г/м ²	0,35 г/м ² .	30 сек
Унифлекс Ag	ПВДФ	0,12 мм	0,48 мм	160 г/м ²	1,10 г/м ²	30 сек

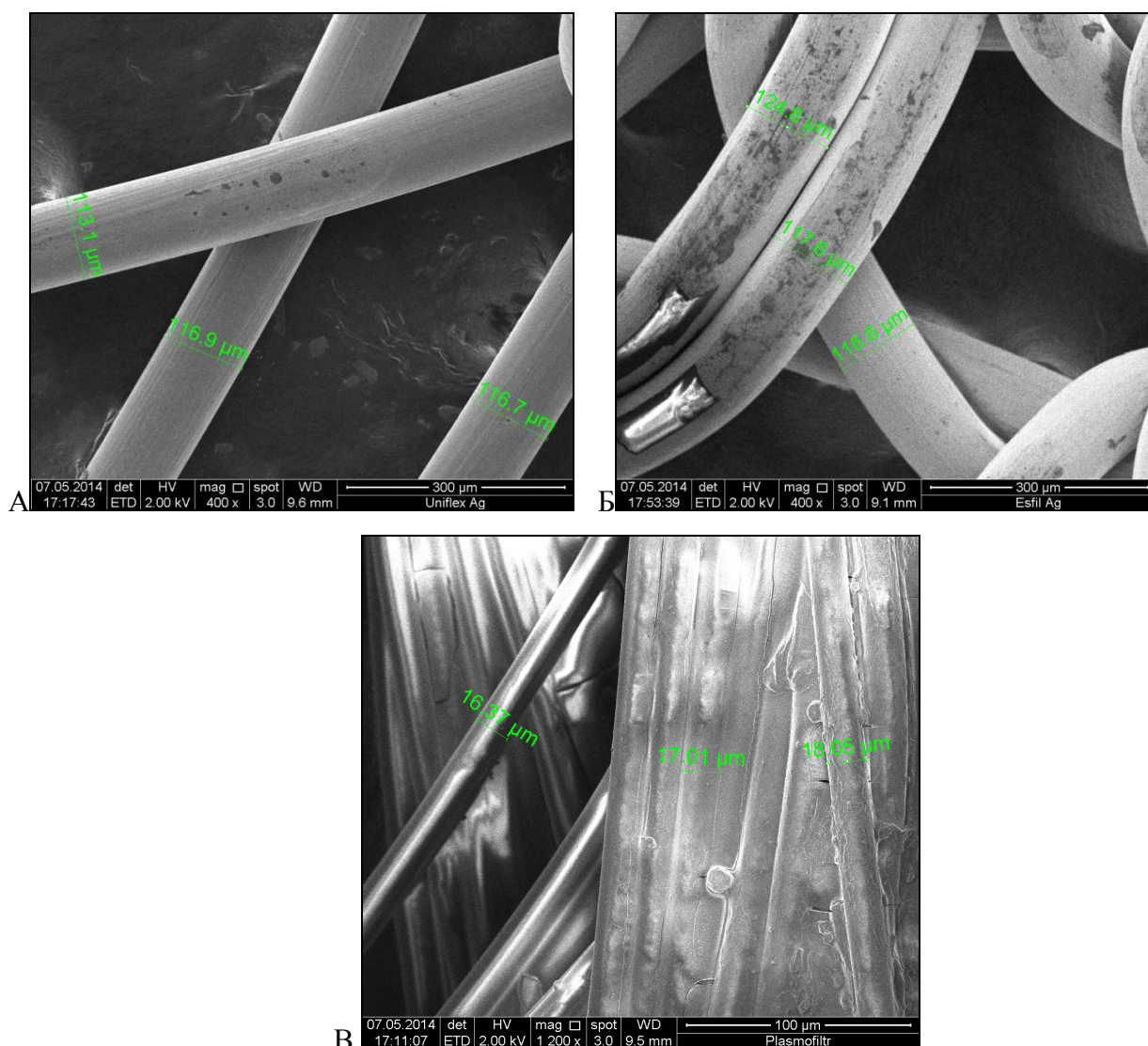
С целью изучения качественного состава нитей эндопротеза, образцы были исследованы методами растровой электронной микроскопии на микроскопе FEI Quanta 650 FEG в режиме высокого вакуума (10⁻³ Па) и при давлении паров дистиллированной воды 70 Па. Образцы мембран фиксировались на предметном столике в камере микроскопа пружинным проводящим контактом. Величина ускоряющего напряжения составила 2-5 кВ, диаметр пучка электронов в относительных единицах – 3, что позволило оценить ток пучка значениями 0,1 нА (2 кВ) – 1 нА (5 кВ). Изображения поверхности в режиме вторичных электронов регистрировались детектором Эверхарта – Торнли и газовым детектором вторичных электронов соответственно.

Эксперимент выполнен на 500 белых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г. Выведение животных из эксперимента проводили на 3, 7, 14, 21 и 30 сутки эксперимента.

Протокол экспериментов в разделе выбора, содержания животных, проведения операций и выведения их из опыта был составлен в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP), соответствует этическим нормам и составлен в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.) и приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003, «Об утверждении правил лабораторной практики», МЗ ССР № 755 от 12.08.1977. Для определения концентрации серебра в тканях передней брюшной стенки экспериментальных животных после имплантации изучаемых эндопротезов было проведено ионометрическое исследование потенциометрическим методом на иономере с использованием ионоселективного электрода. Ионоселективный электрод имеет ионочувствительную мембрану. Мембрана дает возможность узнавать только конкретный тип ионов и дает информацию об их количестве в виде электрического сигнала – потенциала, который связан с активностью, то есть концентрацией определяемого иона в анализируемом растворе. Таким образом, определялась только та часть серебра, которая перешла в ионную форму. Металлическое серебро, которое было нанесено на сетку эндопротеза и не перешло в ионную форму, данным способом не обнаруживается. Измерения для каждого образца тканей проводили в трехкратной повторности.

Полученные результаты и их обсуждение. В результате проведенного исследования было выявлено, что достоверных отличий в толщине волокон имплантов «Унифлекс Ag» и

«Эсфил Ag» нет. Средние значения толщины составили – $119,14 \pm 5,71$ нм. Ширина волокон у эндопротеза «Плазмофильтр» составила $17,34 \pm 1,71$ нм, при увеличении 400 крат (рисунок).



Электронная микроскопия толщины волокон эндопротезов при увеличении $\times 400$: А-

«Унифлекс Ag», Б – «Эсфил Ag», В – «Плазмофильтр»

При изучении содержания элементов рентгеновским фазовым анализом в составе нитей эндопротезов были получены следующие данные: в составе нитей сетки «Унифлекс Ag» относительная атомная масса серебра и углерода в 1,2 раза меньше, чем в составе нитей сетки «Эсфил Ag», а кислорода больше в 1,3 раза. Интересно отметить, что в отличие от других протезов, в состав волокон эндопротеза «Унифлекс Ag» входит фтор. При исследовании нитей эндопротеза «Плазмофильтр» методом рентгеновского фазового анализа атомная масса углерода в 1,3 раза меньше, чем у «Эсфил Ag», а кислорода в 1,5 раза больше, чем количество ионов серебра.

Изучение динамики изменения концентрации ионов серебра в тканях передней брюшной стенки при герниопластике показало: на 3-е сутки в стерильных условиях концентрация ионов серебра при использовании эндопротеза «Унифлекс Ag» больше в 1,5

раза, чем при использовании эндопротезов «Эсфил Ag» и «Плазмофилтр» (таблица 2). Исходя их характеристик используемых протезов, это объясняется более высоким содержанием серебра на сетке протеза. Кроме того, эндопротез «Унифлекс Ag» имеет более высокую плотностью, а, следовательно, большую площадь поверхности, покрытую серебром. На 7-е сутки наблюдалось незначительное увеличение концентрации ионов серебра, что связано с биохимическими процессами в тканях брюшной стенки. Так, при непосредственном контакте с окружающими тканями и концентрация серебра значительно возрастает. На 14-е сутки наблюдается резкое повышение концентрации ионов серебра при использовании всех видов протезов. На 21-е сутки при использовании протеза «Унифлекс Ag», где наблюдается наибольшая активность ионов серебра, по сравнению с другими видами протезов, нами выявлено резкое снижение концентрации ионов серебра. В виду низкого содержания серебра на сетке протеза «Эсфил Ag» происходит более медленная активация фагоцитоза. Поэтому на этом сроке эксперимента наблюдается незначительное изменение количества ионов серебра. Небольшое количество серебра на сетке эндопротеза «Плазмофилтр» свидетельствует о низкой активности ионизации серебра, что не приводит к значительному увеличению количества макрофагов, следовательно, и фагоцитоза, в данном случае, протекает медленно. Однако по результатам анализа видно, что на 21-е сутки происходит резкое снижение концентрации ионов серебра. Это объясняется тем, что для нанесения пленки серебра на сетку протеза используют полимерный композит – повиаргол, который очень хорошо растворяется в воде. Это свидетельствует в свою очередь о том, что в процессе растворения в тканевой жидкости высвобождение частиц серебра происходит очень быстро. Кроме того, легкая растворимость поливинилпирролидона, который обеспечивает адгезию серебросодержащего композита повиаргола в жидких средах, обуславливает быстрый уход серебросодержащего покрытия с поверхности протеза, следовательно, и короткий период антимикробного действия в месте воспаления.

При изучении динамики изменения концентрации ионов серебра при эндопротезировании в условиях микробной обсемененности наблюдалось достоверно ($p \leq 0,05$) меньшее его содержание в окружающих тканях передней брюшной стенки (таблица 3). Это связано с непосредственным взаимодействием ионов серебра с микробной клеткой. Пик перехода серебра в ионную форму и выход его в ткань наблюдается на 14-е сутки при использовании протезов «Эсфил Ag» и «Плазмофилтр», и на 21-е сутки при использовании протеза «Унифлекс Ag». К 30-м суткам концентрация достигла своего минимального значения и составила при использовании «Унифлекс Ag» – 5483,77 мкг/г, «Эсфил Ag» – 3389,96 мкг/г и «Плазмофилтр» – 1446,9 мкг/г.

Снижение концентрации ионов серебра в тканях брюшной стенки при использовании всех видов протезов на поздних сроках послеоперационного периода обусловлено фагоцитарной активностью макрофагов.

Таблица 2

Средние значения концентрации ионов Ag^+ в тканях передней брюшной стенки на различных сроках герниопластики при использовании эндопротезов с нанесением ионов серебра в стерильных условиях, $\text{M} \pm \text{m}$, мкг/г

срок эксперимента вид протеза	3-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	30-е сутки
«Унифлекс Ag»	3914,8 $\pm$ 2,22	4101,7 $\pm$ 1,59	9206,3* $\pm$ 2,11	1917,1* $\pm$ 1,03	1216,6* $\pm$ 1,57
«Эсфил Ag»	2142,5 $\pm$ 2,07	3402,6* $\pm$ 2,46	6997,92* $\pm$ 2,58	5788,16 $\pm$ 2,58	1479,5* $\pm$ 1,74
«Плазмофилтр»	2245,9 $\pm$ 3,38	3035,3* $\pm$ 4,03	4947,52 $\pm$ 1,41	1550,56* $\pm$ 1,29	1446,9 $\pm$ 1,91

Примечание: * – различия средних значений концентраций ионов Ag^+ ($p < 0,05$).

Таблица 3

Средние значения концентрации ионов Ag^+ в тканях передней брюшной стенки на различных сроках герниопластики при использовании эндопротезов с нанесением ионов серебра в условиях микробной обсемененности, $\text{M} \pm \text{m}$, мкг/г

срок эксперимента вид протеза	3-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	30-е сутки
«Унифлекс Ag»	1576,42 $\pm$ 1,83	3541,44 $\pm$ 2,71	4489,28 $\pm$ 2,54	11092,76 $\pm$ 8,43	5483,77 $\pm$ 2,06
«Эсфил Ag»	2827,73 $\pm$ 1,15	4433,11 $\pm$ 1,78	7943,55 $\pm$ 2,19	5265,04 $\pm$ 1,95	3389,96 $\pm$ 2,57
«Плазмофилтр»	2245,9 $\pm$ 3,38	3035,3* $\pm$ 4,03	4947,52 $\pm$ 1,41	1550,56* $\pm$ 1,29	1446,9 $\pm$ 1,91

Примечание: * – различия средних значений концентраций ионов Ag^+ ($p < 0,05$).

Выводы

1. Максимальная диффузия ионов серебра в ткани наблюдается на 14 сутки эксперимента, как в стерильных условиях, так и в условиях микробной обсемененности. Далее происходит фагоцитоз ионов серебра и достоверное ($p < 0,05$) снижение его концентрации. При этом нанесение ионов серебра не оказывает цитотоксического действия на окружающую ткань.

2. На эффективность работы и проявления антибактериальных свойств влияет не только состав покрытия, но и методика его нанесения и собственный материал имплантата.

3. Результаты исследования позволяют рекомендовать для дальнейшей клинической апробации эндопротезы с нанесением ионов серебра как материала при выборе для эндопротезирования брюшной стенки.

Список литературы

1. Бежин А. И., Должиков А. А., Жуковский В. А., Нетяга А. А., Плотников Р. В. Сравнительное экспериментальное изучение новых поливинилиденфторидных эндопротезов с карбиновым покрытием для герниопластики // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 14, № 1. – С. 99-101.
2. Кузнецов А. В., Добряков Б. С., Шестаков В. В., Смарж Т. М. Протекание раннего послеоперационного периода в герниологии при разных способах антибиотикопрофилактики // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – № 2. – С.39.
3. Лазаренко В. А., Иванов С. В., Иванов И. С., Цуканов А. В., Голиков А. В., Иванова И. А., Тарабрин Д. В., Гафаров Г. Н. Влияние аскорбиновой кислоты на течение раневого процесса при имплантации материалов «Эсфил» и «ProGrip» в эксперименте // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2015. – № 4. – С. 93-96.
4. Лобанов А. А., Чернова С. Н., Андронов С. В. и др. Воздействие металлического серебра на фагоцитарную активность нейтрофилов // Вестник новых медицинских технологий. – 2009. – № 2 (XVI). – С. 43.
5. Надточенко В. А., Радциг М. А., Хмель И. А. Антимикробное действие наночастиц металлов и полупроводников // Российские нанотехнологии. – 2010. – Т. 5, № 5/6. – С. 37-46.
6. Нарезкин Д. В., Сергеев Е. В. Ретроспективные результаты хирургического лечения больных с ущемленными послеоперационными вентральными грыжами // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2014. – № 3. – С. 66-72.
7. Насурова М. А. Влияние серебра на организм человека // Известия чеченского государственного педагогического института. – 2013. – № 1(7). – С. 178-180.
8. Нетяга А. А., Парфенов А. О., Нутфуллина Г. М., Жуковский В. А. Легкие или композитные эндопротезы для герниопластики: выбор материала на основании экспериментального изучения их биосовместимых свойств // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 5. – С. 57-59.

9. Суковатых Б. С., Бежин А. И., Нетяга А. А. Экспериментальное обоснование и клиническое применение отечественного эндопротеза «Эсфил» для пластики брюшной стенки // Вестник хирургии им. И. И. Грекова. – 2004. – № 6. – С. 47-50.
10. Щербаков А. Б. Препараты серебра: вчера, сегодня, завтра // Фармацевтический журнал. – 2006. – № 5. – С. 45-57.