© Коллектив авторов, 2016

Т. В. Попова[1], *Т. Г. Толстикова*[2], *А. Ю. Летягин*[1], *Л. Н. Рачковская*[1], *В. А. Бурмистров*[1]

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОДИНАМИКИ ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩЕГО ТОНКОДИСПЕРСНОГО СОРБЕНТА

[1] ФГБНУ "Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии", Новосибирск, Россия; e-mail: argentum.popova@mail.ru
[2] ФГБУН "Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова" Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия; e-mail: tg_tolstikova@mail.ru.

Представлены физико-химические и биологические свойства нового тонкодисперсного алюминий- и кремнийсодержащего сорбента и его модификации с помощью иммобилизованного на его поверхности частиц нанокластерного серебра. Приведены параметры пористой структуры сорбента, его сорбционной активности, скорость высвобождения серебра с поверхности сорбента при контакте с жидкой средой. Отмечена хорошая переносимость сорбентов животными при внутримышечном введении сорбентной матрицы и оригинального серебросодержащего сорбента. Не выявлено изменений в поведении, массе, внешнем виде животных. Результаты исследования лейкоцитарного, тромбоцитарного и эритроцитарного пулов периферической крови также свидетельствуют о биосовместимости сорбентов с тканями организма.

Ключевые слова: серебросодержащие сорбенты; нанокластерное серебро; биосовместимость.

Клинические наблюдения последних десятилетий свидетельствуют о существовании у современных антибиотиков ряда недостатков (быстрое распространение антибиотикоустойчивых штаммов, негативное влияние на микробиоценоз), в связи с чем возобновляется интерес к препаратам серебра, в том числе и серебросодержащим сорбентам [1 – 3]. В данной работе представлены результаты исследований биосвоместимости тонкодисперсного алюминий-, кремнийсодержащего сорбента с иммобилизованным на его поверхности нанокластерным серебром.

Экспериментальная химическая часть

Для исследования были взяты сорбенты: исходный, представляющий собой термоактивированный гидроксид алюминия (ТАГА, рентгеноаморфный гидроксид алюминия с примесью гиббсита) с нанесенным на его поверхность кремнийорганическим полимером полиметилсилоксаном (Al_2O_3 (CH_3) 3-Si-O-$(Si(CH_3)_2$-$O)_n$ — $Si(CH_3)_2$-O-Si $(CH_3)_3$) и в виде его (ТАГА) модификации серебросодержащим компонентом "Арговит-С" (Ag/ТАГА (Ag-Al_2O_3/$(CH_3)_3$-Si-O-$(Si(CH_3)_2$-$O)_n$ — $Si(CH_3)_2$-O-$Si(CH_3)_3$)) путем нанесения из водного раствора по влагоемкости на поверхность сорбента. Исследуемые образцы разработаны в ФБГНУ "НИИКЭЛ" совместно с ООО "Вектор-Вита". В табл. 1 представлены физико-химические характеристики разработанных образцов в сравнении с наиболее близким по составу сорбентом СУМС – 1 (γ-Al_2O_3/$(CH_3)_3$-Si-O-$(Si(CH_3)_2$-$O)_n$ – $Si(CH_3)_2$-O-$Si(CH_3)_3$), применявшимися в клинической практике [4].

Для модификации исходного сорбента в качестве источника серебра использовали раствор "Арговита-С" (ООО НПЦ "Вектор-Вита", Россия, Новосибирск), представляющий собой водную дисперсию 20 % поливинилпирролидона медицинского (поливидон), молек. масса (8000 ± 2000) (ФС 42-11-94-78), и серебра азотнокислого (ГОСТ 1277–75) с размером частиц 2 – 5 нм и содержанием серебра 1 % (водный раствор коричневого цвета (в проходящем свете) с зеленовато-серым оттенком (в отраженном свете) и небольшой опалесценцией; частицы серебра с высокой электронной плотностью, чёткими контурами, преимущественно округлой, эллипсоидной формы или неправильной формы; λ = 403,2 нм, pH = (7,4 ± 0,3), разрешенного к использованию внутрь в качестве биологически активной добавки). Так же имеются литературные данные, подтверждающие эффективность "Арговита-С" при лечении поверхностных ран [5, 6].

Общее содержание чистого Ag на сорбенте определяли методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (АЭС — ИСП). По результатам получено содержание чистого Ag в 1 г сорбента — (0,45 ± 0,2) %. При оценке выхода серебряного компонента с поверхности сорбционного агента (периодическое перемешивание сорбента с водой в соотношении 1:10 при комнатной температуре (21 ± 0,5) °C за 1,5 ч в процессе сорбционно-десорбционных процессов в окружающем сорбент-водном растворе методом спектрофотомерии при λ = 410 нм (спектрофотометр Cary 60 "Hekatech", Германия) постоянно обнаруживалось около 7 – 9 % серебра от общего содержания, приходившегося на 1 г сорбента.

Экспериментальная биологическая часть

Исследования по биосовместимости сорбентных препаратов проводили согласно ГОСТ ISO

Таблица 1

Физико-химические характеристики сорбентов

Образец	Об. % Ag в образце	Размер частиц, мм	$S_{уд.}$, $м^2/г$	V_{Σ}пор, $см^3/г$	Насыпная плотность, $г/см^3$	pH	Сорбционная активность в отношении метиленового голубого, мг/г
ТАГА	-	до 0,04	100	0,2	0,98 – 1,23	8,4 ± 0,1	11,0 ± 0,8
Ag/ТАГА	0,45 ±	до 0,04	98	0,2	0,99 – 1,24	8,0 ± 0,1	11,0 ± 0,8
СУМС-1	-	0,4 – 1	200	0,4	0,75 – 1	7,8 ± 0,1	16 ± 0,8

Примечание: согласно Унифицированной методики 1979 г. определяли величину удельной поверхности ($S_{уд.}$) методом Брунауэра — Эммета — Теллера (БЭТ) по определению объема газа (азота) относительно мономолекулярного слоя и площади поперечного сечения молекулы адсорбированного газа с построением изотермы адсорбции азота; суммарный объем пор (V_{Σ}пор) — методом ртутной порометрии (установка DigiSorb-2600 Micromeritics, США); насыпную плотность образцов в слое после их естественной усадки; pH — путем периодического перемешивания в течение 50 мин навески сорбента с дистиллированной водой в соотношении 1:20 соответственно (определение pH с помощью pH-метра pH-410 "НПКФ Аквилон", Россия), фиксируя температуру раствора; сорбционную активность в отношении метиленового голубого (маркер среднемолекулярных токсинов) определяли по методике [9] (спектрофотометр Cary 60 "Hekatech", Германия); размер частиц до 0,04 мм определяли лазерным дифрактометрическим (оптическим) методом (SHIMADZUSALD-2101 (SALD-2102-WEAL: V1.20, Япония); размер частиц 0,4 – 1 мм определяли согласно [8].

10993-1-2011 на базе лаборатории фармакологических исследований отдела природных и биологически активных соединений ФГБНУ НИОХ на 18 крысах-самках линии Вистар массой по (200 ± 2) г. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Методом случайного отбора созданы 3 группы по 6 особей (животные были маркированы, но содержались в одном сообществе): группа I — внутримышечное введение воды дистиллированной (2,5 мл) (негативный контроль); группа II — внутримышечное введение исходного сорбента ТАГА в водном растворе (0,05 мл) в соотношении 2:1 соответственно; группа III — внутримышечное введение модифицированного серебром сорбента Ag/ТАГА в водном растворе (0,05 мл), соотношение сорбент — вода 2:1. Введение сорбента осуществляли в стерильных условиях однократно под действием диэтилового эфира с помощью индивидуального инсулинового шприца с использованием иглы 0,9 × 40 мм в область широчайшей мышцы спины (m. *latissimus dorsi*) [9, 10] под углом 45° с обработкой места введения 70 % раствором этанола. После прокола место введения отмечали с помощью маркера. Общий объем вводимого порошка, находящегося в виде взвеси, составлял 0,05 мл. Длительность исследования — 21 сут. Через каждые 3 дня проводили наружный осмотр места введения методом пальпации, а также наблюдали за общим состоянием животного. Для оценки первичных гематологических изменений у всех испытуемых групп проводили забор крови до начала эксперимента и на 7, 14 и 21 сут после введения путем отсечения кончика хвоста, предварительно фиксируя животное в пластиковой камере. Эвтаназию животных осуществляли на 21 день передозировкой ингаляционного наркоза.

Оценивали следующие параметры (гематологический анализатор CA 530 – 16 Oden, Medonic, Швеция) — количество лейкоцитов (WBC; норма $(7 – 14) \cdot 10^9$/л); количество эритроцитов (RBC; норма $(6 – 10) \cdot 10^{12}$/л) и эритроцитарные индексы: концентрацию гемоглобина в цельной крови (HGB; норма 110 – 180 г/л), гематокрит (HCT; норма 34 – 48 %); количество тромбоцитов (PLT; норма $(200 – 600) \cdot 10^9$/л) [11 – 13]. Результаты представлены на графиках в виде "среднее ± стандартная ошибка" и в подрисуночных таблицах в виде средних величин. Различия между группами, в связи с их немногочисленностью, оценивали с помощью непараметрических методов анализа по двухстороннему кри-

Таблица 2

Динамика абсолютного содержания эритроцитов в периферической крови

Группа	RBC, $* 10^{12}$/л			
	Продолжительность эксперимента, сут			
	0	7	14	21
I	7,2 ± 0,5	7,8 ± 0,4	7,6 ± 0,2	8,0 ± 0,2
II	7,5 ± 0,4	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,2	7,2 ± 0,2*
III	7,1 ± 0,2	6,6 ± 0,5	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2**

Здесь и далее: группа I — внутримышечное введение воды дистиллированной (2,5 мл) (негативный контроль); группа II — внутримышечное введение исходного сорбента ТАГА в водном растворе (0,05 мл); группа III — внутримышечное введение модифицированного серебром сорбента Ag/ТАГА в водном растворе (0,05 мл); $n = 6$ в каждой группе. Статистические различия: * $p < 0,05$, ** $0,05 < p < 0,1$ по сравнению с негативным контролем.

Таблица 3

Динамика абсолютного содержания гемоглобина в периферической крови

Группа	HGB, г/л			
	Продолжительность эксперимента, сут			
	0	7	14	21
I	131,5 ± 8,0	137,0 ± 8,0	143,8 ± 4,1	144,8 ± 2,3
II	143,8 ± 5,7^	130,5 ± 2,6*	139,3 ± 2,2	132,0 ± 2,7**
III	129,3 ± 3,7^	122,5 ± 10,4*	139,8 ± 3,0	134,8 ± 3,1

Статистические различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с негативным контролем; ^ $p < 0,05$ по сравнению с группой II и III.

Таблица 4

Динамика гематокрита периферической крови

Группа	HCT, %			
	Продолжительность эксперимента, сут			
	0	7	14	21
I	40,2 ± 2,4	42,5 ± 2,1	41,4 ± 1,0	43,4 ± 0,8
II	42,7 ± 1,5	39,9 ± 0,7	41,3 ± 0,8	39,5 ± 0,6**
III	39,1 ± 1,2	35,9 ± 3,0	40,9 ± 0,7	40,1 ± 0,8*

Статистические различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с негативным контролем.

Таблица 5

Динамика абсолютного содержания тромбоцитов в периферической крови

Группа	PLT, · 10^9/л			
	Продолжительность эксперимента, сут			
	0	7	14	21
I	580,0 ± 35,5	681,2 ± 49,9	815,0 ± 49,2	684,7 ± 54,9
II	620,3 ± 31,3	621,3 ± 29,0	783,5 ± 45,4	614,2 ± 48,4
III	678,3 ± 49,6	688,5 ± 76,0	761,5 ± 47,1	667,8 ± 40,5

терию Манна — Уитни, критерий значимости различия выборок $p \le 0,05$ (при $n = 6$, количество инверсий $U \le 5$). Статистическую оценку полученных данных проводили с использованием программ Excel 2013 и Statistica 8.0.

Результаты и их обсуждение

На протяжении всего эксперимента животные были активны, изменений в шерстном покрове и массе тела не выявлено. Мышечный слой в области введения взвесей сорбентов прощупывался легко, уплотнений не обнаружено, при пальпации животные вели себя спокойно, то есть болевых ощущений и дискомфорта не испытывали; оценка общего состояния на всем протяжении эксперимента — удовлетворительная.

Абсолютное содержание эритроцитов и гемоглобина в периферической крови во всех группах и сроках находилось в пределах нормы (табл. 2, 3).

Абсолютное содержание эритроцитов к 7 дню имеет лишь тенденцию к снижению у группы II и III и тенденцию к повышению — в контроле. К 14 сут межгрупповых различий не было, но к 21 сут по сравнению с "нелеченым" контролем в экспериментальных группах уровень эритроцитов снизился (во II группе $p = 0,025$; в группе III $p = 0,078$). Эти колебания можно признать малозначимыми, поскольку они не выходили за рамки нормы.

Межгрупповые статистически значимые различия уровня гемоглобина в начале эксперимента были отмечены между группами II и III. На 7 сут в экспериментальных группах параметр снижался, при этом в группе III статистически более значимо, чем в группе II ($p = 0,025$). На 14 сут межгрупповые различия нивелировались, но к 21 сут ситуация повторялась, и уровень в группе II был значимо ниже, чем в "нелеченом" контроле ($p = 0,010$). Можно отметить различие динамики уровня гемоглобина: в леченых группах — волнообразное снижение, в "нелеченом" контроле — плавное повышение; но в рамках нормы.

Уровень гематокрита периферической крови крыс (табл. 4) в группах с внутримышечным введением ТАГА и Ag/ТАГА на 7 сут имеет тенденцию к снижению (в сравнении с группой негативного контроля), а на 21 сут эти изменения приобретают статистическую значимость (в группе II $p = 0,008$; в группе III $p = 0,037$). При этом на протяжении эксперимента параметр остается в пределах нормы, что также указывает на то, что внутримышечное введение сорбционных агентов не вызывает существенных отклонений в кроветворной системе подопытных животных.

Значения абсолютного содержания тромбоцитов (табл. 5) в периферической крови не имели статистически значимых межгрупповых отличий на протяжении всего эксперимента, превышая верхнюю границу нормы на 5 – 30 %. К 21 дню после введения сорбентов появляется тенденция к снижению и межгрупповому выравниванию значений показателя.

Показатели динамики абсолютного содержания лейкоцитов в периферической крови (табл. 6) статистически значимых отличий не имели. В группе I, в которой животные получали "прокол" без введения препарата, параметр волнообразно увеличивался на протяжении всего эксперимента (в сравнении с начальным уровнем) с максимумом на 14 сут (на 56,9 %), а на 21 сут — снижался до 30,3 % от начального уровня. Это указывает на явное наличие реакции лейкоцитарного пула периферической крови на воздействие (прокол мышечного слоя).

Динамика содержания лейкоцитов у группы II, в которой животным вводили исходный сорбент, показывает рост на 7 и 14 сут (соответственно на 30,3 и 32,4 % от исходного уровня), и снижение к 21 сут, оставаясь на 16,5 % выше исходного уровня. Эти изменения также указывают на наличие реакции лейкоцитарного пула, но менее выраженной, чем в группе I.

В группе III, в которой животным вводили модифицированный нанокластерным серебром сорбент, выявлялось уменьшение количества лейкоцитов на 7 сут на 13,3 % от исходного уровня, затем рост на 14 сут на 20,4 % выше исходного, и спад к 21 сут на 9,8 % ниже

Таблица 6

Динамика абсолютного содержания лейкоцитов в периферической крови

Группа	WBC, · 10^9/л			
	Продолжительность эксперимента, сут			
	0	7	14	21
I	19,5 ± 2,03	19,8 ± 1,7	30,6 ± 1,4	25,4 ± 4,2
II	18,8 ± 2,6	24,5 ± 1,8	24,9 ± 2,7	21,9 ± 1,9
III	22,5 ± 2,5	19,5 ± 2,1	27,1 ± 3,8	22,0 ± 2,9

исходного уровня. То есть в группе III динамика была более сглаженной, чем в группе II, и тем более, чем в группе I. По всей видимости, наличие нанокластерного серебра и выход его с поверхности матрицы (в группе III) сгладили реакцию на прокол мягких тканей и введение в них сорбента за счет антисептических свойств серебра, что заметно снизило нагрузку на лейкоцитарную систему, поскольку на 21 сут эксперимента количество лейкоцитов в крови в группах II и III практически не различалось (как между группами, так и с исходным уровнем), в то время, как у группы I этот параметр был на ~ 15 % выше "леченых" серий.

Результаты исследования реакции мягких тканей, лейкоцитарного, тромбоцитарного и эритроцитарного пула периферической крови на внутримышечное введение исходного и модифицированного нанокластерным серебром сорбентов позволяют сделать заключение о биосовместимости с тканями организма как матрицы (ТАГА), так серебросодержащего сорбента (Ag/ТАГА), что позволяет рекомендовать их для дальнейших исследований в качестве аппликационных средств в условиях нарушения целостности кожного покрова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. И. Бородин, В. А. Труфакин, В. В. Асташов и др., *Способы эндоэкологической реабилитации организма*, Издательский дом "МАНУСКРИПТ", Новосибирск (1999), сс. 49 – 52.
2. М. И. Лосева, Г. С. Солдатова, Т. И. Поспелова и др., *Проблемы экспериментальной клинической и профилактической лимфологии*, *Матер. межд. симп*, Новосибирск (2000), сс. 179 – 182.
3. Л. Н. Рачковская, А. Ю. Летягин, В. А. Бурмистров и др., *Сиб. науч. мед. ж.*, **35**(2), 47 – 54 (2015).
4. Л. Н. Рачковская, *Углеродминеральные сорбенты для медицины*, СО РСХН, Новосибирск (1996), сс. 5 – 8.
5. Л. И. Благитко, А. С. Полякевич, А. И. Бромбин и др., *Применение препаратов серебра в медицине*, ЗАО "Вектор-Бест", Новосибирск (2002), сс. 20 – 25.
6. Н. Н. Шкиль, Н. А. Шкиль, В. А. Бурмистров и др., *Науч. ж. КубГАУ*, **68**(04), 46 (2001).
7. ГОСТ 4453 – 74 Уголь активный осветляющий древесный порошкообразный. Технические условия, Москва (1992).
8. ГОСТ 6613–86. Сетки проволочные тканые с квадратными ячейками. Технические условия (с Изменением № 1), Москва (1986).
9. А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков, *Анатомия крысы*, Лань, Санкт-Петербург (2001), сс. 73 – 75.
10. А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, "Гриф и К", Тула (2012), сс. 21 – 23.
11. Ж. Долаев, А. Солтангулов, Е. Нурмахан и др., *Успехи совр. естествозн.*, № 9, 29 – 30 (2013).
12. Т. Г. Демченко, К. М. Бурова, *Успехи совр. естествозн.*, № 9, 28 – 29 (2013).
13. С. А. Луговская, *Лаборатория. Ж. для врачей*, № 5, 7 – 9 (1997).

Поступила 14.01.15

EXPERIMENTAL STUDY OF BIOCOMPATIBILITY OF A SILVER-CONTAINING SORBENT AND SOFT TISSUES

T. V. Popova[1*], T. G. Tolstikova[2**], A. Yu. Letyagin[1], L. N. Rachkovskaya[1], and V. A. Burmistrov[1]

[1] Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, 630117 Russia

[2] N. N. Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

e-mail: * argentum.popova@mail.ru; * tg tolstikova@mail.ru

Physicochemical and biological properties of a new fine-dispersed silicon and aluminum containing sorbent are presented and its modification using silver nanoclusters immobilized on the surface of sorbent particles is described. Parameters of the porous structure of the sorbent, its sorption activity, and rate of silver release from the sorbent surface in contact with a liquid medium have been determined. Both the sorbent matrix and the original silver-modified sorbent are well tolerated by experimental animals upon intramuscular administration, leading to no changes in the behavior, weight, and appearance of animals. Results of the study leukocyte, platelet and red blood cell pools of peripheral blood also confirmed biocompatibility of sorbents with body tissues.

Keywords: silver-containing sorbents; silver nanoclusters; biocompatibility.