

Покрyтия на основе двумерно упорядоченного линейно-цепочечного углерода для защиты титановых имплантатов от микробной колонизации

Д.В. Тапальский¹, Н.С. Николаев², А.В. Овсянкин³, В.Д. Кочаков⁴, Е.А. Головина⁵, М.В. Матвеенков⁵, М.В. Сухорукова⁶, Р.С. Козлов⁶

¹ УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

² ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России, г. Чебоксары, Россия

³ ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России, г. Смоленск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

⁵ ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь

⁶ ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, НИИ антимикробной химиотерапии, г. Смоленск, Россия

Реферат

Цель исследования — оценить антибактериальную активность и биологическую совместимость легируемых покрытий металлоконструкций для остеосинтеза на основе двумерно упорядоченного линейно-цепочечного углерода (ДУ ЛЦУ). **Материал и методы.** Методом ионно-стимулированной конденсации углерода в вакууме на поверхностях титановых пластин и полистироловых планшетов синтезированы покрытия на основе ДУ ЛЦУ с легирующими добавками: азотом (ДУ ЛЦУ+N) и серебром (ДУ ЛЦУ+Ag). Изучена поверхностная бактерицидная активность покрытий и ее устойчивость к механическим воздействиям. На пластинах с покрытиями оценена интенсивность формирования микробных биопленок клиническими изолятами микроорганизмов со множественной и экстремальной антибиотикорезистентностью, для визуализации сформированных биопленок выполнено окрашивание образцов раствором кристаллического фиолетового. Оценка цитотоксичности покрытий выполнена в отношении первичной культуры фибробластов и клеточной линии кератиноцитов HaCaT. **Результаты.** Выявлен выраженный поверхностный бактерицидный эффект покрытий ДУ ЛЦУ+Ag в отношении микроорганизмов нескольких таксономических групп, не зависящий от их устойчивости к антибактериальным препаратам. Для покрытия ДУ ЛЦУ+Ag установлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок антибиотикорезистентными клиническими изолятами *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Показана механическая устойчивость серебросодержащего покрытия с сохранением уровня поверхностной бактерицидной активности, близкого к исходному, даже после продолжительной абразивной обработки. Покрытия на основе ДУ ЛЦУ не вызывали цитотоксических эффектов. Структура монослоя, сформированного в лунках с покрытиями ДУ ЛЦУ+N и ДУ ЛЦУ+Ag, была неотличима от лунок контрольных планшетов.

Ключевые слова: титановые имплантаты, микробные биопленки, антибиотикорезистентность, антибактериальные покрытия.

Табальский Д.В., Николаев Н.С., Овсянкин А.В., Кочаков В.Д., Головина Е.А., Матвеенков М.В., Сухорукова М.В., Козлов Р.С. Покрyтия на основе двумерно упорядоченного линейно-цепочечного углерода для защиты титановых имплантатов от микробной колонизации. *Травматология и ортопедия России*. 2019;25(2):111-120. DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-2-111-120.

Cite as: Tapalski D.V., Nikolaev N.S., Ovsyankin A.V., Kochakov V.D., Golovina E.A., Matveenkov M.V., Sukhorukova M.V., Kozlov R.S. [Coatings Based on Two-Dimensionally Ordered Linear Carbon for Protection of Titanium Implants from Microbial Colonization]. *Traumatology and Orthopedics of Russia*. 2019;25(2):111-120. (In Russian). DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-2-111-120.

✉ Тапальский Дмитрий Викторович / Dmitry V. Tapalski; e-mail: tapalskiy@gsmu.by

Рукопись поступила/Received: 30.09.2018. Принята в печать/Accepted for publication: 09.01.2019.

Coatings Based on Two-Dimensionally Ordered Linear Chain Carbon for Protection of Titanium Implants from Microbial Colonization

D.V. Tapalski¹, N.S. Nikolaev², A.V. Ovsyankin³, V.D. Kochakov⁴, E.A. Golovina³, M.V. Matveenkov⁵, M.V. Sukhorukova⁶, R.S. Kozlov⁶

¹ Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

² Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthetics, Cheboksary, Russian Federation

³ Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthetics, Smolensk, Russian Federation

⁴ Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

⁵ Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

⁶ Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy of Smolensk State Medical University, Smolensk, Russian Federation

Abstract

Purpose of the study – to evaluate the antibacterial activity and biological compatibility of alloy coatings based on two-dimensionally ordered linear chain carbon (TDOLCC). **Materials and Methods.** Coatings based on TDOLCC were synthesized using alloying additions like nitrogen (TDOLCC+N) and silver (TDOLCC+Ag) on the surfaces of titanium plates and polystyrene plates by the ion-stimulated carbon condensation in a vacuum. The authors examined the superficial bactericidal activity of the coatings and its resistance to mechanical effects. Coated plates were evaluated in respect of rate of microbial biofilms formation by clinical isolates with multiple and extreme antibiotic resistance. Specimens were colored with crystal violet solution to visualize the biofilms. Cytotoxic effect of coatings was evaluated in respect of primary culture of fibroblasts and keratinocyte cell line HaCaT. **Results.** The authors observed pronounced superficial bactericidal effect of TDOLCC+Ag coating in respect of microorganisms of several taxonomic groups independently of their resistance to antibacterial drugs. TDOLCC+Ag coating proved capable to completely prevent microbial biofilm formation by antibiotic resistant clinical isolates of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Silver-containing coating demonstrated mechanical resistance and preservation of close to baseline level of superficial bactericidal activity even after lengthy abrasion treatment. TDOLCC based coatings did not cause any cytotoxic effects. Structure of monolayers formed in cavities coated by TDOLCC+N and TDOLCC+Ag was indistinguishable from the monolayers in cavities of control plates.

Keywords: titanium implants, microbial biofilms, antibiotic resistance, antibacterial coating.

Введение

Бактериальные инфекции области хирургического вмешательства являются серьезным осложнением остеосинтеза, их лечение в значительной мере затруднено наличием в очаге воспаления фиксирующей металлоконструкции, колонизированной микробными биопленками. Показано, что формирование биопленок на поверхностях различных материалов для остеосинтеза (чистый титан, титановые сплавы, нержавеющая сталь, кобальт-хром-молибденовые сплавы) происходит достаточно быстро и занимает от 2 до 4 ч [1]. Предотвращение образования биопленок является основной задачей в профилактике имплантат-ассоциированных инфекций [2].

У пациентов с высоким риском глубоких инфекций области хирургического вмешательства одним из перспективных направлений является применение металлоконструкций с модифицированными активными микробицидными поверхностями. Известны различные способы физико-

химического модифицирования поверхностей с целью придания им антибактериальных свойств. «Идеальное» антибактериальное покрытие, наносимое на поверхность имплантатов, применяемых в травматологии и ортопедии, должно быть биологически совместимым и не оказывать местного раздражающего действия, проявлять выраженные бактерицидные свойства в раннем послеоперационном периоде и сохранять поверхностную бактерицидную активность в отношении широкого круга микроорганизмов — возбудителей раневых инфекций в течение всего срока имплантации, а также препятствовать адгезии бактерий к поверхности имплантата и подавлять образование микробных биопленок [3].

Использование углеродных алмазоподобных покрытий для защиты имплантатов было предложено в начале 1990-х гг. Алмазоподобный углерод характеризуется химической инертностью, коррозионной устойчивостью и механической износостойкостью. Алмазоподобные покрытия содержат

сочетание sp²- и sp³-углеродных связей высокой энергии [4, 5]. Серьезным ограничением использования алмазоподобных покрытий в травматологии и ортопедии является их нестабильность в условиях биологических жидкостей организма, которая проявляется отслоением или расщеплением покрытия. В современных условиях область использования алмазоподобных покрытий ограничена из-за наличия в их слое значительных внутренних механических напряжений и достаточно слабой адгезии к металлическим поверхностям [4]. Указанные недостатки отсутствуют у покрытий на основе двумерно упорядоченного линейно-цепочечного углерода (ДУ ЛЦУ). Пленки ДУ ЛЦУ, синтезированные на различных подложках, представляют собой упорядоченные ансамбли квантовых нитей, располагающихся на расстоянии 0,4–0,5 нм и потому очень слабо взаимодействующих друг с другом [6]. Покрытия на основе ДУ ЛЦУ обладают высокой адгезией к подложке, прочностью и упругостью, а также хорошей биологической совместимостью [7–9]. В процессе синтеза пленки ДУ ЛЦУ легко подвергается легированию различными химическими элементами, что позволяет придавать поверхностям дополнительные физико-химические свойства [10, 11].

Цель исследования — оценить антибактериальную активность и биологическую совместимость легированных покрытий металлоконструкций для остеосинтеза на основе двумерно упорядоченного линейно-цепочечного углерода.

Материал и методы

Технология формирования углеродных покрытий

В качестве материала подложек для нанесения покрытий ДУ ЛЦУ использовали титановые пластины размером 50×50×0,5 мм (для определения поверхностной бактерицидной активности) и размером 12,5×50×0,5 мм (для изучения формирования микробных биопленок). Покрытия были синтезированы в вакуумной установке «УРМ.3.279.070 Алмаз» методом ионно-стимулированной конденсации углерода. На подложку одновременно поступали поток углерода, полученный термическим испарением или ионным распылением, и поток ионов аргона, в результате конденсации потока углерода формировались пленки ДУ ЛЦУ.

Для получения пленок ДУ ЛЦУ, легированных серебром (ДУ ЛЦУ+Ag), в графитовом катоде высверливались отверстия, в которые вставлялись штифты из серебра. Синтез пленки производился с одновременным ионно-плазменным испарением серебра в том же импульсном катодном разряде. Легирование пленок ДУ ЛЦУ азотом (ДУ ЛЦУ+N) осуществлялось подачей азота в вакуумную камеру совместно с аргоном.

Оценка антибактериальной активности покрытий

Для выявления антибактериальной активности и изучения интенсивности высвобождения антибактериальных факторов из покрытий использовали двухслойный агаровый метод [12]. Контрольные и опытные образцы (титановые пластины 50×50×0,5 мм без покрытий и с покрытиями ДУ ЛЦУ, ДУ ЛЦУ+N, ДУ ЛЦУ+Ag) выдерживали в дистиллированной воде 15 мин при комнатной температуре для удаления быстро растворимых компонентов и стерилизовали воздушным методом при 160°C в течение 60 мин. После остывания до комнатной температуры образцы стерильным пинцетом перемещали на поверхность агара Мюллера–Хинтона (Mueller Hinton II Agar, BD BBL, США) в 90-мм полистироловых чашках Петри. Расплавленный и остуженный до 45°C агар Мюллера–Хинтона в объеме 8,3 мл; 14,6 мл и 27,6 мл заливали вторым слоем на поверхность пластины. Расчетная высота слоя агара над поверхностью пластины составила 1, 2 и 4 мм соответственно. Чашки выдерживали на выставленной по уровню горизонтальной поверхности до полного застывания среды, затем в течение 15 мин подсушивали в термостате.

В качестве тест-культуры использовали контрольный штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 из Американской коллекции типовых культур. Из суточной культуры, выращенной на питательном агаре (Nutrient Agar, M001, HiMedia, Индия), готовили суспензию в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия с оптической плотностью 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Чашки инокулировали бактериальной суспензией и инкубировали 18 ч при 35°C. Оценивали наличие и характер роста микроорганизмов на поверхности агара Мюллера–Хинтона в области проекции контрольных титановых пластин и титановых пластин с углеродными покрытиями различного состава.

Оценка поверхностной бактерицидной активности покрытий

Готовили серии опытных образцов, каждая из которых включала по 3 образца (титановые пластины 50×50×0,5 мм) с однотипным покрытием, а также серию контрольных образцов без покрытий. Контрольные и опытные образцы выдерживали в дистиллированной воде 15 мин при комнатной температуре для удаления быстро растворимых веществ, затем высушивали, помещали в стеклянные чашки Петри и стерилизовали в воздушном стерилизаторе при 160°C в течение 60 мин. В качестве тест-культур использовались *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Дополнительно в исследование

включен экстремально антибиотикорезистентный изолят *Pseudomonas aeruginosa* P-142, выделенный от пациента с посттравматическим остеомиелитом. Определение поверхностной бактерицидной активности образцов выполняли в соответствии с Японским промышленным стандартом JIS Z 2801: 2010*. Рассчитывали количество жизнеспособных бактериальных клеток для серии образцов по формуле:

$$N = \frac{(C_1 + C_2 + C_3) D}{3},$$

где N — среднее количество микробных клеток для серии образца, C_1, C_2, C_3 — количество колоний на чашке для каждого из образцов в серии, D — фактор разведения.

Рассчитывали уровень антимикробной активности для серии опытных образцов по формуле:

$$R = \log(N_k/N_T),$$

где R — уровень антимикробной активности, N_k — среднее количество микробных клеток для серии контрольных образцов, N_T — среднее количество микробных клеток для серии опытных образцов.

Рассчитывали индекс бактерицидности по формуле:

$$I = \frac{N_k - N_T}{N_k} \times 100\%,$$

где I — индекс бактерицидности, N_k — среднее количество микробных клеток для серии контрольных образцов, N_T — среднее количество микробных клеток для серии опытных образцов.

Определение устойчивости антибактериальных покрытий к механическим воздействиям

Выполняли отмывку пластин с покрытиями различных типов в дистиллированной воде в присутствии абразива. В качестве абразива использовали наполнитель для галтовки OTEC H0/050 (OTEC, Германия). В флаконах размещали образцы с покрытиями, добавляли по 15–20 г абразива и 100 мл дистиллированной воды. Инкубацию проводили в течение 96 ч при температуре 35°C с непрерывным орбитальным встряхиванием 150 об./мин на шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSap, Латвия). После проведения абразивной обработки образцы дважды промывали дистиллированной водой, стерилизовали воздушным методом при 160°C в течение 60 мин и определяли бактерицидную активность поверхности в соответствии с JIS Z 2801: 2010.

Изучение формирования микробных биопленок на поверхности антибактериальных покрытий

Для оценки защитного эффекта углеродсодержащих покрытий различного состава в от-

ношении микробных биопленок использовали клинические изоляты со множественной антибиотикорезистентностью *S. aureus* и *P. aeruginosa* с высокой способностью к биопленкообразованию, выделенные от пациентов с инфекциями костной ткани. Опытные образцы с покрытиями разных типов и контрольные образцы без покрытий помещали в стеклянные центрифужные пробирки и выполняли воздушную стерилизацию при 160° в течение 60 мин. Готовили суспензии тест-культур в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия (оптическая плотность 0,5 по стандарту мутности МакФарланда). В пробирки с образцами вносили по 10 мл триптон-соевого бульона (Tryptic Soy Broth, BD BBL, США) и добавляли 50 мкл суспензии тест-культуры (расчетная стартовая концентрация микробных клеток в среде 5×10^5 мл⁻¹). Исследование выполняли в трех повторях. Пробирки с образцами инкубировались на шейкере-инкубаторе 24 ч при 35°C с интенсивностью встряхивания 100 об./мин. Для визуализации биопленок после инкубации проводили окрашивание образцов водным раствором кристаллического фиолетового (0,1%). Для количественной оценки интенсивности биопленкообразования окрашенные образцы помещали в пробирки с 10 мл 96% этанола и выполняли спиртовую экстракцию кристаллического фиолетового, сорбированного биопленкой в течение 24 ч при 44°C. Концентрацию кристаллического фиолетового в полученных экстрактах определяли на микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN, Швейцария), длина волны 540 нм. Массу биопленки представляли как массу красителя, поглощенного биопленкой при окрашивании, и рассчитывали по формуле:

$$m = \frac{V(C_1 + C_2 + C_3 - F_1 - F_2 - F_3)}{3},$$

где m — масса кристаллического фиолетового, поглощенного биопленкой, мкг; V — объем отмывочного раствора, мл; C_1, C_2 и C_3 — концентрации красителя в отмывочных растворах серии опытных образцов, мкг/мл; F_1, F_2 и F_3 — концентрации красителя в отмывочных растворах серии контрольных образцов, мкг/мл.

Изучение биологической совместимости покрытий в отношении культур клеток

Использовали эпителиальные клетки человека линии HaCAT (кератиноциты). Замороженные при 80°C образцы клеток переносили в стакан с водой, температура которой составляла 37°C. После оттаивания пробирку обрабатывали спиртом, содержимое ресуспендировали, переносили в стерильные полипропиленовые пробирки (15 мл), содержащие 10 мл полной инкубационной среды (DMEM/F-12, 11039 GIBCO; 100 Ед/мл пенициллин;

100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин В; 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, HiCloneInc). После 5 мин центрифугирования (4°C, 200 г) жидкую фазу отбрасывали, клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной инкубационной среды и использовали для посева. Концентрацию клеток определяли в камере Горяева. Первичную культуру фибробластов кожи выделяли из спинных участков кожи крыс линии Wistar методом первичных эксплантов. Затем культивировали клетки в течение 5–7 пассажей, пассаж проводился при достижении 70% конfluence, коэффициент разведения при пассаже 1:5. Режим культивирования: среда полная инкубационная (DMEM/F-12, 11039 GIBCO; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин В; 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, HiCloneInc), 37°C, 5% CO₂ в атмосфере и 90% относительной влажности воздуха.

Для изучения цитотоксических свойств покрытия клетки при достижении 70% конfluence снимали с поверхности культивационного флакона T-75 фосфатно-солевым буфером (содержащим 0,05% трипсина и 0,5 мМ ЭДТА) и вносили по 3 мл клеточной суспензии (350 тысяч клеток) с полной инкубационной средой в ячейки 6-луночных полистироловых планшетов (Tissue culture Plate 6-Well Flat Bottom Cell+, Sarstedt, Германия), с синтезированным на поверхности ДУ ЛЦУ+N и ДУ ЛЦУ+Ag. Контролем служил аналогичный планшет без покрытия. Для каждого типа покрытий инокулировали по 3 лунки. Планшеты с покрытиями перед проведением исследований дополнительно стерилизовались этиленоксидным методом. Через 24 ч инкубации (37°C, 5% CO₂) оценивали морфологию клеток и структуру монослоя с использованием инвертированного микроскопа Leica DM IL (Leica Microsystems, Германия) при увеличении $\times 150$.

Результаты

Морфология и структура углеродных покрытий

Предложена следующая атомная модель пленок sp¹-углерода (рис. 1).

Пленки имеют многослойную структуру, при этом каждый слой представлен цепочками углеродных атомов в sp¹-гибридизации, ориентированными нормально к поверхности слоя. Цепочки упакованы в гексагональную решетку. Пленка состоит из цепочек углерода с зигзагами, случайно ориентированными в азимутальном направлении по отношению к оси цепочек.

Антибактериальная активность углеродных покрытий

Проведенное исследование позволило выявить антибактериальную активность, связанную с диффузией и распределением антибактериальных

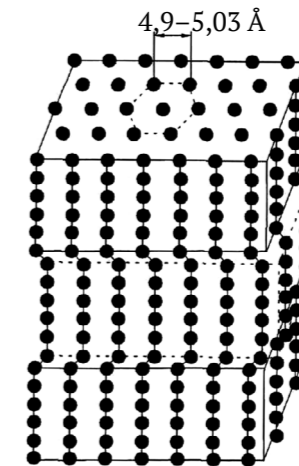


Рис. 1. Модель атомной структуры sp¹-углеродной пленки
Fig. 1. Model of atomic structure for sp¹-carbon film

компонентов в толще питательной среды, только для покрытия ДУ ЛЦУ+Ag и только в случае нанесения минимального по толщине слоя агаризованной питательной среды (1 мм) на его поверхность. При внесении большего объема питательной среды (толщина слоя 2 мм и 4 мм) за счет увеличения объема распределения для антибактериального компонента не достигались его бактериостатические концентрации и на поверхности среды наблюдался рост микроорганизмов. Двухслойный агаровый метод предназначен для выявления дистанционного антибактериального воздействия за счет диффузии компонентов покрытия и создания бактериостатических концентраций в объеме и на поверхности питательной среды. Дополнительно для антибактериальных компонентов с известными значениями минимальной подавляющей концентрации для контрольных штаммов косвенно можно оценивать интенсивность их высвобождения из покрытия в среду. Значения минимальной подавляющей концентрации катионов серебра и наночастиц серебра для контрольного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27853 составляет, по данным различных исследователей, от 3 до 8 мкг/мл [13, 14]. С учетом известных значений минимальной подавляющей концентрации серебросодержащих соединений для *P. aeruginosa* и полученных экспериментальных данных можно предположить, что интенсивность высвобождения микробиологически активных форм серебра с поверхности покрытия ДУ ЛЦУ+Ag не превышает 0,6–1,6 мкг/см² в сутки. Полученные расчетные данные требуют уточнения в прямых кинетических экспериментах по определению концентрации серебра, диффундирующего из покрытия в модельную среду. Вместе с тем, применительно к медицинским имплантатам для покрытий подобного типа вследствие незначительных количеств высвобождаемых с поверхности активных форм серебра можно прогнозировать отсутствие как цитотоксических эффектов на ткани перимплантационной области, так и отсутствие антибактериального эффекта на удалении более 1–2 мм от поверхности имплантата.

Поверхностная бактерицидная активность углеродных покрытий различного состава

Результаты определения поверхностной бактерицидной активности по JIS Z 2801: 2010 представлены в таблице 1 и на рисунке 2. Покрытия ДУ ЛЦУ и ДУ ЛЦУ+Ag обладали умеренной поверхностной бактерицидной активностью в отношении контрольных штаммов *S. aureus* ATCC 25923 и *E. faecalis* ATCC 29212 (индексы бактерицидности 59,7–79,5%). Покрытие ДУ ЛЦУ+Ag обладало выраженной поверхностной бактерицидной активностью в отношении всех включенных в исследование микроорганизмов (индексы бактерицидности 98,7–99,0%).

Устойчивость покрытий к механическим воздействиям

Результаты изучения поверхностной бактерицидной активности, определенной после 96-часовой абразивной обработки, представлены

в таблице 2. После отмывки покрытия ДУ ЛЦУ+N утрачивали поверхностную бактерицидную активность, что может быть связано с быстрым вымыванием азотсодержащих компонентов. Выявлено сохранение поверхностной бактерицидной активности покрытия ДУ ЛЦУ+Ag (не менее 98% от исходного уровня) в отношении всех включенных в исследование микроорганизмов.

Интенсивность образования микробных биопленок на поверхности углеродных покрытий

Покрытие ДУ ЛЦУ не препятствовало формированию микробных биопленок тест-культур микроорганизмов. Интенсивность образования биопленок штаммом *P. aeruginosa* P-142 была значительно выше по сравнению со штаммами MRSA, окрашенные кристаллическим фиолетовым биопленки на поверхности образцов визуализировались невооруженным глазом. Покрытие

Таблица 1

Показатели поверхностной бактерицидной активности углеродных покрытий

Микроорганизм	ДУ ЛЦУ		ДУ ЛЦУ+N		ДУ ЛЦУ+Ag	
	R	I, %	R	I, %	R	I, %
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,42	61,8	0,69	79,5	1,88	98,7
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,39	59,7	0,45	64,5	2,01	99,0
<i>P. aeruginosa</i> P-142	0,00	0,0	0,00	0,0	1,88	98,7

R – уровень антимикробной активности; I – индекс бактерицидности.

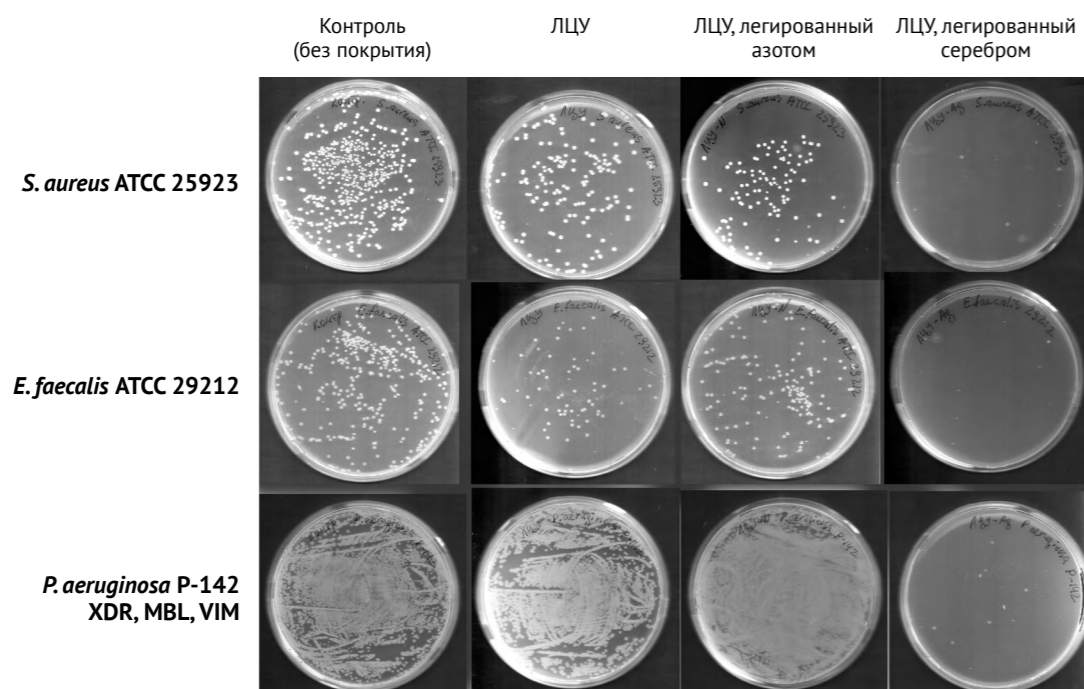


Рис. 2. Поверхностная бактерицидная активность углеродных покрытий на основе ДУ ЛЦУ (JIS Z 2801: 2010)
Fig. 2. Superficial bactericidal activity of carbon coatings based on TDOLCC (JIS Z 2801: 2010)

ДУ ЛЦУ+Ag практически полностью подавляло формирование биопленок. Результаты количественного определения интенсивности формирования микробных биопленок штаммом *P. aeruginosa* P-142 на поверхности образцов представлены в таблице 3.

По результатам микроскопии для включенных в исследование клинических изолятов *S. aureus* отмечена пониженная интенсивность пленкообразования на покрытии ДУ ЛЦУ+N в сравнении с покрытием ДУ ЛЦУ. Серебросодержащее покрытие ДУ ЛЦУ+Ag полностью подавляло формирование биопленок у *S. aureus*.

Адгезия и морфология клеток на поверхностях с покрытиями на основе ДУ ЛЦУ

Через 24 ч инкубации монослой первичных фибробластов кожи с плотностью заполнения поверхности не менее 70–95% формировался как в лунках контрольного планшета, так и в планшетах с покрытиями ДУ ЛЦУ+N и ДУ ЛЦУ+Ag (рис. 3). Структура моноослой, сформированного в лунках с покрытиями ДУ ЛЦУ+N и ДУ ЛЦУ+Ag, была неотличима от лунок контрольного планшета. Возможные цитотоксические эффекты (уменьшением размеров, округлением и последующим отслоением от поверхности) отсутствовали. Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния покрытий на морфологию кератиноцитов человека линии HaCaT.

Таким образом, анализ морфологических характеристик клеток показал, что покрытия на основе ДУ ЛЦУ не оказывали выраженного воз-

действия на их способность распластываться на поверхности и формировать моноослой, а также не вызывали цитотоксических эффектов.

Обсуждение

Серьезным ограничением для широкого внедрения имплантируемых изделий с антибактериальными свойствами в медицинскую практику является сложность создания покрытий, обеспечивающих длительное поддержание локальных эффективных концентраций антибиотиков или иных биоцидов в отношении основных возбудителей перипротезных инфекций. Многие носители, используемые для создания покрытий, продолжают выделять антибиотики в концентрациях ниже минимальной подавляющей концентрации в течение неопределенного периода, что способствует дополнительной селекции антибиотикорезистентности. Высказано предположение, что «идеальные» антибактериальные покрытия должны высвобождать антибиотик в количествах, обеспечивающих достаточные концентрации для подавления микроорганизмов, в течение длительного периода времени, после чего высвобождение антибиотиков должно быстро прекратиться, чтобы исключить риск развития устойчивых бактерий [15].

Предлагаемый метод ионно-стимулированной конденсации углерода в вакууме, позволяющий наносить на поверхность титановых имплантатов покрытия на основе линейного-цепочечного наноструктурированного углерода с антибактериальными легирующими добавками, отличается относительной простотой выполнения и одновременно высокой производительностью.

Таблица 2

Показатели поверхностной бактерицидной активности углеродных покрытий после 96-часовой абразивной обработки

Микроорганизм	ДУ ЛЦУ+N		ДУ ЛЦУ+Ag	
	R	I, %	R	I, %
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,13	26,3	1,80	98,4
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-0,01	-3,2	1,89	98,7
<i>P. aeruginosa</i> P-142	0,00	0,0	1,78	98,3

Таблица 3

Интенсивность формирования микробных биопленок *P. aeruginosa* P-142 на поверхности образцов с углеродными покрытиями

Тип покрытия	Масса красителя, сорбированная биопленкой, мкг/см ²
ДУ ЛЦУ	2,75
ДУ ЛЦУ+N	0,63
ДУ ЛЦУ+Ag	0,06

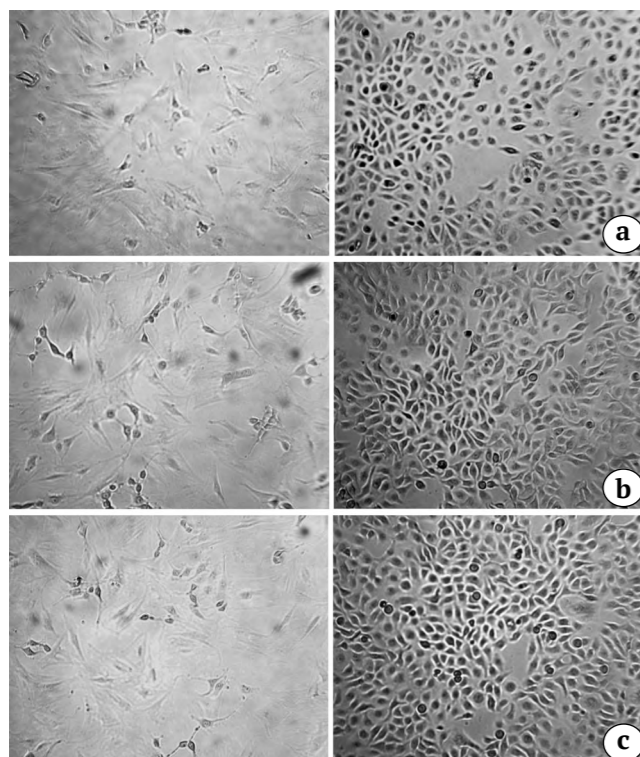


Рис. 3. Вид культур клеток первичных крысиных фибробластов (левый ряд) и HaCaT (правый ряд) после 24 ч культивирования на планшетах с покрытиями различного состава:

a — без покрытия;
b — покрытие ДУ ЛЦУ+N;
c — покрытие ДУ ЛЦУ+Ag

Fig. 3. Type of culture cells of primary rat fibroblasts (left row) and HaCaT (right row) after 24 hour culturing on plates with various coating:

a — no coating;
b — coating TDOLCC+N;
c — coating TDOLCC+Ag

Ранее был предложен целый ряд способов нанесения на стальные и титановые имплантаты «пассивных» покрытий, не обладающих собственной антибактериальной активностью, но замедляющих микробную адгезию за счет изменения физических характеристик. Среди них нанесение кристаллического оксида титана, полиметакриловой кислоты, полиэтиленоксида, полиэтиленгликоля, а также создание гидрофобных наноструктурированных поверхностей [16, 17]. Многие из представленных технологий позволяют значительно снизить бактериальную адгезию, однако до настоящего времени нет убедительных данных, демонстрирующих их клиническую эффективность, поскольку даже прикрепление единичных бактерий приводит со временем к формированию микробной биопленки, а сроки нахождения имплантатов в организме могут исчисляться месяцами и годами. Кроме того, препятствующая микробной адгезии модификация поверхностей часто ухудшает остеоинтегративные свойства имплантатов [18, 19].

В качестве антибактериальных компонентов в составе «активных» покрытий использовались наночастицы или катионы металлов (серебра, меди, цинка), антисептики (хлоргексидин, йод, полигексаметиленбигуанидин), антибиотики (аминогликозиды, цефалоспорины, ванкомицин, линезолид) [20, 21]. В экспериментах на животных проводилась оценка микробиологической эффективности различных антибактериальных покрытий при их нанесении на костные винты, спицы и интрамедуллярные фиксаторы, при этом различными авторами отмечалось стабильное снижение частоты инфекционных осложнений. Основными проблемами являлось кратковременное действие антимикробного агента, обычно не превышающее 48–96 ч, а также потеря действующего вещества при установке имплантата [22, 23].

Некоторые технологии синтеза антибактериальных покрытий на металлических имплантатах для травматологии и ортопедии прошли медицинские испытания и уже внедрены в клиническую практику. Известно, что биоинертность и хорошая биологическая совместимость титановых имплантатов обусловлена присутствием на их поверхности слоя оксида титана. Разработаны электрохимические технологии создания на поверхности титановых изделий оксидных слоев с развитой поверхностью и пористой структурой, способствующей хорошей интеграции имплантата с окружающей костной тканью. Путем добавления повидон-йода в состав электролита для анодирования на поверхности титановых имплантатов были сформированы покрытия из оксида титана, содержащие в своей пористой структуре йод в комплексе с водорастворимым полимером [24]. Использование данного йодсодержащего оксидного покрытия на эндопротезах тазобедренного и коленного суставов, винтах и пластинах для остеосинтеза, системах транспедикулярной фиксации позвоночника как с целью профилактики перипротезной инфекции, так и для ее купирования в случае проведения ревизионных операций и реимплантаций показало их хорошую клиническую эффективность [25].

Сертифицированные в 2005 г. для клинического использования в Европейском союзе интрамедуллярные фиксаторы переломов большеберцовой кости из титанового сплава Ti-6Al7Nb с антибактериальным покрытием (UTN PROtect, Synthes) несут на своей поверхности тонкий слой поли-D,L-лактоида, импрегнированного гентамицином. В медицинских испытаниях использование интрамедуллярного фиксатора UTN PROtect показывало хорошие клинические, лабораторные и рентгенологические результаты через 6 мес. после имплантации, что позволило рекомендовать его как для профилактики инфекций, так и для купирования

инфекционного процесса при выполнении ревизионных операций [26, 27].

Биоциды неорганического происхождения (в первую очередь катионы и наночастицы серебра) являются хорошей альтернативой антибиотикам для включения в состав антибактериальных покрытий, поскольку для них характерна высокая длительная бактерицидная активность, хорошая биосовместимость, стабильность и очень медленное формирование резистентности у бактерий [28, 29]. Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают хорошую биологическую совместимость серебро-содержащих покрытий при отсутствии цитотоксичности и генотоксичности. В экспериментах на животных показано, что серебро-содержащие имплантаты не вызывают локальных или системных побочных эффектов [30]. Серебро может быть включено в состав различных носителей, включая полимеры, биокерамику, биостекло, углеродные пленки [30, 31]. Легированные серебром поверхности имплантатов эффективно противодействуют бактериальной адгезии и формированию микробных биопленок, при этом существенно не влияют на активность остеобластов и эпителиальных клеток [18, 22].

Выявленный в настоящем исследовании выраженный поверхностный бактерицидный эффект покрытий ДУ ЛЦУ+Ag проявлялся в отношении как антибиотикочувствительных, так и антибиотикорезистентных микроорганизмов, бактерицидная активность проявлялась также способностью предотвращения формирования микробных биопленок на металлических поверхностях с нанесенным покрытием. Высокая механическая устойчивость серебро-содержащего покрытия к абразивной обработке и его биологическая совместимость делает предложенную технологию перспективной для придания антибактериальных свойств широкому перечню имплантируемых изделий медицинского назначения. Низкая интенсивность высвобождения активных форм серебра с поверхности покрытия предполагает отсутствие цитотоксических эффектов на ткани перимплантационной области. Вместе с тем прогнозируется длительная (не менее 1–2 нед.) защита поверхности имплантата от колонизации микроорганизмами и формирования микробных биопленок.

Конфликт интересов: не заявлен.

Источник финансирования: государственное бюджетное финансирование.

Вклад авторов

Тапальский Д.В. — выполнение микробиологических исследований, подготовка рукописи.

Николаев Н.С., Овсянкин А.В. — общая концепция исследования, интерпретация результатов.

Кочаков В.Д. — синтез антибактериальных покрытий.

Головина Е.А., Сухорукова М.В. — подбор тест-культур микроорганизмов, выполнение микробиологических исследований.

Матвеев М.В. — определение цитотоксичности покрытий.

Козлов Р.С. — координация исследований, подготовка рукописи.

Литература [References]

- Koseki H., Yonekura A., Shida T., Yoda I., Horiuchi H., Morinaga Y. et al. Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. *PLoS One*. 2014;9(10):e107588. DOI: 10.1371/journal.pone.0107588.
- Zimmerli W., Moser C. Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;65(2):158–168. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00938.x.
- Bruellhoff K., Fiedler J., Möller M., Groll J., Brenner R.E. Surface coating strategies to prevent biofilm formation on implant surfaces. *Int J Artif Organs*. 2010;33(9):646–653. DOI: 10.1177/039139881003300910.
- Казбанов В.В., Баталов М.С., Вишневецкий А.А. Особенности биосовместимости и перспективы применения титановых имплантатов с алмазоподобными покрытиями на основе модифицированного углерода. *Проблемы здоровья и экологии*. 2015;(2):16–23. Kazbanov V.V., Batalov M.S., Vishnevsky A.A. [The peculiarities of biocompatibility and potential applications of titanium implants with diamond-like coatings based on modified carbon]. *Problemy zdorov'ya i ekologii* [Problems of health and ecology]. 2015;(2):16–23. (in Russian).
- Oliveira L.Y., Kuromoto N.K., Siqueira C.J. Treating orthopedic prosthesis with diamond-like carbon: minimizing debris in Ti6Al4V. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(10):2347–2355. DOI: 10.1007/s10856-014-5252-y.
- Бабаев В.Г., Новиков Н.Д., Гусева М.Б., Хвостов В.В., Савченко Н.Ф., Коробова Ю.Г., Александров А.Ф. Пленки линейно-цепочечного углерода — упорядоченные ансамбли квантовых нитей — материал для нанoeлектроники. *Нанотехнологии: разработка, применение — XXI век*. 2010;2(1):53–68. Babaev V.G., Novikov N.D., Guseva M.B., Khvostov V.V., Savchenko N.F., Korobova Yu.G., Alexandrov A.F. [Linear-chain carbon films — ordering ensemble of quantum wire — material for nanoelectronic]. *Nanotekhnologii: razrabotka, primeneni — XXI vek* [Journal Nanotechnology: development and applications — XXI Century]. 2010;2(1):53–68. (in Russian).
- Беляев Л.В., Ваганов В.Е., Кочаков В.Д., Гоголинский К.В., Кравчук К.С. Исследование структуры и свойств покрытий на основе линейно-цепочечного углерода для полимеров медицинского назначения. *Перспективные материалы*. 2013;3:41–46. Belyaev L.V., Vaganov V.E., Kochakov V.D., Gogolinsky K.V., Kravchuk K.S. [Research of structure and properties of coatings on the basis of linearly-chained carbon for polymers medical appointment]. *Perspektivnye materialy* [Promising materials]. 2013;3:41–46. (in Russian).
- Williams D.F., Roaf R. Implants in surgery. London: W.B. Saunders Company; 1973. 598 p. DOI: 10.1002/bjs.1800611217.
- Александров А.Ф., Гусева М.Б., Корнеева Ю.В., Новикова Н.Д., Хвостов В.В. Результаты и перспективы применения биосовместимых форм линейно-цепочечного углерода в медицине. *Интеграл*. 2011;61(5):27–31. Aleksandrov A.F., Guseva M.B., Korneeva Yu.V., Novikova N.D., Khvostov V.V. [Results and prospects of using biocompatible forms of linear-chain carbon in medicine]. *Integral*. 2011;61(5):27–31. (in Russian).
- Kudryavtsev Yu.P., Evsyukov S.E., Guseva M.B., Babaev V.G. Oriented carbon layers. *Carbon*. 1992;30(2):213–221. DOI: 10.1016/0008-6223(92)90082-8.
- Новиков Н.Д., Бабаев В.Г., Гусева М.Б., Трубин В.В., Маллин Д.А., Лешчинский А.М. Sp1-углерод и медицина. История успеха и потенциальные возможности. *Нанотехника*. 2007;10(2):57–63. Novikov N.D., Babaev V.G., Guseva M.B., Trubin V.V., Mallin D.A., Leshchinskii A.M. [Sp1-carbon and medicine. Success story and potential capabilities]. *Nanotekhnika* [Nanotech]. 2007;10(2):57–63. (in Russian).
- Qia C., Rogachev A.V., Tapal'skii D.V., Yarmolenko M.A., Rogachev A.A., Jianga X., Koshanskay E.V., Vorontsov A.S. Nanocomposite coatings for implants protection from microbial colonization: formation features, structure, and properties. *Surf Coat Tech*. 2017;315:350–358. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2017.02.066.

13. Abalkhil T.A., Alharbi S.A., Salmen S.H., Wainwright M. Bactericidal activity of biosynthesized silver nanoparticles against human pathogenic bacteria. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2017;31(2):411-417. DOI: 10.1080/13102818.2016.1267594.
14. dos Santos C.A., Jozala A.F., Pessoa A.J., Seckler M.M. Antimicrobial effectiveness of silver nanoparticles co-stabilized by the bioactive copolymer pluronic F68. *J Nanobiotechnology.* 2012;10:43. DOI: 10.1186/1477-3155-10-43.
15. Romano C.L., Scarponi S., Gallazzi E., Romano D., Drago L. Antibacterial coating of implants in orthopaedics and trauma: a classification proposal in an evolving panorama. *J Orthop Surg Res.* 2015;10:157. DOI: 10.1186/s13018-015-0294-5.
16. Legeay G., Poncin-Epaillard F., Arciola C.R. New surfaces with hydrophilic/hydrophobic characteristics in relation to (no)bioadhesion. *Int J Artif Organs.* 2006;29(4):453-461. DOI: 10.1177/039139880602900416.
17. Verran J., Whitehead K. Factors affecting microbial adhesion to stainless steel and other materials used in medical devices. *Int J Artif Organs.* 2005;28(11):1138-1145. DOI: 10.1177/039139880502801111.
18. Zhao L., Chu PK, Zhang Y, Wu Z. Antibacterial coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91(1):470-480. DOI: 10.1002/jbm.b.31463.
19. Bumgardner J.D., Adatrow P., Haggard W.O., Norowski P.A. Emerging antibacterial biomaterial strategies for the prevention of peri-implant inflammatory diseases. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(3):553-560.
20. Gimeno M., Pinczowski P., Perez M., Giorello A., Martinez M.A., Santamaria J., Arruebo M., Lujan L.A controlled antibiotic release system to prevent orthopedic-implant associated infections: An in vitro study. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;96:264-271. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.08.007.
21. Zilberman M., Elsnor J.J. Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J Control Release.* 2008;130(3):202-215. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.05.020.
22. Ewald A., Gluckermann S.K., Thull R., Gbureck U. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online.* 2006;5;22. DOI: 10.1186/1475-925X-5-22.
23. Liu X., Chu P.K., Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng.* 2004;47(3-4):49-121. DOI:10.1016/j.mser.2004.11.001.
24. Shirai T., Shimizu T., Ohtani K., Zen Y., Takaya M., Tsuchiya H. Antibacterial iodine-supported titanium implants. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1928-1933. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.11.036.
25. Tsuchiya H., Shirai T., Nishida H., Murakami H., Kabata T., Yamamoto N., Watanabe K., Nakase J. Innovative antimicrobial coating of titanium implants with iodine. *J Orthop Sci.* 2012;17(5):595-604. DOI: 10.1007/s00776-012-0247-3.
26. Fuchs T., Schmidmaier G., Raschke M.J., Stange R. Bioactive-coated implants in trauma surgery. *Eur J Trauma Emerg S.* 2008;34(1):60-68. DOI: 10.1007/s00068-006-6110-5.
27. Fuchs T., Stange R., Schmidmaier G., Raschke M.J. The use of gentamicin-coated nails in the tibia: preliminary results of a prospective study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011;131(10):1419-1425. DOI: 10.1007/s00402-011-1321-6.
28. Juan L., Zhimin Z., Anchun M., Lei L., Jingchao Z. Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect. *Int J Nanomedicine.* 2010;5(5):261-267. DOI: 10.2147/IJN.S8810.
29. Melaiye A.Y.W. Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opin Ther Pat.* 2005;15(2):125-130. DOI: 10.1517/13543776.15.2.125.
30. Bosetti M., Masse A., Tobin E., Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials.* 2002;23(3):887-892. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00198-3.
31. Balamurugan A., Balossier G., Laurent-Maquin D., Pina S., Rebelo A.H., Faure J., Ferreira J.M. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dent Mater.* 2008;24(10):1343-1351. DOI: 10.1016/j.dental.2008.02.015.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Тапальский Дмитрий Викторович — канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Николаев Николай Станиславович — д-р мед. наук, главный врач, ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России, г. Чебоксары, Россия

Овсянкин Анатолий Васильевич — канд. мед. наук, главный врач, ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России, г. Смоленск, Россия

Кочаков Валерий Данилович — канд. техн. наук, профессор кафедры прикладной физики и нанотехнологий, ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Головина Елена Анатольевна — врач-бактериолог, ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава России, г. Смоленск, Россия

Матвеевков Матвей Владимирович — научный сотрудник лаборатории комбинированных воздействий, ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь

Сухорукова Марина Витальевна — канд. мед. наук, старший научный сотрудник, руководитель отдела многоцентровых исследований, НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет», г. Смоленск, Россия

Козлов Роман Сергеевич — д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет», г. Смоленск, Россия

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Dmitry V. Tapalski — Cand. Sci. (Med.), associate professor, head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Nikolai S. Nikolaev — Dr. Sci. (Med.), head physician, Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis, Cheboksary, Russian Federation

Anatoly V. Ovsyankin — Cand. Sci. (Med.), head physician, Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis, Smolensk, Russian Federation

Valery D. Kochakov — Cand. Sci. (Eng.), professor at the Department of Applied Physics and Nanotechnologies, Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Elena A. Golovina — clinical bacteriologist, Federal Center of Traumatology, Orthopedics and Endoprosthesis, Smolensk, Russian Federation

Matvei V. Matveenkov — researcher, Combined Effects Laboratory, Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

Marina V. Sukhorukova — Cand. Med. Sci., senior researcher, head of the Department of Multicenter Study of Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy of Smolensk State Medical University, Smolensk, Russian Federation

Roman S. Kozlov — Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member of the Russian Academy of Sciences; director of Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy of Smolensk State Medical University, Smolensk, Russian Federation