

УДК 9.61.615.9:616.099-082

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ТЕКСТИЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ОБРАБОТАННЫХ АНТИМИКРОБНЫМИ СРЕДСТВАМИ, НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

М.В. Бидевкина¹, О.В. Бакланова²,
О.А. Лопатина², Г.П. Панкратова¹,
М.В. Мезенцева², Т.Н. Потапова¹,
И.А. Суетина²

¹ФБУН НИИ Дезинфектологии
Роспотребнадзора, 117246, г. Москва,
Российская Федерация

²ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России Институт вирусологии
им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва,
Российская Федерация

Изучено цитотоксическое действие вытяжек из тканей, обработанных различными антимикробными средствами, на культуре подвижных клеток (на сперматозоидах быка) путем регистрации индекса токсичности на монослойных перевиваемых клетках: Vero – путем определения индекса пролиферации, жизнеспособности и показателя цитотоксического индекса клеток при их культивировании во флаконах и ФЭЧ - с помощью МТТ-теста. Установлена зависимость степени цитотоксичности от концентрации средства, используемого для обработки ткани.

Ключевые слова: цитотоксическое действие, культура клеток, дезинфицирующие средства.

Введение. Ткани, обладающие бактерицидными и фунгицидными свойствами, используются для создания многих видов изделий (постельное бельё, полотенца, спортивная и рабочая одежда, нижнее бельё, носки, рубашки и проч.). Для их обработки применяют дезинфицирующие средства, содержащие в своем составе соединения, различающиеся по токсичности и характеру биологического действия. Поскольку в большинстве случаев изделия из таких материалов имеют непосредственный контакт с кожей человека и используются различными слоями населения, включая пациентов медицинских учреждений, необходимо проведение оценки их безопасности.

В настоящее время утвержденные методы для оценки токсичности и опасности антимикробных тканей в РФ отсутствуют. В соответствии с СанПиН 2.4.7/1.1 12.86-03 «Гигиенические требования к одежде для детей, подростков и взрослых» оценка токсичности текстильных изделий

проводится путем определения индекса токсичности водных вытяжек из этих тканей на сперматозоидах быка. Однако среди антимикробных средств для обработки тканей встречаются соединения (например, пиритион цинка), обладающие избирательной активностью в отношении сперматозоидов, поэтому оценка токсичности антимикробных средств на этой модели не всегда объективна.

Целью исследований являлась разработка адекватного и информативного метода оценки токсичности и опасности тканей, обработанных антимикробными средствами.

Материалы и методы исследований. Изучена токсичность тканей, обработанных различными средствами с общим названием «Санитайзед» в различных концентрациях. Содержание действующих веществ в средствах и испытанные концентрации приведены в таблице 1.

Исследованы ткани различного состава

Бидевкина Марина Васильевна (Bidevkina Marina Vasil'evna), кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, BidevkinaMV@niid.ru

Бакланова Ольга Владимировна (Baklanova Olga Vladimirovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, ov_baklanova@mail.ru

Лопатина Ольга Алексеевна (Lopatina Olga Alekseevna), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, cells@rambler.ru

Панкратова Галина Павловна (Pankratova Galina Pavlovna), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, pankratovagr@niid.ru

Мезенцева Марина Владимировна (Mezentseva Marina Vladimirovna), доктор биологических наук, заведующая лабораторией культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, mamez@mail.ru

Потапова Татьяна Николаевна (Potapova Tat'yana Nikolaevna), старший научный сотрудник лаборатории токсикологии дезинфекционных средств ФБУН НИИ Дезинфектологии Роспотребнадзора, 117246, г. Москва, potarovatn@niid.ru

Суетина Ирина Александровна (Suetina Irina Aleksandrovna), кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории культур тканей ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского», 123098, г. Москва, cells@rambler.ru

и плотности: вискознополиэфирная, хлопкополиэфирная, трикотажная, вафельная, махровая и другие. Для проведения испытаний из тканей готовили вытяжки, используя дистиллированную воду или физиологический раствор. Время инкубации 24 часа при температуре 37,0°C. Токсичность водных вытяжек из тканей оценивали традиционным методом на культуре подвижных клеток (на сперматозоидах быка) путем регистрации индекса токсичности (ИТ), значение которого в норме находится в пределах от 70 до 120% [1]. Кроме того, исследования проведены на монослойных перевиваемых клетках (из коллекции ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» МЗ РФ): Vero (клетки почки зеленой марьши) и ФЭЧ (диплоидные клетки фибробластов эмбрионов человека) [3-5]. Клетки Vero использовали для определения цитотоксичности вытяжек в культуральных флаконах. Оценку результатов исследования проводили, микроскопируя выросший монослой клеток после внесения испытуемой вытяжки, учитывая степень и характер роста клеток с использованием 4-балльной системы (4 балла – сплошной монослой, клетки без изменений, 3 балла – $\frac{3}{4}$ площади флакона занято клетками, 2 балла – рост клеток на $\frac{1}{2}$ площади флакона, появление дегенеративных изменений в клетках, 1 балл – рост клеток на $\frac{1}{4}$ площади, выраженная дегенерация клеток, 0 баллов – отсутствие выросших клеток или наличие клеток с тотальной деструкцией), путем определения индекса пролиферации клеток (ИП) – отношения числа выросших клеток к числу посеянных, жизнеспособности клеток (ЖК) – количества живых (неизмененных) клеток на 100 просмотренных, выраженное

в процентах, и показателя цитотоксического индекса ($P_{цит}$) [6,7].

На клетках ФЭЧ определение цитотоксичности вытяжек из текстильных материалов проводили в 96-луночных панелях с использованием МТТ-теста. МТТ-тест основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых клеток восстанавливать реактив МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолия бромид) в формазан, который кристаллизуется внутри клеток. Активный метаболизм клеток свидетельствует об их жизнеспособности. Перевод формазана в раствор с помощью органических растворителей типа ДМСО (диметилсульфоксид) и последующая фотометрия позволяет сравнить эффект по коэффициенту пролиферации – соотношению оптической плотности (ОП) опытных растворов с ОП контрольных клеток. Регистрацию ОП проводили на спектрофотометре «ImmunoChem-2100 Microplate Reader» при длине волны 545 нм. В цитотоксических исследованиях метод позволяет оценить специфическую гибель клеток, индуцированную цитотоксическим агентом.

Результаты и обсуждение. На культуре подвижных клеток изучена токсичность вытяжек из тканей, обработанных средствами Санитайзед №1-3. Полученные данные приведены в таблице 2.

Как следует из представленных данных, вытяжка из тканей, обработанных средством Санитайзед №1 в концентрациях 0,03 и 0,05 г/л, не влияла на подвижность сперматозоидов (ИТ составил 81,7 % и 84,7%); концентрация средства 50 г/л обладала выраженным цитотоксическим эффектом – полностью отсутствовала подвижность сперматозоидов. У тканей, обработанных средством Санитайзед

Таблица 1

Состав и концентрация средства для обработки тканей

Название средства	Действующее вещество (№ CAS) - % содержание в средстве	Концентрация средства для обработки ткани, г/л
Санитайзед № 1	Дидецилдиметиламмоний хлорид (CAS: 7173-51-5) - 25	0,03, 0,05- норма расхода* 50,0
	о-фенил-фенол (CAS: 90-43-7) - 5	
Санитайзед № 2	Диметилтетрадецил [3(тримето-ксисил)пропил] аммоний хлорид (CAS: 41591-87-1) - 40	10, 60 – норма расхода*, 100
Санитайзед № 3	m-Феноксibenзил-3-(2,2-дихлор-винил)-диметилциклопропанкар-боксилат (CAS: 52645-53-1) - 45	20, 30 – норма расхода* 60, 300
Санитайзед № 4	2-пиридинтиол-1-оксид, цинка соль; пиритион цинка(CAS:13463-41-7) - 15	30, 40, 50- норма расхода* 170, 250

Примечание: *норма расхода - концентрация средства для обработки тканей, рекомендованных населению

Таблица 2

Цитотоксичность вытяжек из тканей, обработанных средствами Санитайзед №1-3 в различных концентрациях (г/л), изученных на сперматозоидах быка

Санитайзед №1			Санитайзед №2			Санитайзед №3		
г/л	ИТ, %		г/л	ИТ, %		г/л	ИТ, %	
	опыт	контроль		опыт	контроль		опыт	контроль
0,03	81,7	72,3	10,0	96,2	99,5	30,0	90,1	103,3
0,05	84,7	72,3	60,0	93,7	98,1	60,0	34,4	104,3
50,0	0,0	100,5	100	45,1	100,5	300	0,0	100,5

Таблица 3

Цитотоксическое действие вытяжек из тканей на клетки Vero

Средство для обработки ткани, концентрация	Разведения образцов	Рост клеток, баллы	ИП	ЖК, %	П _{цит}
Санитайзед № 1, 50 г/л	1/10-1/80	0	0	0	1,0
Санитайзед № 1, 0,05 г/л	1/20	2	1,0	88	0,06
	1/40	3	2,0	88	0,06
	1/80	4	2,9	94	0
Санитайзед №1, 0,03 г/л	1/20	3	4,0	92	0,02
	1/40-1/80	4	-	-	-
Необработанная ткань (контроль)	1/10	4	3,9	90	0,04
	1/20	4	3,9	83	0,11
	1/40	4	4,2	91	0,03
Санитайзед №4, 40 г/л	1/10-1/20	0	0	0	1,0
	1/40-1/160	1	0	0	1,0
Необработанная ткань (контроль)	1/10	4	4,3	92	0,02
	1/40	4	4,8	93	0,01
Физиологический раствор	1/10	4	4,8	94	0
Контроль клеток	-	4	4,9	94	0

№2 в концентрациях 10 и 60 г/л, цитотоксического действия не выявлено; при исследовании вытяжки из ткани, обработанной средством в концентрации 100 г/л ИТ составил 45,1%, что практически в два раза ниже нормы. Ткани, обработанные средством Санитайзед №3 в концентрации 30 г/л безопасны – ИТ составил 90,1%; концентрации средства 60 и 300 г/л токсичны – ИТ составил 34,4% и 0% соответственно. Таким образом, вытяжки из тканей, обработанных средствами в норме расхода, не вы-

зывают цитотоксического действия – ИТ во всех случаях находился в пределах нормы. Установлена зависимость эффекта от концентрации средства, которая наиболее четко прослеживалась при изучении вытяжек из тканей, обработанных средством Санитайзед №3.

Результаты изучения цитотоксического действия водных вытяжек текстильных материалов на клетки Vero в культуральных флаконах представлены в таблице 3.

Как следует из приведенных данных, Санитайзед №1 и №4 оказывали цитотоксическое действие на клетки Vero. При оценке роста клеток в баллах степень и характер морфологических изменений при воздействии Санитайзед №1 находились в прямой зависимости от используемой концентрации средства: при максимальной концентрации 50 г/л практически не было роста клеток – оценка 0-1 балл, при минимальной концентрации 0,03 г/л – рост клеток оценивался в 3-4 балла. Снижение концентрации вещества, связанное с разведением вытяжек от 1/10 до 1/80, закономерно снижало цитотоксическое действие изученных средств. При этом экстрагирующая жидкость физиологический раствор, а также контрольные образцы текстильной ткани без обработки практически не влияли на рост клеток. Несмотря на относительную визуальную субъективность данного метода, он позволяет дать предварительную оценку цитотоксического действия образцов по степени и характеру роста клеток и их морфологическому состоянию.

Более точная оценка цитотоксического действия образцов проводилась с помощью определения ИП клеток Vero, их жизнеспособности и $P_{цти}$. Эти характеристики клеток Vero, инкубированных с вытяжками текстильных материалов, обработанных средством Санитайзед №1, находились в зависимости доза-эффект. При максимальной концентрации 50 г/л во всех разведениях образцов наблюдалась гибель клеток, показатели ИП и ЖК равнялись 0. $P_{цти}$ соответственно равнялся 1, т.е. показывал максимальную токсичность вещества (превышение $P_{цти}$ пороговой величины 0,15 уже свидетельствует о токсичности испытуемого образца). Средство в концен-

трации 0,05 г/л проявляло меньшую токсичность, которая снижалась по мере разведения вытяжки (1/20-1/80). Результаты опытов с концентрацией средства 0,03 г/л были близки к результатам, полученным для контрольных клеток.

Совместное культивирование клеток Vero с вытяжками из материала, обработанного веществом Санитайзед №4 в концентрации 40 г/л, приводило к гибели клеток во всех разведениях от 1/10 до 1/160. Контрольные образцы ткани без обработки оказывали незначительное цитотоксическое действие, а под влиянием физиологического раствора состояние клеток соответствовало контролю.

Изучение цитотоксичности вытяжек из текстильных материалов с помощью МТТ-теста на клетках ФЭЧ показало аналогичные результаты, которые приведены в таблице 4.

Установлено, что коэффициенты пролиферации клеток ФЭЧ увеличивались по мере снижения концентрации средства Санитайзед №1, а также при разведении вытяжки в опытах с Санитайзед №1 и Санитайзед №4. Физиологический раствор и образцы контрольных текстильных тканей оказывали незначительное угнетающее действие на жизнеспособность клеток ФЭЧ.

Таким образом, проведенные исследования показали, что вытяжка из тканей, обработанных Санитайзед №1 в концентрации 0,03 г/л (минимальная норма расхода средства для придания ткани бактерицидных и фунгицидных свойств) не вызывала изменений всех показателей цитотоксического действия по сравнению с контролем. При использовании более высокой нормы расхода средства – 0,05 г/л основные показатели цитотоксичности,

Таблица 4

**Цитотоксическое действие вытяжек из текстильных материалов на клетки ФЭЧ
(оценка по коэффициенту пролиферации – ОПыт/ОП контроль)**

Средство для обработки ткани, концентрация	Разведения образцов			
	1/2	1/4	1/8	1/16
Санитайзед №1, 50 г/л – Уточнить дозу!	0	0	0	0
Санитайзед №1, 0,03 г/л	0,3	0,84	0,92	0,77
Необработанная ткань (контроль)	-	0,86	0,84	0,84
Санитайзед № 4, 40 г/л	0	0,21	0,4	-
Необработанная ткань (контроль)	-	0,79	0,81	-
Физиологический раствор	-	0,92	0,92	0,92
Контроль клеток	1,0			

такие как ЖК и П_{цит}, были также на уровне контроля.

Установлена высокая цитотоксичность вытяжек из тканей, обработанных средством Санитайзед №4, в состав которого входит пиритион цинка в количестве 3-5%.

Заключение. Выявлена возможность изучения токсичности тканей, обработанных антимикробными средствами, на культуре подвижных клеток (на сперматозоидах быка) путем регистрации ИТ. Проведенные эксперименты на двух линиях монослойных перевиваемых клеток (Vero и ФЭЧ) двумя методами (культивирование клеток во флаконах и МТТ-тест) показали чувствительность перевиваемых клеток к изученным антимикробным средствам. Во всех апробированных методах установлена зависимость концентрации средства, используемой для обработки ткани, и токсическим эффектом.

Вытяжки из тканей, обработанных средствами Санитайзед № 1-3 в норме расхода, не оказывали цитотоксического действия на клетки Vero и ФЭЧ. Проведенные ранее исследования *in vivo* показали, что эти вытяжки также не влияли на организм лабораторных животных при наружных аппликациях. Вытяжка из ткани, импрегнированной средством Санитайзед № 4 в норме расхода (содержит 3-5% пиритион цинка), вызывала раздражение слизистых оболочек глаз кролика. Указанные данные могут свидетельствовать о сопоставимости результатов, полученных в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Экспресс оценку токсичности ткани целесообразно проводить с использованием сперматозоидов быка или с помощью МТТ-теста. Для углубленного изучения цитотоксичности антимикробных тканей следует оценить их влияние на перевиваемые клетки, учитывая показатели пролиферации, жизнеспособности клеток и цитотоксического индекса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Экспресс-метод оценки общетоксического и кожно-раздражающего действия парфюмерно-косметической продукции *in vitro* (на культуре подвижных клеток). МР № 29 ФЦ/394. Госсанэпидслужба России.-2002 г.

2. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro* (medical devices. biological evaluation of medical devices.

part 5. tests for *in vitro* cytotoxicity) ГОСТРИСО 10993-5-2009.

3. Подчерняева Р. Я., Данлыбаева Г. А., Гринкевич О. М., Корнилаева Г. В. Методические рекомендации по работе с клеточными культурами. РАМН, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, М., 2008.

4. Животная клетка в культуре (методы

и применение в биотехнологии). Под ред. Л.П.Дьяконова. М., РАСХ, 2009, 652 с.

5. Харбиев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005, 832с.

6. Методические указания по использованию культуры диплоидных эмбри-

ональных клеток человека, рекомендуемых для токсиколого-гигиенических исследований. МУ №15-6/21. МЗ СССР. М., 1991.

7. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценке материалов, изделий и объектов окружающей среды. М., 1999, с. 79-89.

REFERENCES:

1. A rapid method for evaluation of General toxic and skin-irritating cosmetic products *in vitro* (in culture of motile cells). MR № 29 FTs/394. Gossanepidsluzhba Rossii.-2002(in Russian).

2. Studies on the *in vitro* cytotoxicity (medical devices. biological evaluation of medical devices. part

5. tests for *in vitro* cytotoxicity). State Standart ISO 10993-5-2009(in Russian).

3. Podchernyaeva R.Ya., Danlybaeva G.A., Grinkevich O.M., Kornilaeva G.V. Methodical recommendations for working with cell cultures. RAMN, NII virusologiiim. D.I.Ivanovskogo, M., 2008 (in Russian).

4. Animal cell culture (methods and application in biotechnology). L.P. D'yakonova ed. M., RASKh, 2009, 652(in Russian).

5. Kharbiev R.U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. M.: Meditsina, 2005, 832(in Russian).

6. Guidelines for the use of cultures

of diploid human stem cells that are recommended for Toxicological and epidemiological studies. MU № 15-6/21. MZ SSSR. M., 1991(in Russian).

7. Alternative research methods (rapid methods) for Toxicological and hygienic assessment of the materials, products and environment. M., 1999, s. 79-89(in Russian).

M.V. Bidevkina¹, O.V. Baklanova², O.A. Lopatina², G.P. Pankratova¹, M.V. Mezentseva², T.N Potapova¹, I.A. Suetina²

EVALUATION OF TOXICITY OF TEXTILE MATERIALS PROCESSED WITH ANTIMICROBIAL AGENTS USING HUMAN AND ANIMALS CELL CULTURES

¹ FBS «Scientific Research Disinfectology Institute», 117246, Moscow, Russian Federation

² N.F.Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, D.I.Ivanovsky Institute of Virology, 123098, Moscow, Russian Federation

Cytotoxic effect posed by draughts of fabrics processed with antimicrobial preparations was studied on a mobile cells culture (bull spermatozoids) by registering toxicity index on multilayer continuous cells: Vero cells-determination of proliferation index, viability and indicator of cells cytotoxic index at their cultivation in bottles and on human embryonic fibroblast diploid cells using MMT-test. A dependence of cytotoxicity on the concentration of preparations used to process fabrics was established.

Keywords: *cytotoxic effect, cells culture, disinfectant.*

Переработанный материал поступил в редакцию 10.02.2015 г.