

Ф. Ф. Кадыров, М. Ф. Шаехов, Э. Б. Гатина

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМОГО ПОКРЫТИЯ, НАНЕСЕННОГО НА ПОВЕРХНОСТЬ ЭНДОПРОТЕЗА ТАЗОБЕДРЕННОГО СУСТАВА, ОБЛАДАЮЩЕГО БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Ключевые слова: эндопротезы тазобедренного сустава, биосовместимое покрытие, микробная биопленка.

Получено биосовместимое, обладающее бактериостатическими свойствами покрытие на поверхности эндопротеза тазобедренного сустава методом конденсации из плазменной фазы и магнетронным распылением. Основу биосовместимого покрытия составляет смесь нитридов металлов IV группы. Проведены микробиологические исследования в результате которых установлено, что данное покрытие имеет долговременный бактериостатический эффект в отношении множества патогенных микроорганизмов.

Keywords: hip endoprosthesis, biocompatible coating, microbial biofilm.

Obtained biocompatible, bacteriostatic properties of the coating on the surface of the femoral endoprosthesis by condensation of the plasma phase and magnetron sputtering. Based on biocompatible coating is a mixture of metal nitrides of Group IV. Microbiological studies conducted by establishing that the coating has lasting bacteriostatic effect against a plurality of pathogenic microorganisms

Введение

Распространение в последнее время большого количества устойчивых микроорганизмов к различным группам антибактериальных препаратов носит эпидемиологическое, медицинское и социальное значение [1]. Несмотря на использование в последнее десятилетие новых инструментов, постоянное совершенствование техники оперативного вмешательства, применение современных антисептиков и дезинфектантов, сохраняется риск развития инфекционных осложнений при эндопротезировании тазобедренных (ТБС) и коленных суставов (КС). По данным зарубежных авторов, частота инфекции протезированного сустава (ИПС) составляет 0,7-2,5%, а некоторые отечественные исследователи считают, что величина этого показателя за последние годы возросла до 5-6% [2]. Появляются сообщения о выделении мультирезистентных [3] и панрезистентных штаммов бактерий в медицинских стационарах различного профиля во всем мире [4]. Особую значимость приобретают высоко-вирулентные и оппортунистические госпитальные штаммы микроорганизмов с множественной устойчивостью к антибиотикам [5]. Инфекционные осложнения при эндопротезировании могут приводить к развитию хронического остеомиелита и, как следствие, к инвалидизации больного, а в случае генерализации инфекции и развитию синдрома системной воспалительной реакции или сепсиса - к летальному исходу.

Совершенствование медицинских технологий, в частности широкое использование искусственных имплантируемых и внутрисосудистых устройств, создало новую экологическую нишу для микроорганизмов. Ни один из используемых для создания имплантатов материалов не является биологически инертным. Микроорганизмы оказываются способными связываться с их поверхностями в результате неспецифической адгезии. Кроме того, на этих поверхностях с разной скоростью происходят отложение белков макроорганизма, чаще всего

фибрина, и формирование пленки, в составе которой присутствуют молекулы, являющиеся рецепторами для адгезинов микроорганизмов [6]. Особенность имплантируемых устройств как субстратов для адгезии микроорганизмов состоит в том, что у них полностью отсутствуют факторы, противодействующие этому процессу. Таким образом, при контакте микроорганизма с поверхностью искусственных устройств адгезия практически неизбежна.

В дальнейшем события разворачиваются не по тем схемам, которые описаны для адгезии микроорганизмов к живым объектам, обладающим факторами резистентности. Вначале на поверхностях, вероятно, формируются отдельные микроколонии микроорганизмов, которые затем быстро объединяются в сплошную биопленку - микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов [7]. Для большинства бактерий состояние биопленки (биофильма) является базовым, выработанным в течение миллионов лет под влиянием естественного отбора в меняющихся экологических условиях. Биология микроорганизмов в составе биопленки отличается некоторыми особенностями [8]. Подавляющее большинство индивидуальных клеток находится в состоянии покоя и, что важно для практики, характеризуется крайне низкой чувствительностью к воздействию антибактериальных агентов [9]. По не совсем понятным причинам в отдельных участках биопленки периодически возникают очаги размножения, в результате чего в окружающую среду выделяются свободные (планктонные) клетки микроорганизмов.

Актуальность проблемы протезного инфекционного эндокардита либо участие биопленок в развитии инфекций растет пропорционально потребности в различных синтетических материалах, клапанах, биопротезах [10]. Теоретически очевидно,

что для микроорганизмов экологически выгодно прикрепление к материалу протезного клапана и использование прилегающей к нему ткани в качестве источника питания. В то же время у большинства пациентов случайно прикрепившиеся бактерии «ведут себя» достаточно пассивно. По-видимому, складываются какие-то симбиотические отношения, которые не приводят к активному размножению бактерий и, соответственно, препятствуют развитию воспалительной реакции [11, 12]. Необходимость изучения экологических оптимумов возникновения и существования микробных биопленок на фазовой границе между абиогенной поверхностью механических протезных клапанов и тканями сердца несомненна. После создания адекватной модели *in vitro* будет возможен экспериментальный поиск новых методов профилактики и лечения.

Разработано биосовместимое, обладающее бактериостатическим эффектом покрытие на основе нитридов элементов IV группы. Данное покрытие выполняет защитную функцию для металлических конструктивных элементов эндопротезов и является барьером для проникновения к металлу активных реагентов, вызывающих коррозию (кислород, хлор, биоактивные белки), с одной стороны, и выходу продуктов коррозии в полости тканей живого организма, с другой [13,14].

Экспериментальная часть

Среди множества физических методов нанесения тонкопленочных покрытий, включающих термовакuumное напыление, магнетронное распыление, конденсацию из плазменной фазы с ионной бомбардировкой (КИБ), для нанесения покрытия на ножку эндопротеза был выбран метод КИБ, т.к. наличие капельной фазы придает напыленному покрытию большую шероховатость поверхности, что необходимо наилучшего сращения ножки эндопротеза с костной тканью.

Конденсация нитридов металлов IV группы из плазменной фазы проводилась в следующем режиме:

1) Ионная очистка:		
Энергия ионов металла, кэВ		0,8-1
Температура подложки, °С		600
Время очистки, мин		10
2) Нанесение покрытия:		
Потенциал смещения, В		200
Температура подложки, °С		400
Время нанесения, мин		40-50

Для нанесения покрытия на головку эндопротеза был выбран метод магнетронного распыления, т.к. в отличие от покрытия, нанесенного на ножку эндопротеза, здесь необходимо реализовать противоположный эффект, а именно: добиться минимального изменения шероховатости исходной поверхности, т.к. головка эндопротеза и полиэтиленовый вкладыш образуют пару трения в узле эндопротеза, а высокая шероховатость поверхности увеличит коэффициент трения, что в свою очередь приведет к активному износу полиэтиленового вкладыша. В последствии у пациента может развиваться тя-

желый металлоз или остеолит, что ставит под угрозу здоровье и жизнь пациента.

Конденсация нитридов металлов IV группы магнетронным распылением проводилась в следующем режиме:

Ток анода, А	8
Напряжение на аноде, В	530
Давление в камере, Па	$3 \cdot 10^{-2}$
Время нанесения, мин	30
Толщина покрытия, нм	100

Результаты и их обсуждение

По данным микробиологических исследований получены результаты бактериостатического действия разработанного покрытия на такие микроорганизмы как: *Streptococcus viridans*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Ниже приведены диаграммы жизнеспособных клеток микроорганизмов после воздействия образцов через 12 часов культивирования.

На рис.1 представлена диаграмма для *Streptococcus viridans*. Из нее видно, что при использовании имплантата без покрытия число микроорганизмов снизилось до 91% от первоначального уровня, а при использовании имплантата с биосовместимым покрытием - до 62%.

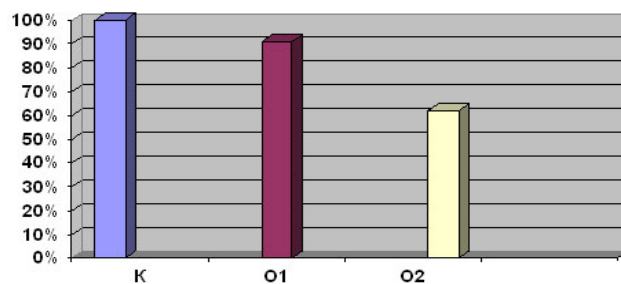


Рис. 1 - Количество жизнеспособных клеток *Streptococcus viridans* после воздействия образцов через 12 часов культивирования (за 100% принят К — физиологический раствор + культуральная взвесь, O1 — физиологический раствор + имплантат + культуральная взвесь, O2 — физиологический раствор + имплантат с покрытием + культуральная взвесь)

На рис.2 представлена диаграмма для *Candida tropicalis*. Из нее видно, что при использовании имплантата без покрытия число микроорганизмов снизилось до 83% от первоначального уровня, а при использовании имплантата с биосовместимым покрытием - до 50%.

На рис.3 представлена диаграмма для *Staphylococcus aureus*. Из нее видно, что при использовании имплантата без покрытия число микроорганизмов снизилось до 65% от первоначального уровня, а при использовании имплантата с биосовместимым покрытием - до 25%.

На рис.4 представлена диаграмма для *Escherichia coli*. Из нее видно, что при использовании имплантата без покрытия число микроорганизмов снизилось до 84% от первоначального уровня, а

при использовании имплантата с биосовместимым покрытием- до 15%.

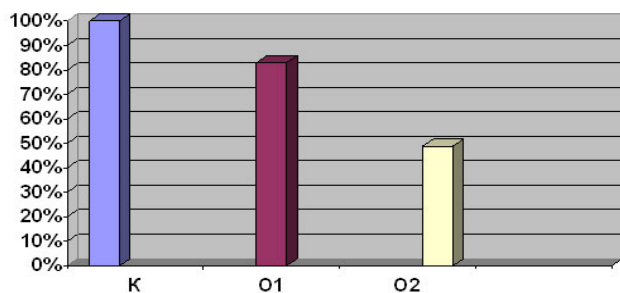


Рис. 2 - Количество жизнеспособных клеток *Candida tropicalis* после воздействия образцов через 12 часов культивирования (за 100% принят К — физиологический раствор + культуральная взвесь, O1 — физиологический раствор + имплантат + культуральная взвесь, O2 — физиологический раствор + имплантат с покрытием + культуральная взвесь)

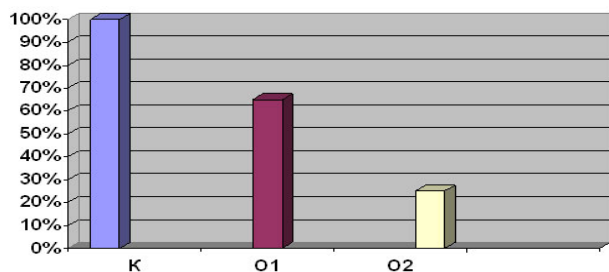


Рис. 3 - Количество жизнеспособных клеток *Staphylococcus aureus* после воздействия образцов через 12 часов культивирования (за 100% принят К — физиологический раствор + культуральная взвесь, O1 — физиологический раствор + имплантат + культуральная взвесь, O2 — физиологический раствор + имплантат с покрытием + культуральная взвесь)

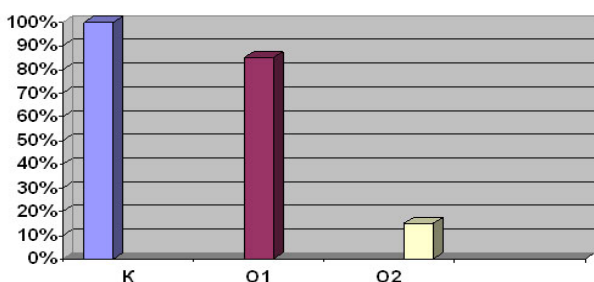


Рис. 4 - Количество жизнеспособных клеток *Escherichia coli* после воздействия образцов через 12 часов культивирования (за 100% принят К — физиологический раствор + культуральная взвесь, O1 — физиологический раствор + имплантат + культуральная взвесь, O2 — физиологический раствор + имплантат с покрытием + культуральная взвесь)

Заключение

1) Для нанесения покрытия на ножку эндопротеза тазобедренного сустава, обладающего бак-

терицидным действием, выбран метод конденсации из плазменной фазы с ионной бомбардировкой (КИБ), как самый оптимальный при создании покрытий на поверхности медицинских изделий.

2) Для нанесения покрытия на головку эндопротеза тазобедренного сустава, обладающего бактерицидным действием, выбран метод магнетронного распыления как самый оптимальный при создании покрытий, не изменяющих исходную шероховатость, а также обладающего хорошей адгезией с поверхностью основы.

3) Получено покрытие, основу которого составляют металлы IV группы, обладающее долговременным бактериостатическим эффектом в отношении многих патогенных микроорганизмов.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ, проект № 2196 базовой части государственного задания.

Литература

1. Решедько, Г.К. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационарах России / Г.К. Решедько [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2008. - Т. 10, №2. - С. 163-179.
2. Пичхадзе, И.М. Лечение больных с гнойно-воспалительными осложнениями после эндопротезирования тазобедренного сустава / И.М. Пичхадзе [и др.] // Вестн. травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2009. - № 3. - С.45-50.
3. Страчунский, Ю.А. Внебольничные MRSA — новая проблема антибиотикорезистентности / Ю.А. Страчунский, Л.С. Белькова, А.В. Дехнич // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. - Т.7, №1 - С. 32-46.
4. Шагинян, И.А. Молекулярная эпидемиология инфекций, вызываемых метициллинустойчивыми стафилококками / И.А. Шагинян, О.А. Дмитриенко // Журн. микробиологии. - 2003. - № 3. - С. 99-109.
5. Решедько, Г.К. Механизмы резистентности к аминогликозидам у нозокомиальных грамотрицательных бактерий в России: результаты многоцентрового исследования / Г.К. Решедько // Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2001. - № 3. - С. 111-125.
6. Кузнецов, О. Ю. Бактериальная колония как сложное организованное сообщество клеток / О. Ю. Кузнецов // Журн. микробиологии. - 2005. - № 2. - С. 3-7.
7. Parkins, M. D. *Pseudomonas aeruginosa* Gac A, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation / M. D. Parkins, H. Ceri, D. G Storey // Mol. Microbiol. - 2001. - Vol. 40. - P. 1215-1226.
8. Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / C. T. Huang // Colloids Surfaces B Biointerfaces. - 1996. - Vol. 6. - P. 235-242.
9. Сидоренко, С. В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С. В. Сидоренков // Клин. микробиология и антимикроб. химия. - 2001. - № 4. - С. 301-315.
10. Прозоров, А. А. Феромоны компетентности у бактерий / А. А. Прозоров // Микробиология. - 2001. - Т. 70, № 1. - С. 5-14.
11. Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces / R. M. Donlan // Emerg. Infect. Diseases. - 2002. - Vol. 8. - P. 381-390.
12. Toole, G. A. To build a biofilm / G. A. O Toole // J. Bacteriol. 2003. - Vol. 185. - P. 2687-2689.

13. Абдуллин И.Ш. Цитотоксические свойства плазменных конденсатов / И.Ш. Абдуллин, М.М. Гребенщикова // Вестник казанского технологического университета.- 2010.- №10- С.388-391

14. Абдуллин И.Ш. Исследование общей токсичности плазменных конденсатов металлов и нитридов / И.Ш. Абдуллин, М.М. Гребенщикова // Вестник казанского технологического университета.- 2010.- №11- С.546-547.

© **Ф. Ф. Кадыров** – асп. каф. плазмохимических и нанотехнологий высокомолекулярных материалов КНИТУ, shaechov@kstu.ru; **М. Ф. Шаехов** - д.т.н., проф. той же кафедры; **Э. Б. Гатина** - канд. мед. наук, ст. науч. сотр. той же кафедры, mukalia@mail.ru.

© **F. F. Kadyrov** - graduate student of department "plasma-chemical and macromolecular nanotechnology materials" KNRTU, kadyrovff@yandex.ru; **M. F. Shaehov** - Ph.D., professor of department "plasma-chemical and macromolecular nanotechnology materials" KNRTU, shaechov@kstu.ru; **E. B. Gatina** – Ph.D. scientific. et al. the department " plasma-chemical and macromolecular nanotechnology materials" KNRTU, mukalia@mail.ru.