

УДК 579.842.1/2 +579.61:616.34-002

СОЗДАНИЕ АПАТИТ-АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПОЗИТНОГО ПОКРЫТИЯ НА ТИТАНОВОМ СУБСТРАТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОДЕПОЗИТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Суходуб Л.Б., Волянский А.Ю., Осолодченко Т.П.,
Кучма И.Ю.,
Волков А.А., Мизин В.В.

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины»

Введение

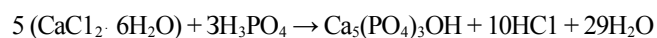
Биоматериалы помогают восполнять утраченные функции органов и играют важную роль в жизнедеятельности человека. Для их создания и внедрения в практику требуется совместная работа медиков, биологов, химиков, инженеров. В качестве материалов для имплантации в медицине давно применяются металлические изделия, а с 50-х годов XX века – различные титановые сплавы. Несмотря на многочисленные примеры изготовления имплантатов из полимерных материалов, металлические протезы продолжают занимать лидирующее положение в медицинской практике. Общеизвестно, что нет полностью биоинертных материалов, так как любой материал вступает во взаимодействие с окружающей средой. Поэтому вопрос биологической совместимости особенно актуален и решается путем образования необходимого интерфейса между поверхностью имплантата и тканью.

В данной работе поверхность модельного имплантата - титановой пластины - была покрыта биологически-активным веществом - гидроксилapatитом (ГАП), который обеспечивает биосовместимость - близкое к природному соединению с окружающей тканью. ГАП - хорошо адсорбирующий материал. Кроме того, высокоразвитая поверхность покрытия, вследствие его пористости, способствует дальнейшему увеличению его биологической активности путем иммобилизации на поверхности биомолекул, а для обеспечения антибактериальной функции покрытия - соответствующих лекарственных препаратов. В качестве последних были выбраны антисептики, в частности, декаметоксин (Д) и этоний (Э), которые хорошо себя зарекомендовали в медицинской практике различного профиля. Данные лекарственные препараты обладают выраженными антибактериальными свойствами в отношении широкого спектра возбудителей инфекционных заболеваний, растворимы в воде, доступны и экономичны, практически не вызывают побочных эффектов (аллергических реакций).

Материалы и методы

Получение покрытий из гидроксилapatита на Ti субстрате

Нанесение биологически активного покрытия на титановую пластину было выполнено методом термоактивируемой депозиции кальциевых и фосфатных ионов из водного раствора с образованием апатитной фазы (ГАП или другого кальций-фосфатного соединения). Базовая схема установки соответствует предложенной японскими учеными Куродой и др. [1,2]. Дополнительно нами была изготовлена охлаждающая система с целью стабилизации температурного градиента между узкой областью вокруг титановой пластины и объемом раствора [3,4]. Также, параллельно экспериментальному был установлен контрольный сосуд с дистиллированной водой и чистой (без покрытия) титановой пластиной для точного измерения температуры с помощью хромо-никелевой термопары. Оба стакана (экспериментальный и контрольный) были погружены в общий сосуд с дистиллированной водой и находились в непосредственном контакте с охлаждающей системой. Для поддержания одинаковой температуры во всем объеме была использована электрическая мешалка. Нанесение кальций-фосфатного покрытия производилось из водного раствора фосфорной кислоты и хлористого кальция (молярное соотношение Ca/P = 1,67; pH = 6,5). Температура на поверхности пластины регулировалась путем пропускания переменного тока. Время осаждения составляло 20-30 минут. Реакция синтеза гидроксилapatита проходила по следующей схеме:



Известно, что растворимость ГАП в водном растворе уменьшается с повышением температуры [5]. При низких температурах (5-40°C) и pH 3.7-6.7 растворимость рассчитывали по формуле

$$\log K_s = -8219.41/T - 1.6657 - 0.098215 T$$

где K_s - константа растворимости, T - температура (K)

Величина K_s для ГАП является максимальной при 16°C, а дальнейший нагрев водного раствора с Ca^{2+} и PO_4^{3-} при соответствующем pH дает осадок апатита на субстрате.

2.2. Получение апатит-антибактериального композитного слоя на покрытии

В работе использовали две методики. Согласно первой методике две титановые пластины с нанесенным покрытием (экспериментальная и контрольная) стерилизовали в автоклаве под давлением 1 атм и температуре 132 °C в течение 30 минут. После стерилизации экспериментальную пластину выдерживали в течение 4 часов в растворах декаметоксина (этония) с концентраций 1,0 %, 0,1 % и 0,01 % и высушивали, а контрольная пластина оставалась без контакта с лекарственным веществом. Согласно второй методике 4 пластины, покрытые пленкой ГАП, стерилизовали в автоклаве под давле-

нием 1 атм и температуре 132 °С, после чего 3 из них выдерживали в растворе декаметоксина с концентрацией соответственно 1,0 %, 0,1 % и 0,01 % в течение 4 часов. Одна пластина (контрольная) контакту с лекарственным препаратом не подвергалась.

Фазовый анализ полученных покрытий

Структурно-морфологические характеристики образцов покрытий были исследованы с помощью рентгеновской дифракции (XRD), световой и сканирующей электронной микроскопии. Фазовый состав кальций-фосфатных образцов определялся на основе сравнительного анализа полученных дифрактограмм с табличными величинами согласно базе данных JCPDS [6]. Рентгено-структурные импульсы накапливались при изменении угла дифракции 2θ в интервале от 5° до 65° с шагом 0.02° и временем измерения 1 сек/шаг. Генерация рентгеновского излучения Cu-K α проводилась с использованием медной трубки (ток 30 мА, напряжение 40 кВ).

Исследование антибактериальных свойств полученных композитов

При использовании первой методики обе пластины помещались в питательный бульон, предварительно засеянный соответствующей тест-культурой микроорганизма. Посевная доза микроорганизмов составляла 10^5 микроб.кл./мл, которую устанавливали по стандарту мутности Марк-Фарленду. Микроорганизмы выращивали на питательных средах производства Махачкалинского завода питательных сред (срок годности питательных сред до XII. 2009), посеvy инкубировали в термостате или при комнатной температуре в зависимости от вида микроорганизмов. Питательные среды готовились в соответствии с требованиями изготовителя (процентная концентрация, pH, условия автоклавирования и т.д.). Каждая серия перед использованием в эксперименте проверялась на ростовые свойства согласно нормативным документам. Для подтверждения чистоты культур их рассеивали на селективные среды [8]. Растворы декаметоксина (Д) и этония (Э) использовали в следующих процентных концентрациях: 1,0 %; 0,1 %; 0,01 %; 0,001 %. Учет результатов проводили через 1, 3, 5 суток. Количество микроорганизмов определяли по Голду (из пробирок с пластинами делали посеvy на питательный агар). Из бульона пластину вынимали стерильным пинцетом и прикладывали в определенный сектор агара на чашки Петри. Из этого сектора делали

рассевы по всей поверхности агара. Для сравнения результатов использовали контрольную пластину, которая не подвергалась контакту с декаметоксином или этонием, и питательный бульон, инокулированный тест-микроорганизмами. В качестве тест-микроорганизмов использовали следующие культуры:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
2. *Escherichia coli* ATCC 25922;
3. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
4. *Candida albicans* ATCC 885/653

Согласно второй методике все 4 пластины были помещены в чашки Петри, засеянные культурой микроорганизма *S.aureus* ATCC 25923. Посевная доза микроорганизма составила 10^7 КОЕ/мл. Подготовка питательной среды и установление посевной дозы происходило в описанном выше порядке. Результаты антибактериального действия композита ГАП + лекарственный препарат приведены на фотографиях через 1 сутки контакта пластин с бактериальной средой.

Результаты и обсуждение

Структурные исследования покрытий

Рентгендифрактограммы Ca-P покрытий на титановом субстрате, полученных при температурах (а) - 104 °С; (б) - 65 °С; (в) - 40 °С и времени осаждения от 30 до 60 минут показали, что главной фазой полученных покрытий при относительно высоких температурах является ГАП. Дальнейшее снижение температуры субстрата до 40 °С при температуре раствора 10 °С существенно меняет фазовый состав покрытий: доминирующей фазой является высококристаллический брусит ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Рис.1) [3].

Однако и в условиях пониженной температуры субстрата, в соответствующем рентгеновском спектре (Рис.2) присутствуют слабые пики, которые соответствуют низкокристаллическому гидроксилapatиту. 3.2. Антибактериальные свойства ГАП-Д и ГАП-Э композитных слоев.

В результате проведенных исследований было установлено, что после контакта пластин с 1,0 %-ным раствором декаметоксина и этония рост микроорганизмов не был зарегистрирован в течение 3 суток. На пятые сутки в растворе с декаметоксином отмечался рост синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) и грибов (*Candida albicans*) до 10 КОЕ/мл. Рост стафилококков (*Staphylococcus aureus*) и кишечной палочки (*Escherichia coli*) не наблюдался.

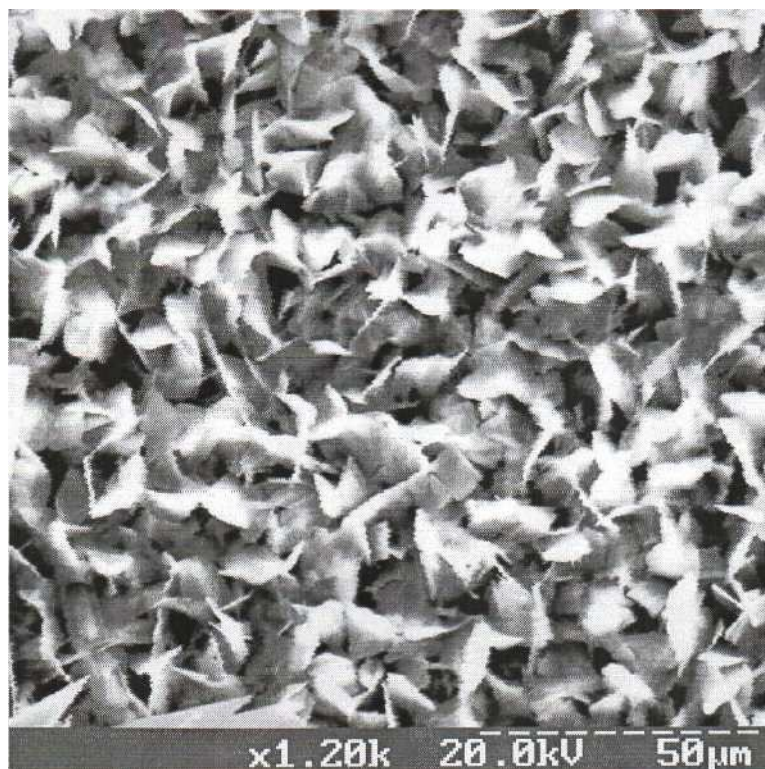


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение покрытия, полученного методом термодепозиции при температуре субстрата 40 °С.

В растворе с этонием на 5 сутки отмечали незначительный рост (10 КОЕ/мл) всех тест-микроорганизмов. В пробирке с контрольной пластиной количество микроорганизмов постепенно увеличивалось с 10^4 КОЕ/мл через 1 сутки до 10^6 КОЕ/мл через 5 суток, что указывает на постепенную колонизацию микроорганизмов на поверхности гидроксилалатитного покрытия. В случае обработки покрытия 0,1 % раствором декаметоксина рост микроорганизмов (синегнойная палочка и дрожжеподобные грибы) наблюдался только на 5-е сутки. Соответствующий по концентрации раствор этония показал рост всех тест-штаммов после третьих суток. На пятые сутки количество *P.aeruginosa* и *Candida albicans* достигало 10^4 КОЕ/мл.

При применении 0,01 % растворов лекарственных препаратов рост микроорганизмов не отмечали только у стафилококка и кишечной палочки в первые сутки контакта.

В случае 0,00 1% раствора препаратов отмечали рост всех микроорганизмов после суток контакта. На пятые сутки количество выделенных микроорганизмов на экспериментальной и контрольной пластинах было одинаковым. Результаты исследований степени роста микроорганизмов после контакта с 0,1 % и 0,01 % раствором декаметоксина приведены в таблице 1 и на Рис. 2.1 и 2.2, а с 0,1 и 0,01% раствором этония - в таблице 2 и на Рис.3.1 и 3.2.

Таблица 1. Степень роста микроорганизмов после контакта пластины с декаметоксином

Экспозиция	Концентрация препарата, %	Степень роста микроорганизмов КОЕ/мл (lg) M±m p<0,05			
		<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida albicans</i> 885/653
1-е сутки	0,1	X	X	X	X
	0,01	X	X	1,9±0,2	1,5±0,2
3-е сутки	0,1	X	X	2,9±0,4	1,6±0,2
	0,01	2,1±0,2	1,6±0,1	2,7±0,2	2,5±0,3
5-е сутки	0,1	1,7±0,1	1,8±0,2	4,5±0,4	3,9±0,2
	0,01	3,2±0,3	2,7±0,3	5,3±0,5	5,4±0,4

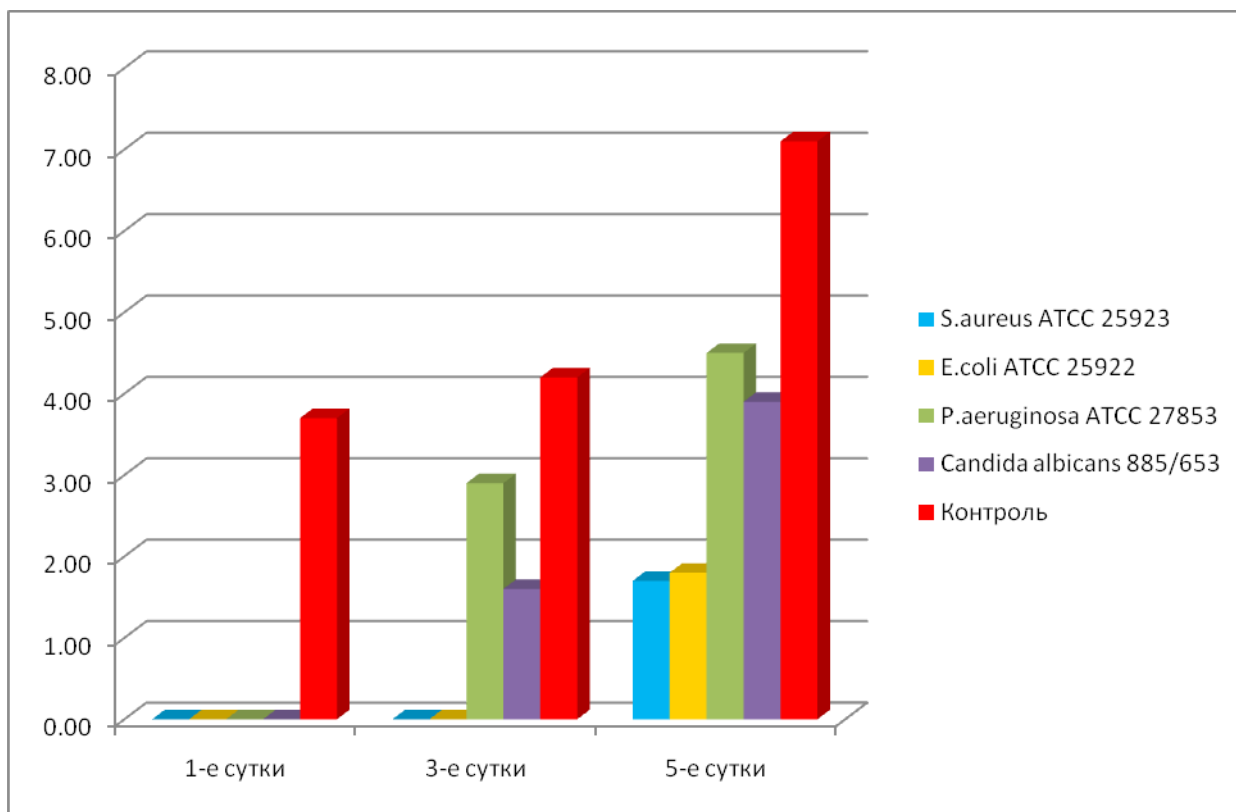


Рисунок 2.1 Степень роста микроорганизмов после контакта пластины с 0.1% Д

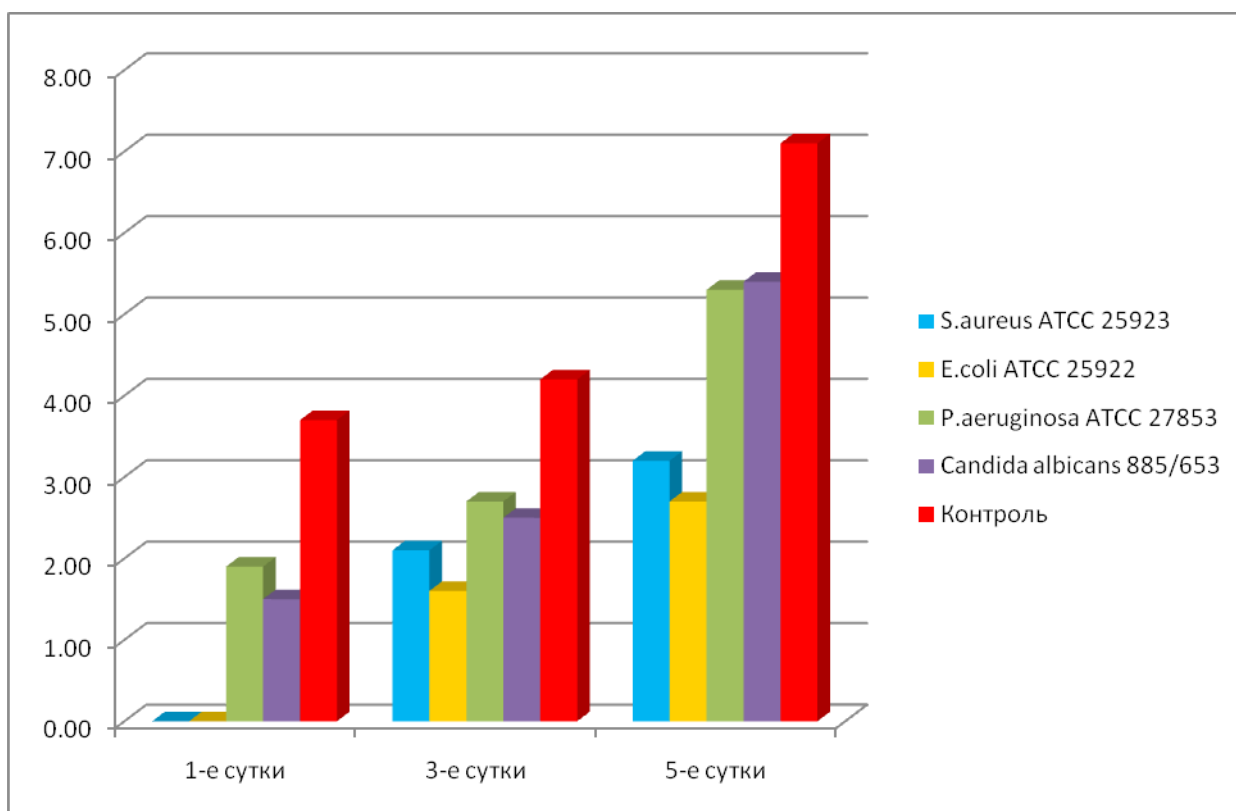


Рисунок 2.2 Степень роста микроорганизмов после контакта пластины с 0.01% Д

Таблица 2. Степень роста микроорганизмов после контакта пластины с этинием

Экспозиция	Концентрация препарата, %	Степень роста микроорганизмов КОЕ/мл (lg) M±m p<0,05			
		S.aureus ATCC 25923	E.coli ATCC 25922	P.aeruginosa ATCC 27853	Candida albicans 885/653
1-е сутки	0,1	X	X	X	X
	0,01	1,4±0,2	X	2,7±0,2	X
3-е сутки	0,1	2,2±0,2	1,9±0,2	3,1±0,2	3,6±0,2
	0,01	3,2±0,2	3,6±0,2	4,5±0,2	4,1±0,2
5-е сутки	0,1	3,5±0,2	2,8±0,2	4,6±0,2	4,1±0,2
	0,01	4,6±0,2	4,6±0,2	6,8±0,2	5,9±0,2

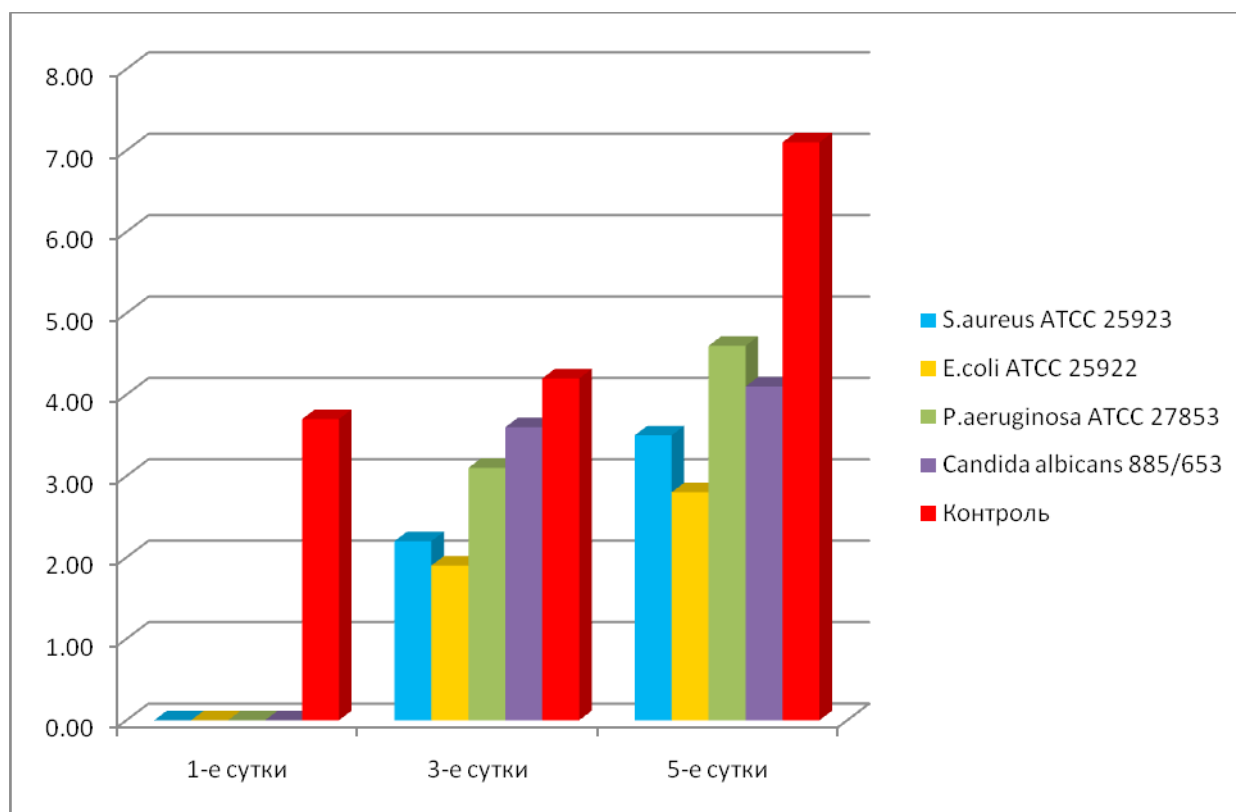


Рисунок 3.1 Степень роста микроорганизмов после контакта пластины с 0.1% Э

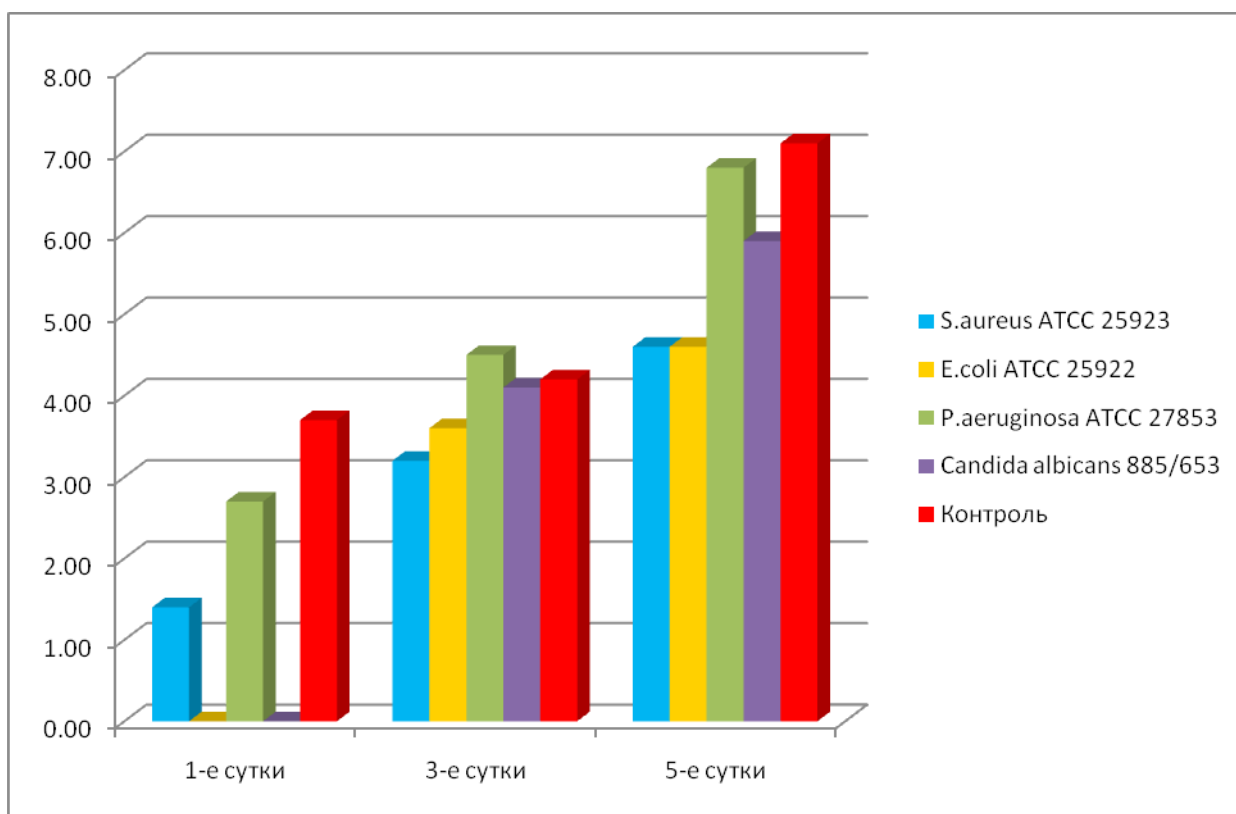


Рисунок 3.2 Степень роста микроорганизмов после контакта пластины с 0,01% Э

Таблица 3. Степень роста микроорганизмов на пластине с гидроксилалатитным покрытием без лекарственных препаратов после ее контакта с микроорганизмами (контрольная пластина)

Экспозиция	Степень роста микроорганизмов КОЕ/мл (lg) M+m p<0,05			
	S.aureus ATCC 25923	E.coli ATCC 25922	P.aeruginosa ATCC 27853	Candida albicans 885/653
1-е сутки	3,7±0,2	3,7±0,2	3,7±0,2	3,7±0,2
3-й сутки	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2
5-е сутки	7,1±0,2	7,1±0,2	7,1±0,2	7,1±0,2

При исследовании титановых пластин с нанесенным композитным покрытием ГАП+Д, показали, что на поверхности агара через сутки вокруг пластины наблюдался рост *S.aureus* по всей поверхности (Рис.4)

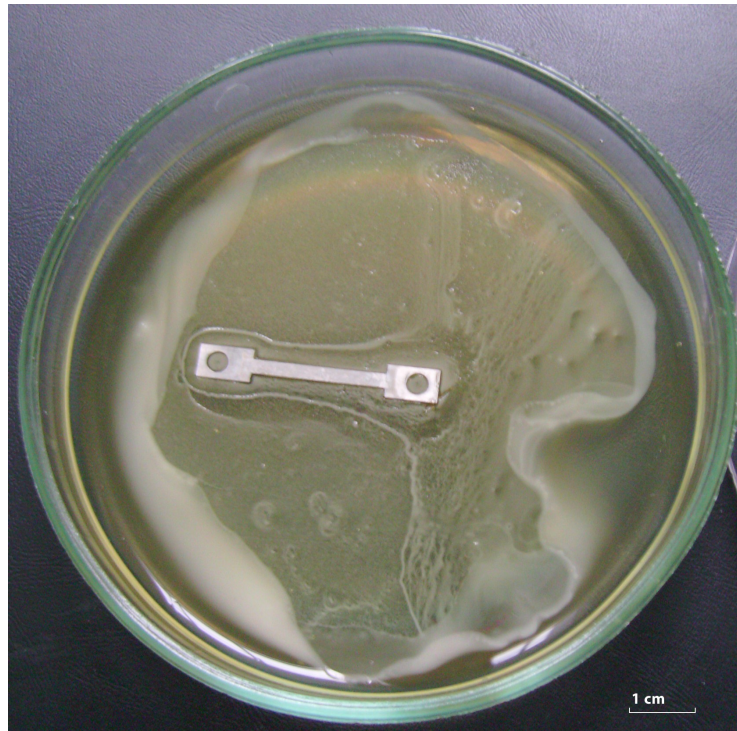


Рис.4. Контрольная пластина на питательном агаре с *S.aureus*

Вокруг пластины с композитом ГАП+ 1% Д рост микроорганизмов не наблюдался (Рис.5)

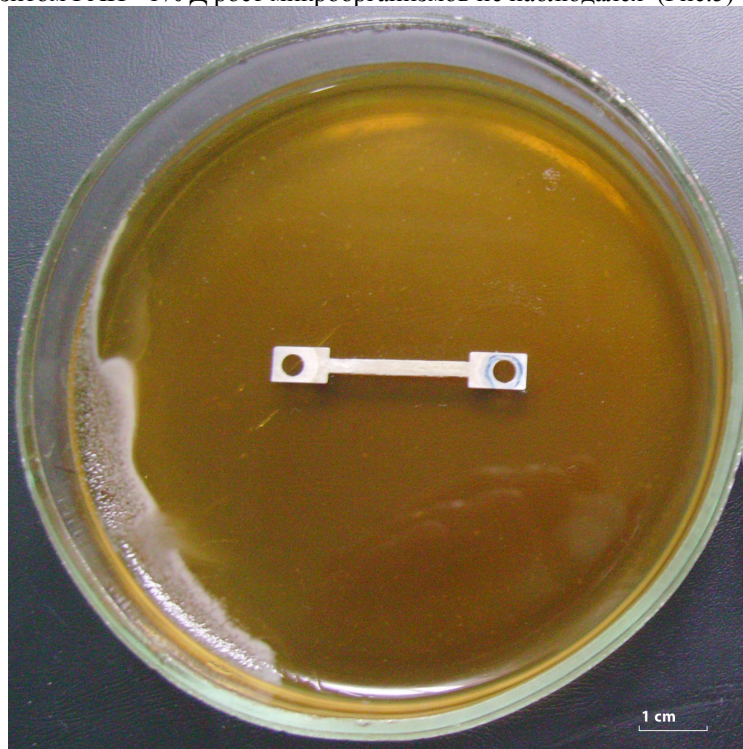


Рис. 5. Пластина с композитом ГАП+1% Д на питательном агаре с *S.aureus*.

Диаметры зон задержки роста в отношении *S.aureus* композитом ГАП+ 0,1 % Д составляли от 45 до 55 мм вокруг пластины (Рис.6).

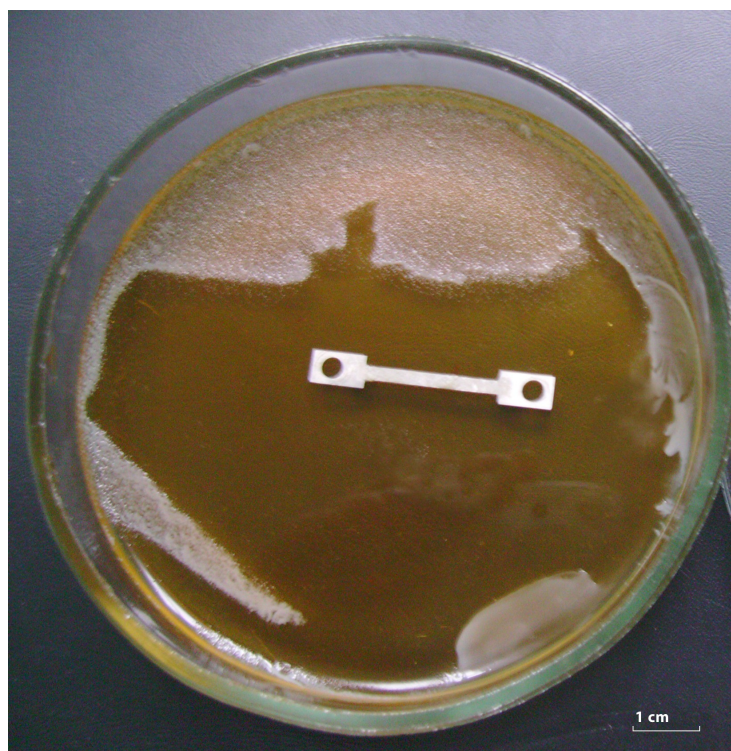


Рис. 6. Пластина с композитом ГАП+0,1 % Д на питательном агаре с *S.aureus*

Диаметры зон задержки роста при исследовании композита ГАП+0,01 % Д в отношении *S.aureus* составляли 10 до 20 мм вокруг пластины (Рис.7)

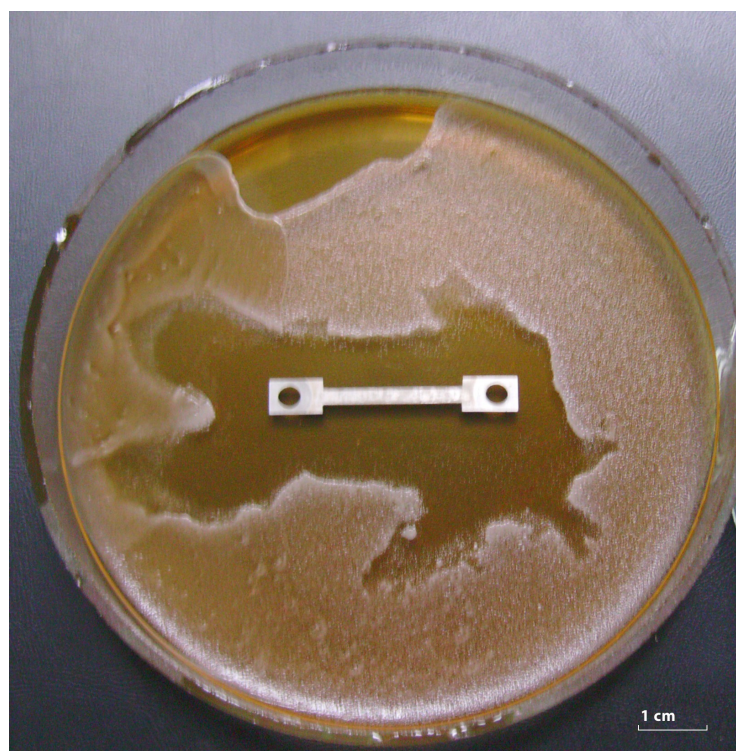


Рис. 7. Пластина с композитом ГАП+0,01 % Д на питательном агаре с *S.aureus*

Выводы

Полученные результаты показывают, что предложенная в работе методика получения апатит-антибактериального композитного покрытия на титановом субстрате, полученного с использованием термодепозитной технологии и исследована на антибактериальную активность, является эф-

фективной и предполагает перспективность дальнейших исследований.

Антибактериальный эффект зависит как от концентрации иммобилизованных на поверхности покрытия препаратов декаметоксина или этония, так и их сродства к апатитной поверхности. Для придания композиту ГАП+лекарственный препарат пролонгированного (до 5 дней) антибактериального действия в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, апатитное покрытие необходимо обра-

ботать 0,1% раствором Д. Применение препарата этония при тех же концентрациях гарантирует антибактериальный срок действия композита до трех дней в отношении не только *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*, но и *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Список литературы

1. Kuroda K., R. Ichino, M. Okido, O. Tokai, Hydroxyapatite coatings on titanium by thermal substrate method in aqueous solution, *J.Biomed.Mater.Res.*-2002, 59, 390-397.
2. Kuroda, R. Ichino, M. Tokai, Effect of ion concentration and pH on hydroxyapatite deposition from aqueous solution onto titanium by the thermal substrate method, *J.Biomed.Mat.Res.*-2002,61,353-359.
3. Sukhodub L.B., С Moseke, L.F. Sukhodub, V.V. Pilipenko, B. Sulkio-Cleff, Improved thermal substrate method with cooling system for hydroxyapatite coatings on titanium substrates, Annual report 2002/2003 Institut fur Kernphysik Westfalische Wilhelms-universitat Muenster, 86-88.
4. Voliansky Yu.L. , B. Sulkio-Cleff, V.V. Pilipenko, L.B. Sukhodub, L.F. Sukhodub, Hydroxyapatite deposition from aqueous solution onto TiAlV and TiAlV covered with collagen by the thermal substrate method, *Анали Мечниковського Інституту*,2006,3,35-38.
5. Elliott J.C., Structures and chemistry of the apatite and other calcium orthophosphates, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo-1994
6. JCPDS - International Center for Diffraction Data Powder 1990; diffraction file: 1-40.
7. Каталог культур: Бактерії. Мікоплазми. Хламідії. Дріжджоподібні гриби. Міцеліальні гриби. Культури клітин / Сельнікова О.П., Мавров І.І., Бощенко Ю.А. та інш., -Київ: Знання, 2000.- 119с.
8. Методическое указание по применению унифицированных микробиологических методов исследования в клинико-диагностических лабораториях. Приказ № 535 от 22.04.1985 МЗ СССР.
9. Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций. Харків -1991.-14С.
10. Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцер А.А., Ленцер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // *Лаб. дело.*-1986.-№4.-С.210-212.

УДК 579.842.1/2 +579.61:616.34-002

СОЗДАНИЕ АПАТИТ-АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПОЗИТНОГО ПОКРЫТИЯ НА ТИТАНОВОМ СУБСТРАТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОДЕПОЗИТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Суходуб Л.Б., Волянський А.Ю., Осолодченко Т.П., Кучма І.Ю., Волков А.А., Мизин В.В.

Изучены апатит-противомикробные композитные покрытия на титановом субстрате, полученном с использованием термодепозитной технологии. Изучена противомикробная активность 4 титановых пластин в отношении референтных штаммов стафилококков, кишечной палочки, псевдомонад и кандид. Доказано, что этоний и декаметоксин в достаточном количестве сорбируется на поверхности титанового композита, что придает структуре пролонгованную противомикробную активность.

Ключевые слова: апатит, титан, этоний, декаметоксин, референтные микробы, активность.

УДК 579.842.1/2 +579.61:616.34-002

СТВОРІННЯ АПАТИТ-ПРОТИМІКРОБНІ КОМПОЗИТНІ ПОКРИТТЯ НА ТИТАНОВОМУ СУБСТРАТІ З ВИКОРИСТАННЯМ ТЕРМОДЕПОЗИТНОЇ ТЕХНОЛОГІЇ

Суходуб Л.Б., Волянський А.Ю., Осолодченко Т.П., Кучма І.Ю., Волков А.О., Мизин В.В.

Вивчено апатит-протимікробні композитні покриття на титановому субстраті, отриманому з використанням термодепозитної технології. Досліджено протимікробну активність 4 титанових пластин щодо референтних штамів стафілококів, кишкової палички, псевдомонад і кандид. Доведено, що етоній і декаметоксин в достатній кількості сорбується на поверхні титанового композиту, що надає структурі пролонговану протимікробну активність.

Ключові слова: апатит, титан, етоній, декаметоксин, референтні микробы, активність.

UDC 579.842.1/2 +579.61:616.34-002

CREATION APATITE-ANTIBACTERIAL OF A COMPOSITE COVERING ON TITANIC SUBSTRATE WITH USE OF THERMODEPOSITARY TECHNOLOGY

Sukhodub L.B., Volyanskiy A.Yu., Osolodchenko T.P., Kuchma I.Yu., Volkov A.A., Mizin V.V.

Apatite-antimicrobial composite coverings on the titanic substrate obtained by thermodepositary technology have been studied. Antimicrobial activity of 4 titanic plates against referential strains of *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* and *Candida* has been studied. It has been proved, that aethonium and decamethoxinum in enough quantity is sorbed on a surface of a titanic composite that attacks to structure prolonged antimicrobial activity.

Key words: apatite, the titan, aethonium, decamethoxinum, referential microbes, activity.