

УДК 579.22

Г. М. Назаренко¹, асп., О. Л. Рахімова¹, асист., Н. Т. Кліменкова², канд. фіз. — мат. наук, Є. О. Прокопчук², ст. наук. співроб., В. О. Іваниця¹, д-р. біол. наук, проф.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна
¹каф. мікробіології і вірусології, ²каф. фізіології людини і тварини

АДГЕЗИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 ДО ІМПЛАНТАТІВ З ПОВЕРХНЕЮ МОДИФІКОВАНОЮ АЛМАЗОВМІСТКИМ ПОКРИТТЯМ

У досліджах *in vitro* вивчали адгезію *Staphylococcus aureus* до полімерних, металевих та керамічних матеріалів. Встановлено, що до алмазовмісткої плівки (АП), після її двохгодинної експозиції у мікробній суспензії, бактерії прикріплюються у меншому ступені ніж до матеріалів без АП. Встановлено, що при адгезії переважають гідрофобні взаємодії.

Ключові слова: адгезія, алмазовмістке покриття, гідрофільність, гідрофобність.

Адгезія мікробів до штучних матеріалів — найбільш важливий перший крок у процесі інфікування імплантатів, і можливого їхнього руйнування [1-3]. Модифікація поверхні імплантатів вважається однією з важливих мір запобігання запального процесу навколо установлені конструкції. В даний час у медичній практиці починають використовувати імплантати з захисним керамічним покриттям, що, на жаль, збільшує ризик розвитку інфекції [4, 5]. Тому питання адгезії мікроорганізмів до різних матеріалів, які використовуються для виготовлення імплантатів і покриттям для них залишається відкритим і актуальним.

Відомо, що при оперативних втручаннях, у першу чергу стафілококи викликають гнійно-запальні ускладнення. Це обумовлено тим, що стафілокок має високу спорідненість до кісткової тканини і продукує сильні токсини і ферменти [6]. У зв'язку з вищесказаним, дослідження адгезії *S. aureus* до АП, нанесеному по однієї і тій же технології на різні матеріали для імплантатів, становить інтерес.

Таким чином, метою даної роботи було дослідження адгезії типового штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 до модифікованих поверхонь різних імплантатів. Для досягнення поставленої мети було проведено: 1) вивчення прикріплення мікроорганізмів до алмазовмісткої оболонки, 2) визначення типу (гідрофільної або гідрофобної) взаємодії між стафілококом і імплантатами за допомогою порівняння адгезії стафілокока до заздалегідь заданих типів поверхонь.

Матеріали і методи

Експерименти проводили з використанням типового штаму *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, з колекції кафедри мікробіології Одеського національного університету. Перед експериментом штам вирощували на м'ясопептоному бульйоні до стаціонарної фази росту (близько 18 годин інкубації при 37 °С).

Для дослідження прикріплення мікробних клітин до поверхні імплантатів був модифікований метод, запропонований McEldowney і Fletcher [7]. Після інкубування бактерії збирали за допомогою центрифугування, ресуспендували у 20 мл фосфатного буфера (рН 7,0) і витримували при 37 °С на протязі 2 годин в присутності 1 мікроСі L-[¹⁴C]-лейцину · мл⁻¹. Мічені бактерії тричі відмивали наступним центрифугуванням з метою видалення незв'язаної мітки і ресуспендували знову у буфері, доводячи кінцеву концентрацію клітин до 10¹³ кл/мл. Суспензію розливали по 1 мл у пеніцилінові флакони зі зразками матеріалів для імплантації (25 мм²): лавсана і поліметилметакрилату (ПММА), кераміки і кобальт-хромового сплаву (КХС) у чистому вигляді та з модифікованою поверхнею АП. У досліджах використовували по 4 зразки кожного типу матеріалів. В якості контролю служила мікробна суспензія без зразків (3 флакони).

Після видалення імплантатів через 2 та 24 години їх інкубування з міченими бактеріями, адгезію останніх визначали підрахунком інтенсивності радіоактивного випромінювання мікробної суспензії у буферному розчині. Підрахунок здійснювався за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника "Beta". Результати експерименту виражали у відсотках від контролю (адгезія до скла).

Для визначення життєздатних клітин стафілокока був використаний метод серійних розведень і послідуєчий висів культури на м'ясо-пептоний агар. Облік КУО (колонієутворюючих одиниць) був зроблений згідно з загальноприйнятою методикою [8].

Для визначення типу взаємодії (гідрофобного або гідрофільного) між мікроорганізмами і різними матеріалами нами був використаний непрямий (фотоколориметричний) метод.

Були використані такі ж зразки, що й у вищевикладеному досліді, а також зразки розміром 25 мм² з полістиролових чашок Петри (ЧП), що мають відносно гідрофобну поверхню, і полістиролових чашок для культури тканин (ЧКТ), що мають відносно гідрофільну поверхню. Кожен зразок культивували у флаконі (діаметр дна 2 см) при 37 °С у суспензії мікробів у фосфатному буфері рН 7,0 (10¹³ мікробних клітин/мл, об'єм 1 мл) протягом 2 і 24 годин.

Після видалення зразків матеріалів для імплантації адгезію мікробів визначали за допомогою спектрофотометра "СФ 4-А" непрямим методом по світлопроникності мікробної суспензії. Як контроль (К) використовували мікробну суспензію без імплантатів і еталонів (4 флакони) після культивування протягом 2 і 24 годин (адгезія до скла). Результати досліді виражали у відсотках від контролю.

Всі експерименти були повторені як мінімум двічі. Усі дані дослідів оброблені статистично.

Результати та їх обговорення

У контролі зменшення інтенсивності радіоактивного випромінювання, обумовлене 2-годинним осадженням стафілокока, складала у середньому 9,5 % від вихідного рівня. Після 24 годин експозиції зниження радіоактивності в контролі склало 19,5 %.

Введення імплантатів у мікробну суспензію значно зменшувало інтенсивність радіоактивного випромінювання бактеріальної суспензії в порівнянні з контролем, що обумовлено адгезією мікроорганізмів на зразках (рис.1).

Після 2-годинної експозиції адгезія стафілокока досягала 59-92 % на матеріалах без покриття і 51-56 % на імплантатах з модифікованою АП поверхнею. У випадку з КХС, прикріплення мікроорганізмів, після нанесення на нього досліджуваної оболонки зменшилося в 1,62 рази, з лавсаном — в 1,3 рази, з керамікою — у 1,19 разів і з ПММА — у 1,17 разів.

Було встановлено, що адгезія бактерій до різних матеріалів в алмазовмісткій оболонці здійснилася з практично однаковою інтенсивністю, це обумовлено тим, що плівка досить міцно з'єднана з матеріалами і змінює їх поверхневі властивості [9]. Характер взаємодії імплантатів в АП з клітинами *S. aureus* став більш ареаєктивним. Одним з пояснень зменшення адгезії на АП може стати той факт, що покриття згладжує поверхню матеріалу, а з літератури відомо, що розвинутий рельєф поверхні імплантатів збільшує площу контакту з мікробом і сприяє фізичному захистові бактерій від імунної системи організму [4].

Через 24 години культивування ми спостерігаємо часткове відкріплення мікроорганізмів від імплантатів без покриття (рівень адгезії клітин *S. aureus* склав 40-67 % від контролю). Цей ефект можливо зв'язаний зі зміненням біохімічної активності у клітин взятого нами штаму, тому що через 24 години експозиції мікробної суспензії, життєздатні клітини були відсутні (рис.2). Але це не означає, що бактерії повинні відкріпитися повністю від імплантатів. Між мікроорганізмами і небіологічними матеріалами може існувати взаємодія за рахунок фізичних та хімічних зв'язків між поверхнями, які можуть змінюватись в процесі експозиції.

З експерименту видно, що втрата життєздатності стафілокока практично не впливає на його прикріплення до АП, більш того, адгезія навіть декілька збільшується (56-61 %) (рис.2).

На думку багатьох авторів [10] поверхня грампозитивних мікроорганізмів більш гідрофобна, ніж грамнегативних. Висока гідрофобність поверхні бактерій — це визначальний фактор адгезії мікроорганізмів до твердих матеріалів. У зв'язку з цим цікаво визначити який тип взаємодії при адгезії стафілокока до імплантатів — гідрофільний або гідрофобний — є переважним.

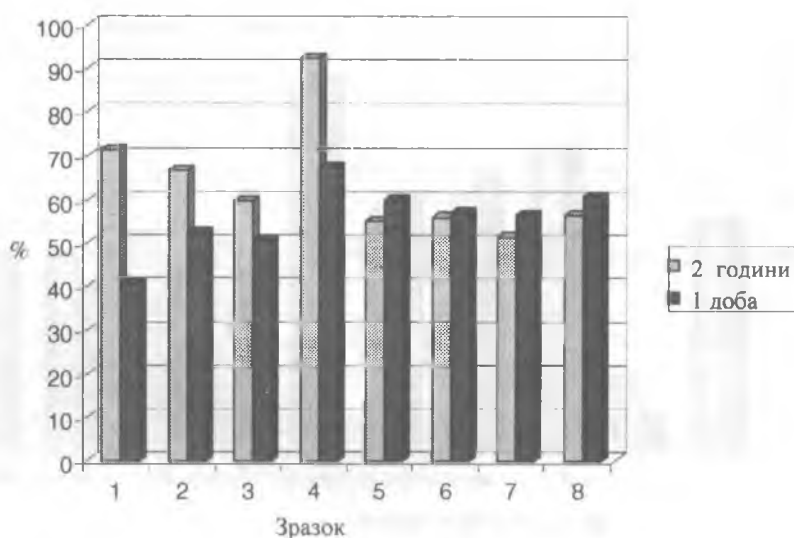


Рис. 1. Адгезія *S. aureus* до імплантатів.

- | | |
|-------------|------------------|
| 1. Лавсан | 5. Лавсан з АП |
| 2. Кераміка | 6. Кераміка з АП |
| 3. ПММА | 7. ПММА з АП |
| 4. КХС | 8. КХС з АП |

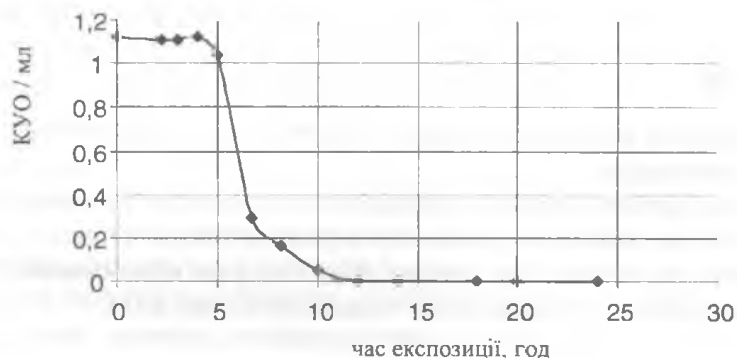


Рис. 2. Залежність кількості життєздатних клітин *S. aureus* від часу експозиції.

Попередні дані свідчать про те, що поверхня АП є гідрофільною [11]. Ми припустили, що зменшення адгезії стафілокока до імплантатів з покриттям пов'язано саме з цим показником. Адгезія до матеріалів, у яких поверхня модифікована АП, після 2-годинної експозиції досягала 60,3-63,3 % від контролю, що було менше ніж до ЧП і до матеріалів без покриття, які проявили надзвичайно високі гідрофобні властивості (рис. 3).

Таким чином, АП дає можливість змінити властивості поверхні матеріалів і додати їм більшу гідрофільність. Це дуже важливо для імплантатів, так як відомо, що при збільшенні гідрофільності імплантатів підвищується їх біологічна сумісність і знижується їх токсичність [12].

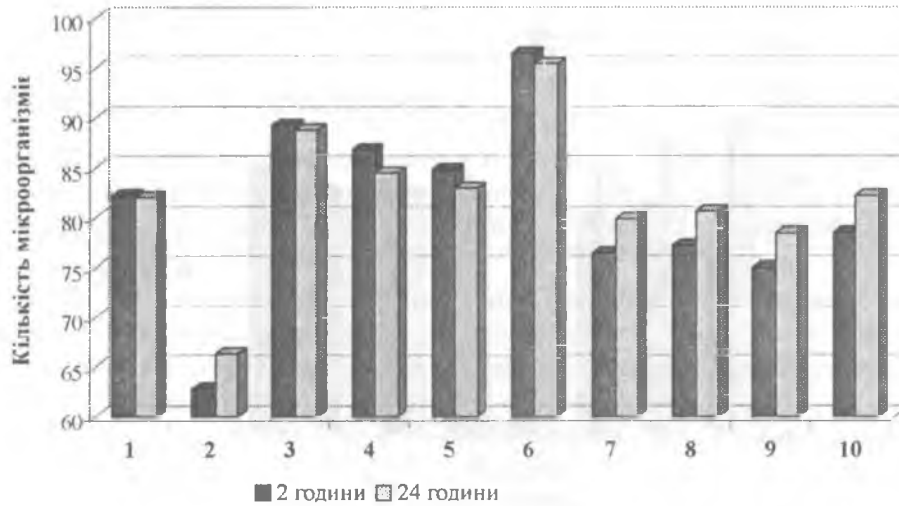


Рис. 3. Щільність осідання *S. aureus* на поверхні, 10¹⁰/см²

- | | |
|-------------|------------------|
| 1. ЧП | 6. КХС |
| 2. ЧКТ | 7. Лавсан з АП |
| 3. Лавсан | 8. Кераміка з АП |
| 4. Кераміка | 9. ПММА з АП |
| 5. ПММА | 10. КХС з АП |

Висновки:

1. Встановлена здатність стафілокока колонізувати небіологічні матеріали для імплантації.
2. Алмазовмістка плівка модифікує поверхню імплантатів так, що *Staphylococcus aureus* прикріплюється у меншому ступені.
3. Одним із факторів, що зменшують ступінь обсемененості стафілококами імплантатів є гідрофільність поверхні матеріалів.

Література

1. Fischer B., Vaudaux P., Magnin M. et al. Novel animal model for studying the molecular mechanisms of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion // J. of Orthopedic Research. — 1996. — V. 6, № 14. — P. 914-920.
2. Дяченко Ю. В. Парадоксы стафилококковой инфекции в стоматологии // Стоматология. — 1999. — Т. 78, № 2. — С. 25-27.
3. Ватченко А. А., Сакович В. Н., Максименко О. Н. Микрофлора конъюнктивальной полости здорового глаза и возбудители бактериальных инфекций роговицы // Офтальм. журн. — 2002. — Т. 386, № 3. — С. 53-57.
4. Dougherty S. H. Handbook of biomaterials evaluation / Ed. A.F. von Recum. N.Y. West Conshocken. — 1986. — P. 276-289.
5. Filiaggi M. J., Pilliar R.M., Abdulla D. 1. Evaluating sol-gel ceramic thin films for metal implant application. 2. Adhesion and fatigue properties of zirconia films on Ti — 6Al — 4V // J. of Biomedical Materials Research. — 1996. — V. 4, № 33. — P. 239-256.

6. Акатов А. К., Бароян О. В., Беляков В. Д. и др. Стафилококки и стафилококковая инфекция. Саратов: Изд-во Саратовского университета, 1980. — 320 с.
7. McEldowney S., Flether M. Effect of pH, Temperature, and Growth Conditions on the Adhesion of a Gliding Bacterium and Three Nongliding Bacteria to Polystyrene // Microb. Ecol. — 1988. — № 16. — P. 183-195.
8. Мейнелл Д. Ж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. — 1967. — 347 с.
9. Клименкова Н. Т., Прокопчук Е. О. Оболочка для имплантируемых протезов // Матеріали науково-практичної конференції / Екологія міст та рекреаційних зон, Одеса, 25-26 червня 1998 р. — С.188.
10. Курдиш И. К. Закономерности взаимодействия микроорганизмов с твердыми материалами // Микробиол. журн. — 2001. — Т. 63, № 6. — С. 71-86.
11. Іваниця В. О., Клименкова Н. Т., Прокопчук Е. О., Макарчук Г. М., Чирченко А. Звіт про науково-дослідну роботу “Дослідження адсорбційної здібності та біодеградаційних процесів у часі на поверхні алмазовмістимої оболонки медичних протезів, що імплантуються”. — д/б тема № 778.
12. Андреева Л. Д., Тарутта Е. П., Иомдина Е. Н. и др. Склеропластика с использованием плазменно-модифицированных гомосклеральных трансплантатов в эксперименте (морфологическое исследование) // Вестник офтальмол. — 2000. — № 5. — С. 43-44.

А. Н. Назаренко ¹, Е. Л. Рахимова ¹, Н. Т. Клименкова ²,
Е. О. Прокопчук ², В. А. Іваниця ¹

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,

¹ каф. микробиологии і вірусології, ² каф. физиологии человека и животных, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АДГЕЗИЯ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 К ИМПЛАНТАМ С ПОВЕРХНОСТЬЮ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ АЛМАЗОСОДЕРЖАЩИМ ПОКРЫТИЕМ

Резюме

В исследованиях *in vitro* изучали адгезию *Staphylococcus aureus* к полимерным, металлическим и керамическим материалам. Установлено, что к алмазосодержащему покрытию (АП), после её двухчасовой экспозиции в микробной суспензии, бактерии прикрепляются в меньшей степени, чем к материалам без АП. Установлено, что при адгезии преобладают гидрофобные взаимодействия.

Ключевые слова: адгезия, алмазосодержащее покрытие, гидрофильность, гидрофобность.

**A. Nazarenko¹, E. Rahimova¹, N. Klimenkova², E. Prokopchuk²,
V. Ivanitsa¹**

Odessa National University,

¹ Department of Microbiology and Virology, ² Department of Human and Animals
Physiology, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**AN ADHESION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923
TO IMPLANT WITH MODIFICATION'S SURFACE TO
DIAMONDCONTAINTION'S FILM**

Summary

The adhesion of *Staphylococcus aureus* to polymeric, metallic and ceramic materials is studied in vitro. After two hours exposition the microorganisms are attach to diamondcontaintion's film (DF) less than to materials without DF. In the time of adhesion the hydrophobic interaction is prevail.

Key words: adhesion, diamondcontaintion's film, hydrophobic, hydrophilic.