

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL RESEARCHES

DOI: 10.29413/ABS.2018-3.1.17

УДК 556.115:54.04

Урузбаев Р.М.

АНАЛИЗ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СУПЕРНАТАНТА СПЛАВА НИКЕЛИДА ТИТАНА

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России
(625000, г. Тюмень, ул. Одесская, 54, Россия)

В настоящее время по-прежнему актуальной остаётся проблема поиска средств лечения глубоких термических поражений кожи, исключающих оперативное вмешательство. Активно используемый в медицине нитинол, помимо своего уникального свойства «память формы», также может применяться и в качестве ускорителя регенераторных свойств. До настоящего момента в литературе отсутствуют как публикации о его использовании с этой целью, так и сведения о супернатанте, приготовленном на его основе. В статье представлены результаты исследования супернатанта сплава никелида титана, выбранного для ускорения регенеративных процессов кожного покрова на модели термической раны. В качестве исследуемого субстрата представлена дисперсная система, полученная методом ультразвукового диспергирования с последующей выдержкой до стабилизации турбидности. В ходе проведённого анализа получена качественная и количественная оценка химического состава супернатанта на предмет присутствия в его составе ионов никеля и титана; доказана его безопасность при взаимодействии с биологическими средами (наличие ионов никеля статистически значимо ниже, чем ионов титана); изучены его микробиологические возможности (бактерицидные, а также бактериостатические свойства).

Ключевые слова: нитинол, супернатант, химические свойства, бактериостатические свойства, бактерицидность, ионный состав

ASSESSMENT OF CHEMICAL COMPOSITION AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF TITANIUM NICKELIDE SUPERNATANT

Uruzbaev R.M.

Tyumen State Medical University
(ul. Odesskaya 54, Tyumen 625000, Russian Federation)

According to the World Health Organization, in the structure of internal injuries, burns occur in 2.1 per 1000 adults. In practice, all victims after stabilization of the condition are treated surgically with the autodermoplasty, which in the late period is accompanied by a rough scarring, sometimes with the deformation of the damaged area. In addition, infectious complications worsen and aggravate the wound healing process, and also significantly prolong the epithelialization time. A wound is usually infected by opportunistic pathogenic microflora resistant to various groups of antibiotics and antiseptics, by which the affected areas are treated. Modern researches are aimed at finding ways to accelerate regenerative processes of the affected area, to avoid surgical treatment and prevent infection contamination. The object of this study was titanium nickelide supernatant. Currently, there are no published data on the chemical composition of the supernatant, as well as its microbiological safety. This alloy is actively and successfully used in traumatology, dentistry and other fields of medicine. The supernatant was prepared under sterile conditions at a rate of 10 g of titanium nickelide powder per 1 liter of distilled water. In the course of the studies it was proved that nickel and titanium ions are present in the solution, in addition, its bactericidal and bacteriostatic properties are reflected. Thus, the supernatant of nitinol can be used in biological environment and is safe for them.

Key words: nitinol, supernatant, chemical properties, bacteriostatic properties, bactericidal activity, ionic composition

ВВЕДЕНИЕ

Нитинол представляет собой сплав никеля и титана (55 % никеля, 45 % титана), обладающий уникальным свойством – памятью формы. Нитинол синтезирован в 1961 г. американскими учёными Уильямом Бюлером и Фредериком Вангом [10]. Сплав является достаточно лёгким, прочным, пластичным, коррозионноустойчивым и обладает способностью к восстановлению формы, что позволяет широко использовать его в медицине [1, 6, 14]. Несмотря на

пристальный интерес к нитинолу (Ni-Ti), сведения о его совместимости с клетками и тканями человека являются неполными и противоречивыми [10, 12, 13].

Организм человека достаточно хорошо переносит конструкции из титанового сплава, которые в свою очередь устойчивы к биологическим средам [3, 13, 15]. Доказано, что на поверхности титана в кислородосодержащих условиях образуется прочный окисный слой (преимущественно диоксид титана – TiO₂), за несколько минут достигающий толщины от 2 до

10 нм. Это обеспечивает его коррозионную стойкость, а также защищает организм от канцерогенного действия ионов Ni^{+} , присутствующих в сплаве [5, 7, 14].

Что же касается бактериологических свойств растворов на основе Ni-Ti, то, при наличии кислорода на поверхности микроорганизмов, диоксид титана подавляет активность ферментов и уничтожает генетические супрамолекулы, участвующие в их жизнедеятельности. Бактерицидное воздействие TiO_2 исследовано на многих бактериях и вирусах, известных в клинике, но вследствие недостаточной изученности материаловедческих аспектов повреждающего воздействия микроорганизмов в условиях жидкой среды с использованием Ni-Ti, данные растворы редко применяются в практике [2, 7, 11].

Современный этап изучения репаративных процессов связан с поисками новых стимулирующих факторов, ускоряющих заживление повреждений различных органов и тканей [4]. На первой стадии раневого процесса основными задачами терапии являются: подавление микробиоты, нормализация местного гомеостаза, удаление некротического субстрата, адсорбция токсического раневого отделяемого, купирование болевого синдрома [8, 13, 16]. В связи с этим, используемые в медицине препараты должны обладать гидрофильными свойствами, обеспечивать хорошее растекание по раневой поверхности, ее смачивание и проникновение в раневые полости [9].

Именно поэтому в качестве экспериментального материала был выбран самый распространенный сплав Ni-Ti. Оптимальная биомеханическая совместимость никелида титана с организмом способствует его активному применению в медицинской практике.

В настоящее время в литературе нет данных как по опыту применения, бактерицидным и бактериостатическим свойствам супернатанта никелида титана, так и сведений о наличии в составе готового раствора ионов Ni^{+} и Ti^{+} .

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Провести анализ химического состава, бактерицидных и бактериостатических свойств супернатанта никелида титана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химический анализ супернатанта никелида титана, содержания в его составе ионов Ni^{+} и Ti^{+} , проводился на базе лабораторий экологических исследований ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет» и в химико-аналитической лаборатории ООО «Тюменская центральная лаборатория». Тестирование раствора Ni-Ti к микроорганизмам, выделенным из клинического материала от пациентов (дикие штаммы бактерий), проводили на базе отделения клинической микробиологии ГБУЗ ТО «ОКБ № 1» методом «газона». Бактерицидные свойства в отношении тест-штаммов определялись на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» с использованием метода внесения культивированных штаммов в приготовленный раствор, а также диффузного метода.

В качестве исследуемого материала выступал стерильный супернатант никелида титана в объеме 100,0 мл, находящийся в стерильной таре. Раствор готовился из расчёта 10,0 г порошка сплава на 1 л стерильной воды. Дисперсная система была получена методом ультразвукового диспергирования с последующей выдержкой до стабилизации турбидности.

Химический анализ проводился качественным и количественным методами. Качественный анализ – атомно-эмиссионной спектрометрией индуктивно связанной плазмы на масс-спектрометрах Plasma Quad-3 фирмы Fisons Instruments Elemental Analysis (Великобритания), Trace ICA 61E фирмы Jerral Ash (Германия). Количественный критерий выявляли атомно-абсорбционной спектрометрией с пламенной атомизацией спектрометром с дейтериевым корректором фона AAS 3300 фирмы Perkin Elmer (Великобритания). Приборы эксплуатировались согласно их техническим требованиям.

За результат определения X (мг/дм³) принималось среднее арифметическое значение двух параллельных измерений анализируемого элемента, удовлетворяющих условию:

$$200 \times |X_1 - X_2| \leq r \times |X_1 + X_2| \quad (1),$$

где X_1, X_2 – результаты параллельных измерений определяемого элемента, мг/дм³, r – значение предела повторяемости для определяемого элемента (%): для никеля оно составляет 28 %, для титана – 27 %.

Кроме того, учитывая проведение анализа на базе двух независимых лабораторий, статистическая значимость результатов оценивалась, исходя из средних арифметических значений обеих лабораторий $X_{1\text{лаб}}$ и $X_{2\text{лаб}}$, и при выполнении условия (2) результаты считались статистически значимыми:

$$200 \times |X_{1\text{лаб}} - X_{2\text{лаб}}| \leq R \times |X_{1\text{лаб}} + X_{2\text{лаб}}| \quad (2).$$

Статистическая обработка результатов проводилась вариационно-статистическим методом с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., USA) и Microsoft Office Excel 2007. Для определения статистической значимости различий средних величин использовались параметрический (критерий Фишера – Снедекора) и непараметрические статистические критерии (Манна – Уитни, критерий Вилкоксона для парных сравнений) – независимо от формы распределения. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

При тестировании супернатанта Ni-Ti в среде диких штаммов в качестве источника материала культур микроорганизмов выступали раневое отделяемое, выделения после трахеостомии, кровь и моча. Выявлена следующая микробиота: *Staphylococcus spp.* коагулазонегативный, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* БЛРС«+», *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas mirabilis*, *Escherichia faecalis*, *Escherichia coli* БЛРС«+», *Escherichia coli* БЛРС«-». Методом «газона» на питательную среду Мюллера – Хинтона помещалось отделяемое из источников культур. В центр чашки Петри, при помощи бактериологической петли, вносился супернатант Ni-Ti с последующим термостатированием в течение суток при темпера-

туре 35 °С, после проводился анализ бактериостатического эффекта.

В качестве тест-штаммов в обоих случаях применялись тест-штаммы Международной коллекции *Esherichia coli* 35218ATCC, *Staphilococcus aureus* 25923 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853. При диско-диффузном методе культивировалась *Klebsiella pneumonia*.

При диско-диффузном методе применялись разные концентрации готового раствора с использованием в качестве раствора разведения дистиллированной воды:

А = 1 мл раствора «Ni-Ti» + 9,0 мл (H₂O);

Б = 1 мл раствора «Ni-Ti» + 3,0 мл (H₂O).

Насыщенные в каждом из разведений диски из фильтровальной бумаги накладывались на 1,5% мясо-пептонный агар с используемой культурой. При анализе учитывалась зона задержки роста 2 мм и более.

При анализе бактерицидных свойств тест-штаммы бактерий выращивались в течение 12 часов на среде Мюллера – Хинтона в термостате при температуре 37 °С; полученные культуры титровались до рабочей концентрации 1,5 тыс. КОЕ/мл, помещались в готовый раствор с выдержкой в течение 6 часов и после этого проводились повторные посевы. В качестве контроля использовались посевы рабочих концентраций микроорганизмов без выдержки в растворе. Опытные и контрольные штаммы культивировались в течение 24 часов. После окончания эксперимента проводился подсчёт выросших колоний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе выполнения измерений, проводимых на базе двух независимых лабораторий методом атомно-эмиссионной спектроскопии, представлены в таблице 1.

Таблица 1
Результаты определения ионов никеля и титана с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии индуктивно связанной плазмы

Table 1
The results of the determination of nickel and titanium ions using atomic-emission spectrometry of inductively coupled plasma

Показатель	НД на методику (метод) измерений	Результат КХА	Погрешность (при $p = 0,95$), Δ
Никель, мг/дм ³	ГОСТ 31870-2012	> 0,05 (0,123)	0,057
Титан, мг/дм ³		0,143	
Никель, мг/дм ³	ПНДФ 14.1:2:4.139-98 (2010)	0,019	±0,031
Титан, мг/дм ³		0,067	±0,017

Согласно проведённому анализу, в исследуемом супернатанте присутствуют как ионы никеля, так и ионы титана.

Ввиду негативного воздействия никеля на биологические среды, дополнительно было проведено определение его содержания методом атомно-абсорбционной спектроскопии. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2
Результаты определения ионов никеля с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии

Table 2
Results of the determination of nickel ions by atomic absorption spectrometry

Показатель	НД на методику (метод) измерений	Результат КХА	Погрешность (при $p = 0,95$), Δ
Никель, мг/дм ³	ПНДФ 14.1:2:4.135-98 (2008)	0,019	± 0,031

Полученные результаты определения содержания ионов никеля и титана удовлетворяют условию (2), следовательно, проведённые исследования можно считать статистически значимыми.

По результатам бактериостатического анализа супернатанта Ni-Ti не отмечено лизиса бактериальной культуры, сохраняется участок нанесения супернатанта, в зоне которого отсутствует рост: раствор не обладает провоцирующим (питательным) субстратом для каждой культуры в отдельности.

Результаты диско-диффузного метода отражены в таблице 3.

Таблица 3
Результаты диско-диффузного тестирования раствора супернатанта никелида титана

Table 3
Results of disco-diffuse testing of supernatant solution of titanium nickelde

Культура	Супернатант никелида титана, концентрация	
	А	Б
<i>Esherichia coli</i>	+	
	(0,5 см)	
<i>Staphilococcus aureus</i>		+
		(0,6 см)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		+
		(0,8 см)
<i>Klebsiella pneumonia</i>		+
		(0,5 см)

Примечание. А – 1 мл раствора «Ni-Ti» + 9,0 мл (H₂O); Б – 1 мл раствора «Ni-Ti» + 3,0 мл (H₂O).

Согласно полученным данным, вне зависимости от концентрации супернатанта, отмечена чувствительность бактерий в отношении анализируемого раствора, для получения результатов по *Staphilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* требуется большая концентрация никелида титана по сравнению с *Esherichia coli*.

Результаты анализа бактерицидных свойств представлены на рисунке 1.

В результате проведённого исследования отмечено, что супернатант никелида титана обладает бактерицидным действием в отношении всех исследуемых культур тест-штаммов. Наиболее выраженные бактерицидные свойства отмечены в отношении *Staphilococcus aureus* (грамположительная микробиота), число колоний в опытном образце снизилось в 9 раз, в то время как в отношении грамотрицательных штаммов флоры этот показатель снизился в 2,6 раза.

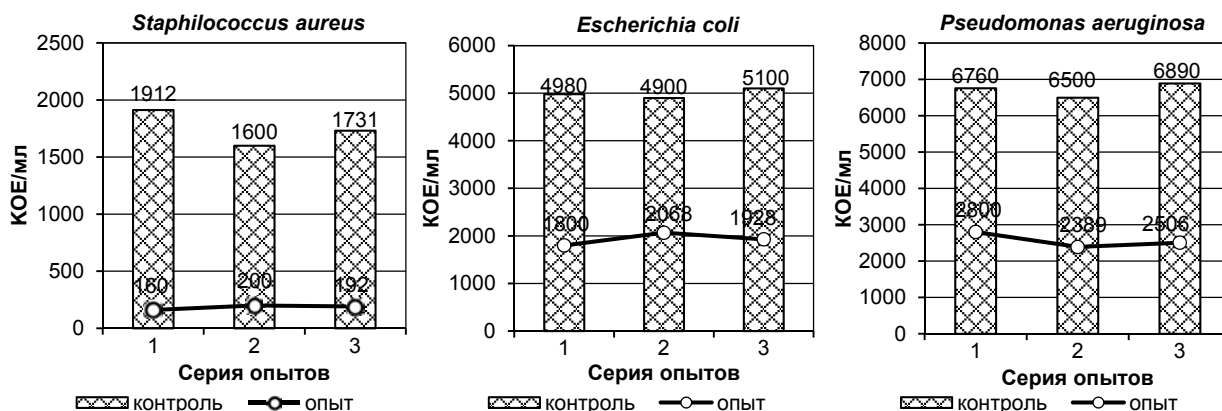


Рис. 1. Результаты бактериологического исследования супернатанта с тест-штаммами. Отличия от контроля статистически значимы ($p < 0,05$).

Fig. 1. Results of bacteriological study of supernatant with test strains. Differences from control are statistically significant ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в анализируемом растворе, приготовленном методом ультразвукового диспергирования с последующей выдержкой до стабилизации турбидности, статистически значимо присутствуют ионы никеля и титана.

Содержание ионов каждого металла соответствует требованиям ГОСТ для исследуемых растворов. Наличие ионов никеля статистически значимо ниже ионов титана. Супернатант Ni-Ti не обладает антибактериальными свойствами, однако при его применении отсутствует активный рост бактериальной культуры клинического значения, а в случае присутствия микроорганизмов обсеменённость статистически значимо ниже. Таким образом, данный раствор может применяться в клинической практике, но в качестве дополнительного компонента необходимо внесение антимикробного препарата или комбинации препаратов, исходя из чувствительности микроорганизмов в клинически допустимых дозировках. Экспериментально доказан бактериостатический эффект супернатанта в отношении диких культур бактерий.

Используя различные концентрации готового раствора для тест-штаммов, отмечено угнетение роста грамположительной флоры. Эффективность большей концентрации в отношении грамотрицательной микробиоты свидетельствует о её наибольшей вирулентности. При изменении условий эксперимента, т.е. при внесении тест-штаммов в супернатант, экспериментально доказаны бактерицидные свойства последнего.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Антонов А.Р., Суханова Н.В. Сверхэластичные металлы с памятью формы в медицине // Вестник новых медицинских технологий. – 2007. – Т. 14, № 2. – С. 107.
- Antonov AR, Sukhanova NV. (2007). Superelastic metals with shape memory in medicine. [Sverkhelasticheskiye metally s pamyat'yu formy v meditsine]. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 14 (2), 107.

2. Алексеев И.С., Миклис Н.И., Клименков С.С. Исследование бактерицидных свойств нанопокровов на основе диоксида титана // Вестник Витебского государственного технологического университета. – 2012. – № 2. – С. 91–94.

Alekseev IS, Miklis NI, Klimenkov SS. (2012). Research of bactericidal properties of nanocoatings based on titanium dioxide [Issledovanie bakteritsidnykh svoystv nanopokrytiy na osnove dioksida titana]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta*, (2), 91-94.

3. Богомолова Н.Н., Мальчихина А.И. Трибологические исследования многослойных биоактивных покрытий, предназначенных для биоинженерии костной ткани // Актуальные проблемы разработки и применения новых материалов и технологий: Сб. матер. Всерос. молодеж. науч. конф. – Саратов: ООО «Издательский Центр «Наука», 2013. – С. 485–492.

Bogomolova NN, Malchikhina AI. (2013). Tribological researches of the multilayered bioactive coverings intended for bioengineering of bone tissue [Tribologicheskiye issledovaniya mnogosloynnykh bioaktivnykh pokrytiy, prednaznachennykh dlya bioinzhenerii kostnoy tkani]. *Aktual'nye problemy razrabotki i primeneniya novykh materialov i tekhnologiy: Sbornik materialov Vserossiyskoy molodezhnoy nauchnoy konferencii*. Saratov, 485-492.

4. Довгилева О.М., Хомулло Г.В., Петрова М.Б. Основные особенности репаративной регенерации кожи в условиях применения хитозана // Верхневолжский медицинский журнал. – 2011. – Т. 9, Вып. 3, № 11. – С. 30–37.

Dovgileva OM, Khomullo G., Petrova MB. (2011). Main features of reparative regeneration of skin in the conditions of chitosan application [Osnovnye osobennosti reparativnoy regeneratsii kozhi v usloviyakh primeneniya khitozana]. *Verkhnevolzhskiy meditsinskiy zhurnal*. 9 (11), 30-37.

5. Коленько Ю.В., Торхов Д.С., Мескин П.Е., Кецко В.А., Бурухин А.А., Чурагулов Б.Р., Олейников Н.Н. Реакционная способность нанокристаллического TiO_2 (анатаза и рутила), синтезированного гидротермальным методом // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 394, № 6. – С. 775–777.

Kolenko YuV, Torkhov DS, Meskin PYe, Ketsko VA, Burukhin AA, Churagulov BR, Oleynikov NN. (2006). Reactionary ability of nanocrystal TiO_2 (anatase and rutile) hydrothermally synthesized [Reaktsionnaya sposobnost' nanokristallicheskogo TiO_2 (anataza i rutila), sintezirovannogo gidrotermal'nym metodom]. *Doklady Akademii nauk*, 394 (6), 775-777.

6. Лохов В.А., Няшин Ю.И., Кучумов А.Г. Сплавы с памятью формы: применение в медицине. Обзор моделей, описывающих их поведение // Российский журнал биомеханики. – 2007. – Т. 11, № 3. – С. 9–27.

Lokhov VA, Nyashin YuI, Kuchumov AG. (2007). Alloys with shape memory: application in medicine. The review of the models describing their behavior [Splyavy s pamyat'yu formy: primeneniye v meditsine. Obzor modeley, opisyyvayushchikh ikh povedeniye]. *Rossiyskiy zhurnal biomekhaniki*, 11 (3), 9-27.

7. Петухов Д.И., Колесник И.В., Елисеев А.А., Лукашин А.Б., Третьяков Ю.Д. Синтез и исследование свойств пленок пористого TiO_2 , полученных анодным окислением // Альтернативная энергетика и экология. – 2007. – № 1. – С. 65–69.

Petukhov DI, Kolesnik IV, Eliseev AA, Lukashin AB, Tretyakov YuD. (2007). Synthesis and research of properties of the films of porous TiO_2 received by anode oxidation [Sintez i issledovanie svoystv plenok poristogo TiO_2 , poluchennykh anodnym okisleniem]. *Al'ternativnaya energetika i ekologiya*, (1), 65-69.

8. Плетнёва И.В. Технология мази «Эльтон» на основе ПЭО и исследование её фармакологической активности // XIV Региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области: Тезисы докладов. – Волгоград: Изд-во ВолГМУ, 2011. – С. 29.

Pletnyova IV. (2011). Technology of Elton ointment on the basis of PEO and research of its pharmacological activity [Tekhnologiya mazi «El'ton» na osnove PEO i issledovanie ee farmakologicheskoy aktivnosti]. *XIV Regional'naya konferentsiya molodykh issledovateley Volgogradskoy oblasti: Tezisy dokladov*. Volgograd: Izd-vo VolGМУ, 2011. – С. 29.

gional'naya konferentsiya molodykh issledovateley Volgogradskoy oblasti: Tezisy dokladov. Volgograd, 29.

9. Худяков В.А., Проши А.П., Кислицына С.Н. Современные композиционные материалы. – М.: АСВ, 2006. – С. 60.

Khudyakov VA, Proshin AP, Kislitsyna SN. (2006). Modern composite materials [Sovremennye kompozitsionnye materialy]. Moskva, 60.

10. Энговатов В.А. Необычные свойства нитинола и его применение в медицине // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2015. – Т. 5, № 11. – С. 1323.

Engovatov VA. (2015). Unusual properties of nitinol and its application in medicine [Neobychnye svoystva nitinola i ego primeneniye v meditsine]. *Byulleten' meditsinskikh Internet-konferentsiy*, 5 (11), 1323.

11. Almeida S, Ryser S, Obarzanek-Fojt M, Hohl D, Huber M. (2011). The TRAF-interacting protein (TRIP) is a regulator of keratinocyte proliferation. *J Invest Dermatol*, 131 (2), 349.

12. Chapman TT. (2007). Burn scar and contracture management. *Trauma*, 62 (6), 8.

13. Kurabi A, Pak K, Dang X, Coimbra R, Eliceiri BP, Ryan AF, Baird A. (2013). Ecr4 attenuates the inflammatory proliferative response of mucosal epithelial cells to infection. *PLoS One*, 8 (4), 94.

14. Sun T, Wang LP, Wang M. (2011). (Ti, O)/Ti and (Ti, O, N)/Ti composite coatings fabricated via PIIID for the medical application of NiTi shape memory alloy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 96B (2), 249-260.

15. Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, van Horn JR. (1997). Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials*, 18, 1115-1120.

16. Zhou Z, Liu Y, Chen H, Liu F. (2015). Wound management with vacuum assisted closure in surgical site infection after ankle surgery. *Int J Surg*, 17, 15-18. doi: 10.1016/j.ijsu.2015.03.008.

Сведения об авторах Information about the authors

Урузбаев Ринат Маратович – аспирант кафедры патологической анатомии и судебной медицины, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России (625000, г. Тюмень, ул. Одесская 54; e-mail: uruzbaevrm@mail.ru)

Uruzbaev Rinat Maratovich – Postgraduate at the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University (625000, Tyumen, ul. Odesskaya, 54; e-mail: uruzbaevrm@mail.ru)