

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОКСИАПАТИТА И НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ IN VITRO

Шпиняк С.П.<sup>1</sup>, Барабаш А.П.<sup>1</sup>, Лясникова А.В.<sup>2</sup>, Шунова А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Саратов, s.shpiniak@rambler.ru

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет имени Ю.А.Гагарина», г.Саратов

Возникновение параимплантарной инфекции после тотального эндопротезирования суставов значительно снижает качество жизни пациента, приводит к необходимости неоднократных оперативных вмешательств, в положительном исходе которых хирург не может быть до конца уверенным. Кроме того, существенно возрастает степень риска рецидивирования, воспаления при последующем ревизионном эндопротезировании, что делает сохранение функции сустава невозможным и приводит к стойкой инвалидизации больного. Исследования по созданию покрытий для медицинских имплантатов, обладающих высокой бактерицидной активностью и препятствующих формированию резистентности у патогенных микроорганизмов, сегодня являются перспективным направлением медицинской науки и могут открыть новую страницу в профилактике и лечении инфекционных осложнений тотального эндопротезирования. Наиболее распространенными возбудителями перипротезной инфекции являются грамположительные *St. aureus* и *St.epidermidis* (50-70%). Нами исследована антимикробная активность гидроксиапатита (ГА) с включением в состав наночастиц различных металлов in vitro в отношении штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями тотального эндопротезирования коленного сустава.

Ключевые слова: эндопротезирование, инфекция, гидроксиапатит, наночастицы, *Staphylococcus aureus*.

## EXPERIMENTAL RESEARCH OF HYDROXYAPATITE AND METAL NANOPARTICLES ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN VITRO

Shpinyak S.P.<sup>1</sup>, Barabash A.P.<sup>1</sup>, Lyasnikova A.V.<sup>2</sup>, Shunova A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Government-Financed Institution "Saratov Research Institute of Traumatology and Orthopaedics" of Ministry of Public Health of the Russian Federation (FGBU «SarNIITO» of Minzdrava of Russia), s.shpiniak@rambler.ru

FSBEI HPO "Saratov State Technical University named after Yu. A. Gagarin", lyasnikovaav@mail.ru

The onset of paraimplantary infection after total joint replacement significantly decreases patients' life quality and leads to the need in repetitive surgical interventions and a surgeon cannot be completely sure in their positive outcome. Besides the level of inflammation recurrence risk in subsequent revisionary endoprosthesis replacement increases substantially which makes joint function retention impossible and results in constant disablement. Researches on creating medical implant coverings favoring anti-resistance in pathogenetic microorganisms and having high antimicrobial activity are on the scientific foreground today. These studies may turn over a new leaf in preventive and general treatment of infectious complications after total joint replacement. Most common agents of periprosthetic infection are Gram-positive *St. aureus* and *St. epidermidis* (50-70%). We have studied antimicrobial activity of hydroxyapatite combined with various metal nanoparticles in vitro to *Staphylococcus aureus* strains obtained from the patients with infectious complications after total knee replacement.

Keywords: endoprosthesis, infection, hydroxyapatite, nanoparticles, *Staphylococcus aureus*.

Развитие медицинской науки, в особенности в области биокomпозитных материалов, позволило эффективно использовать полиметилметакрилат в качестве матрицы для создания длительно-существующего депо антибиотика, что сразу нашло широкое распространение в лечении гнойно-воспалительных заболеваний опорно-двигательной системы, в частности – глубокой перипротезной инфекции [1; 4; 6]. Наиболее широкое применение в качестве антимикробного агента в составе спейсеров получили лекарственные химиопрепараты

(гентамицин, ванкомицин и тобрамицин, реже цефалоспорины, другие аминогликозиды и пенициллины). Предпринимаются попытки внедрить в состав ПММА антисептики или частицы галогенов, металлов, обладающих антимикробной активностью, но эти работы пока единичны [2; 7; 9; 10].

Учитывая данные о том, что эллюция антибиотика происходит только из поверхностных слоев ПММА, а значит, распределенное по всему объему действующее вещество остается интактным в отношении патогенных микроорганизмов и не выполняет свою основную функцию [5], нам представляется перспективной разработка покрытий, способных сочетать бактерицидные и бактериостатические свойства наравне с высокой степенью биосовместимости с тканями организма.

Синтетический чистый гидроксиапатит,  $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ , является неорганическим основным компонентом костной ткани, разрешенным для нанесения на хирургические имплантаты. Материал инертен к тканям человека, малотоксичен и при его применении не наблюдается побочных явлений (воспаления, аллергии, мутагенного действия). Регулируя обмен кальция и фосфора, является матриксом костных тканей с неорганической природой, усиливает пролиферацию остеобластов и ускоряет процесс репаративного остеогенеза в месте его введения [3; 8].

**Цель исследования.** Исследовать *in vitro* антимикробные свойства покрытий на основе гидроксиапатита и наночастиц различных металлов по отношению к выделенным у больных с глубокой перипротезной инфекцией коленного сустава штаммам *Staphylococcus aureus*.

**Материалы и методы.** В качестве экспериментальных образцов применялся порошок гидроксиапатита с добавлением наночастиц металлов. Синтез замещенных порошков (степень замещения до 20%) проводился методом осаждения из водных растворов по реакции при комнатной температуре  $t = 20^\circ \text{C}$  и влажности воздуха 58%, рН раствора поддерживался на уровне 9-12. Полученный в результате синтеза осадок оставляли на созревание на 24 часа в химическом стакане, фильтровали и сушили, затем далее в течение 6 часов прокаливали при температуре  $600^\circ \text{C}$ . Полученный порошок охлаждали при комнатной температуре в течение суток, после чего размалывали в керамической ступе нажатием пестика и выполняли фракционирование с применением сит.

Плазменное напыление полученных порошков производилось на полуавтоматической установке УПН-28 в лаборатории кафедры ФМБИ СГТУ им. Гагарина Ю.А. Покрытие формировалось последовательным нанесением порошка титана (дисперсность до 350 мкм, дистанция напыления 150 мм, ток дуги плазмотрона 350 А) и ГА покрытием и порошка

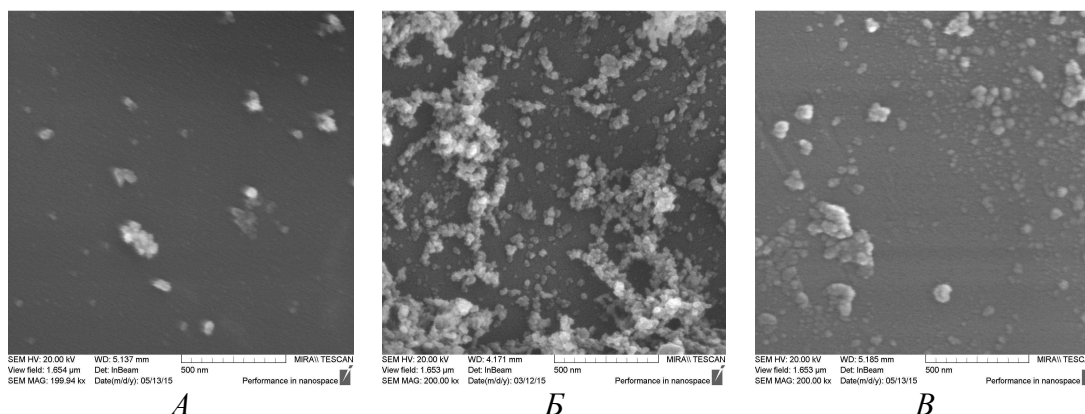
замещенного ГА (дисперсность до 90 мкм, дистанция напыления 50 мм, ток дуги плазмотрона 300 А).

Исследование ИК-спектров, замещенных ГА порошков проводилось с применением Фурье-спектрометра FT-801 в интервале волновых чисел 500...4000 см<sup>-1</sup>, таблетки с КВг. По итогам анализа ИК-спектров, замещенных ГА установлено, что образцы порошков в основном соответствует образцу синтетического ГА.

На рисунке 1 представлена сканирующая электронная микроскопия плазмонапыленных покрытий на основе порошков, замещенных ГА. На поверхности частиц преимущественно округлой формы имеются скопления наночастиц различных размеров. Так, для напыленных порошков Mg-ГА и Si-ГА выявлены редкие частицы размерами порядка 40-50 нм, собранные в агломераты размерами до 200 нм. Для плазмонапыленных цинк-, медь, сереброзамещенных ГА покрытий характерно большое скопление наночастиц округлой формы размерами около 50 нм.

В качестве основной группы применены комбинации гидроксиапатита с наночастицами меди, серебра, магния и цинка (№1 - Cu-ГА, №3 – Ag-ГА, №4 – Mg-ГА, №6 – Zn-ГА). В качестве группы сравнения выбраны образцы ГА без примесей (№5) и с включением наночастиц кремния (№2 – Si-ГА), заведомо не обладающие антимикробной активностью. В эксперименте использованы образцы в виде порошка и в виде покрытия, нанесенного на пластины из медицинского титана, размерами 5x5x2 мм.

В качестве основной группы применены комбинации гидроксиапатита с наночастицами меди, серебра, магния и цинка (№1 - Cu-ГА, №3 – Ag-ГА, №4 – Mg-ГА, №6 – Zn-ГА). В качестве группы сравнения выбраны образцы ГА без примесей (№5) и с включением наночастиц кремния (№2 – Si-ГА), заведомо не обладающие антимикробной активностью. В эксперименте использованы образцы в виде порошка и в виде покрытия, нанесенного на пластины из медицинского титана, размерами 5x5x2 мм.



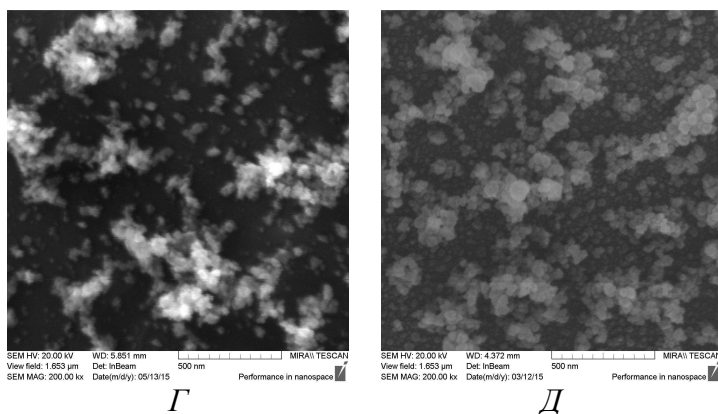


Рис.1. Сканирующая электронная микроскопия плазмонапыленных покрытий на основе порошков, замещенных ГА: А) Mg-ГА; Б) Zn-ГА; В) Si-ГА; Г) Cu-ГА; Д) Ag-ГА.

Микробиологическое исследование образцов с различными типами напыления проводилось на базе отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Саратовский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России.

Для изучения антимикробных свойств различных типов напыления были получены суточные культуры штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных от пациентов с инфекционными осложнениями после эндопротезирования крупных суставов.

Полный перечень штаммов микроорганизмов, использованных при исследовании антимикробных свойств образцов приведён в таблице 1.

Таблица 1

Штаммы микроорганизмов, использованных в работе

Обозначение	Название	Источник получения
АТСС 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> АТСС 25923	Типовой штамм (музейный)
131	<i>Staphylococcus aureus</i> 131	Раневое отделяемое
139	<i>Staphylococcus aureus</i> 139	Раневое отделяемое
149	<i>Staphylococcus aureus</i> 149	Раневое отделяемое
150	<i>Staphylococcus aureus</i> 150	Раневое отделяемое
161	<i>Staphylococcus aureus</i> 161	Раневое отделяемое
168	<i>Staphylococcus aureus</i> 168	Раневое отделяемое
169	<i>Staphylococcus aureus</i> 169	Раневое отделяемое
173	<i>Staphylococcus aureus</i> 173	Раневое отделяемое
241	<i>Staphylococcus aureus</i> 241	Раневое отделяемое
237	<i>Staphylococcus aureus</i> 237	Раневое отделяемое
237/14	<i>Staphylococcus aureus</i> 237/14	Раневое отделяемое
237/15	<i>Staphylococcus aureus</i> 237/15	Раневое отделяемое

Штаммы стафилококков выращивали на плотных питательных средах (5%-й кровяной агар «HiMedia», Индия) при 37 °С в течение 1-2 суток. Используемые в работе штаммы по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам являлись типичными представителями вида *Staphylococcus aureus*.

Учитывая то, что бактерии рода *Staphylococcus* относятся к агентам IV группы патогенности, работа с ними проводилась в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность

работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных инфекций».

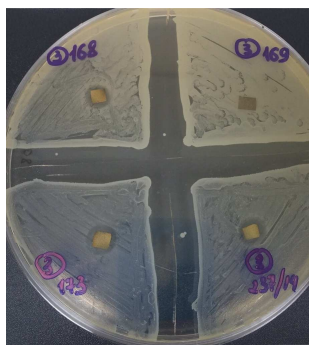
Определение чувствительности бактерий к антимикробному воздействию образцов с напылением проводили на пластинах агара Мюллер-Хинтон («Himedia», Индия) и в пробирках с сахарным бульоном (МПБ + 0,2 % глюкозы). Для посева на чашки из суточных бактериальных культур готовили бактериальные взвеси в 0,15 М NaCl (рН 7,0). Для стандартизации бактериальных взвесей использовали нефелометр Densi La METER («Erba Lachema», Чехия). Полученные взвеси соответствовали мутности 0,5 по Мак-Фарланду. Перед внесением микроорганизмов в бульон добавляли навеску соответствующего образца (50 мг). После получения суспензии в бульон вносили 100 мкл бактериальной взвеси. Инкубацию проводили при температуре 37 °С в течение 24 часов. В качестве отрицательного контроля использовали пробирки с суспензией образца без добавления бактериальной взвеси.

Аликвоты бактериальных взвесей наносили на поверхность агара и растирали по всей поверхности стерильным L-образным шпателем. Посевы подсушивали и помещали на их поверхность с помощью прокалённого над пламенем спиртовки пинцета образцы титановых пластин и нанесенных на них покрытий ГА с наночастицам различных веществ. В пробирки с сахарным бульоном вносили 0,1 мл суспензии бактерий, куда также помещали образцы.

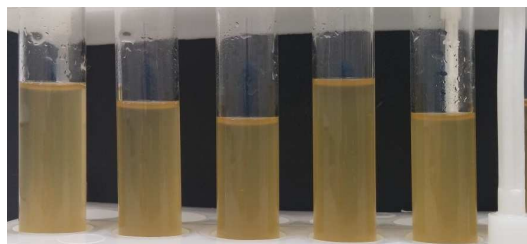
Чашки и пробирки с образцами помещали в термостат для инкубации при 37°С в течение одних суток. Учёт результатов образцов в виде напыления на титановые пластины производили через 20 - 24 ч путём учёта наличия зоны задержки роста в чашках с агаром и видимого изменения мутности в бульонных культурах. По окончании инкубации для визуализации антибактериальной активности образцов в виде порошка проводили высеивание из пробирок с бульоном на чашки с 5%-м кровяным агаром. Результаты оценивали через 20 - 24 ч путём учёта различий количества выросших колоний на чашках с агаром.

**Результаты.** Результаты исследования материалов, напыленных на титановые пластины.

В результате проведённых наблюдений выявлена чувствительность большинства исследуемых штаммов *Staphylococcus aureus* к антимикробному действию образца с напылением Ag-ГА при росте на плотных питательных средах (рис. 2А), в отношении бульонной культуры подобный эффект не регистрировался. Напыление Zn-ГА в 50% случаев также демонстрировало антибактериальную активность в отношении данных микроорганизмов как при инкубации на агаре, так и в бульоне – визуально отмечалась большая прозрачность бактериальной взвеси с этим образцом по сравнению с другими (рис.2Б).



А



Б

Рис.2. Примеры антимикробного действия образцов напыления: А) Зоны задержки роста вокруг образцов на среде Мюллер-Хинтон; Б) Суточная бульонная культура (сахарный бульон): визуально – меньшая мутность в пробирке с образцом № 6.

Полученные результаты изучения воздействия образцов с напылением на штаммы золотистого стафилококка отражены в табл. 2.

Таблица 2

Наличие зоны задержки роста

ШТАММ	ОБРАЗЕЦ					
	№1 Cu-ГА	№2 Si-ГА	№3 Ag-ГА	№4 Mg-ГА	№5 ГА	№6 Zn-ГА
<i>S.aureus</i> 139	-	-	+	-	-	+
<i>S.aureus</i> 150	-	-	+	-	-	-
<i>S.aureus</i> 168	-	-	+	-	-	-
<i>S.aureus</i> 169	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i> 173	-	-	+	-	-	+
<i>S.aureus</i> 237/14	-	-	+	-	-	+/-
<i>S.aureus</i> 237/15	-	-	-	-	-	+/-
<i>S.aureus</i> 237/15 (бульонная культура)	-	-	-	-	-	+/-
Отрицательный контроль	0	0	0	0	0	0

Результаты исследования материалов в виде порошка.

Посевы из пробирок с образцом Ag ГА демонстрировали скудный рост колоний бактерий в сравнении со сплошным ростом на чашках с другими образцами. На основании данного наблюдения можно судить о проявлении антибактериальной активности этого образца в отношении *Staphylococcus aureus*. На чашках с «отрицательными контролями» роста бактерий выявлено не было (рис. 3).



А



Б

Рис. 3. Типы роста *St. aureus*: А) «скудный» - слева, «единичные колонии» - справа; Б) «сплошной рост»

В результате проведенного эксперимента выявлена чувствительность большинства исследуемых штаммов *Staphylococcus aureus* к антимикробному действию образца с напылением AgГА при росте в сахарном бульоне с суспензией образца.

Полученные результаты изучения воздействия образцов порошков на штаммы золотистого стафилококка отражены в таблице 3.

**Таблица 3**

Результаты посева на плотные питательные среды бульонной культуры после суточной инкубации с суспензией образца

	Результат (инкубация 24 часа)		
	образец		
Штаммы <i>Staphylococcus aureus</i>	Cu-ГА	Si-ГА	Ag-ГА
АТСС 25923	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
131	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
139	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
149	сплошной рост	сплошной рост	скудный рост
150	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
161	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
168	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
173	сплошной рост	сплошной рост	скудный рост
241	сплошной рост	сплошной рост	скудный рост
237	сплошной рост	сплошной рост	единичные колонии
отрицательный контроль	отсутствие роста	отсутствие роста	отсутствие роста
	Результат (инкубация 24 часа)		
	образец		
Штаммы <i>Staphylococcus aureus</i>	Mg-ГА	Zn-ГА	ГА
АТСС 25923	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
131	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
139	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
149	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
150	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
161	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
168	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
173	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
241	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
237	сплошной рост	сплошной рост	сплошной рост
отрицательный контроль	отсутствие роста	отсутствие роста	отсутствие роста

**Заключение.** Изготовление принципиально новых конструкций на основе различных материалов с нанесением на их поверхность биокомпозиционных покрытий различной толщины, состава и пористости, способных обеспечить контролируемую доставку антимикробного агента в параимплантарные ткани, является перспективным направлением

научно-исследовательской работы, результаты которой найдут применение не только в травматологии и ортопедии.

Решением рассматриваемой проблемы является применение электрофизических (плазменные, лазерные, ультразвуковые, ионно-лучевые) и электрохимических технологий формирования наноструктурированных биокерамических покрытий с заданными структурно-морфологическими и физико-химическими характеристиками. Высокая эффективность полученных материалов в лечении перипротезной инфекции может быть обеспечена импрегнацией пористой структуры сформированной пространственной конструкции активными субстанциями биологического и синтетического происхождения, которые будут доставляться в прилежащие ткани в течение заданного периода времени.

Немаловажное значение имеет создание методологии индивидуального подбора конструкции и структуры поверхности имплантатов для замещения дефектов костной ткани различной этиологии и формы. Помимо этого в составе покрытий могут использоваться металлами замещенные гидроксиапатиты (Cu, Zn и Ag-содержащие) и бемит (минерал из класса гидроокислов с химической формулой  $\gamma\text{-AlO}(\text{OH})$ ), которые отличаются повышенной бактерицидной активностью. Усиление бактерицидного эффекта также возможно за счет дополнительного введения в состав материала химиопрепарата с направленным антимикробным действием в зависимости от этиологии возбудителя у конкретного пациента.

Не смотря на значительную роль *St. aureus* и *St. epidermidis* в развитии имплантат-ассоциированной инфекции, всегда необходима предварительная верификация возбудителя с определением его чувствительности к антибиотикам для определения антимикробного препарата выбора при изготовлении спейсеров, что вместе с дебридментом полости сустава обеспечит эффективную деконтаминацию раны.

### Список литературы

1. Ефименко Н.А., Грицук А.А., Серeda А.П. и др. Профилактика инфекций области хирургического вмешательства в травматологии и ортопедии: использование антибиотика в костном цементе // Инфекции в хирургии. – 2009. – №2. – С. 15-27
2. Исследование биосовместимости и антибактериальных свойств *in vivo* серебросодержащего трикальцийфосфата / Хон В.Э., Загородний Н.В., Мамонов В.Е. [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии имени Н.Н.Приорова. – 2014. – № 3. – С. 56 – 61.
3. Комлев В.С., Баринов С.М., Фадеева И.В. Пористые керамические гранулы из гидроксиапатита для системы доставки лекарственных препаратов // Новые технологии – 21 век. – 2001. – № 5. – С.18–19.



4. Куропаткин Г.В., Ахтямов И.Ф. Костный цемент в травматологии и ортопедии: 2-е изд. доп. и перераб. Казань: Издательство «ТаГраф», 2014. 188 с.: илл.
5. Спейсер коленного сустава / Ахтямов И.Ф., Кудрявцев А.И., Гильмутдинов И.Ш., Загидуллин М.В. // Патент РФ №136702. 2014. Бюл. №2.
6. Comparison of articulating versus static antibiotic laden cement spacers in two-staged knee revision arthroplasty for sepsis / Jagiello J.M. [et all.] //Proceedings to 2007 EFFORT. Florence.
7. Copper and silver ion implantation of aluminium oxide-blasted titanium surfaces: proliferative response of osteoblasts and antibacterial effects. / Fiedler J., Kolitsch A., Kleffner B. [et all.] // Int. J. Artif. Organs. 2011. Vol. 34(9). P.882-888.
8. Kanazawa T. Inorganic phosphate materials. Amsterdam: Elsevier Science. 1989. 298 p.
9. Silver Ion-doped Calcium Phosphate-based Ceramic Nanopowder-coated Prosthesis Increased Infection Resistance / Kose N., Otuzbir A., Peksen C. [et all.] // Clin. Orthop. Relat. Res. 2013. Vol. 471(8). P.2532-2539.
10. Vancomycin bound to Ti rods reduces periprosthetic infection: preliminary study / Antoci V.Jr., Adams C.S., Hickok N.J. [et all.] // Clin. Orthop. Relat. Res. 2007. Vol. 461. P. 88-95.

**Рецензенты:**

Павленко Н.Н., д.м.н., ведущий научный сотрудник Отдела инновационных проектов в травматологии и ортопедии ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, г. Саратов;

Богатов В.Б., д.м.н., старший научный сотрудник Отдела инновационных проектов в травматологии и ортопедии ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, г. Саратов.