

УДК 617.3; 616–089.23; 616–001; 615.477.2; 616–089.28/29
EDN: KJEYCW
<https://doi.org/10.15275/ssmj1904351>

Оригинальная статья

АНТИБИОПЛЕНОЧНЫЕ СВОЙСТВА ПРОТОТИПОВ ТОНКОПЛЕНОЧНЫХ ПОКРЫТИЙ ДЛЯ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ ИМПЛАНТАТОВ ИЗ ТИТАНА И ЕГО СПЛАВОВ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА МЕДИ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

В. Ю. Ульянов, С. Я. Пичхидзе, Ю. Ю. Рожкова, М. В. Горякин

ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава России, Саратов, Россия

ANTIBIOFILM PROPERTIES OF THE PROTOTYPES OF THIN-FILM COATINGS WITH COPPER OXIDE NANOPARTICLES FOR ORTHOPEDIC TITANIUM AND TITANIUM ALLOY IMPLANTS: AN EXPERIMENTAL STUDY

V. Yu. Ulyanov, S. Ya. Pichkhidze, Yu. Yu. Rozhkova, M. V. Goryakin

Saratov State Medical University, Saratov, Russia

Для цитирования: Ульянов В. Ю., Пичхидзе С. Я., Рожкова Ю. Ю., Горякин М. В. Антибиопленочные свойства прототипов тонкопленочных покрытий для ортопедических имплантатов из титана и его сплавов, содержащих наночастицы оксида меди: экспериментальное исследование. Саратовский научно-медицинский журнал. 2023; 19 (4): 351–357. EDN: KJEYCW. DOI: <https://doi.org/10.15275/ssmj1904351>

Аннотация. Цель: оценить бактериостатические свойства разработанных прототипов тонкопленочных покрытий для ортопедических имплантатов из титана и его сплавов. **Материал и методы.** Методом сканирующей электронной микроскопии изучали морфологию образцов, состоящих из Ti-6AL-4V, ASTM F1472 с нанесенным на их поверхность методом микродугового оксидирования пленочным покрытием, содержащим наночастицы CuO с дисперсностью 50–70 нм. Оценивали влияние прототипов тонкопленочного покрытия на склонность клинических штаммов микроорганизмов к адгезии, способность их к биопленкообразованию и ростовые свойства. **Результаты.** Разработанный прототип тонкопленочного покрытия вызывает значимое уменьшение массы биопленок, сформированных клиническими штаммами микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* на 11%, *Staphylococcus epidermidis* — на 38%, *Pseudomonas aeruginosa* — на 7%), и снижение их ростовых свойств (*S. aureus* — на 12,7%, *S. epidermidis* — на 13,3% и *P. aeruginosa* — на 10%). **Заключение.** Разработанный прототип тонкопленочного покрытия в составе изделий из титана и его сплавов снижает факторы патогенности клинических штаммов микроорганизмов за счет выраженного бактериостатического действия, снижения адгезивной активности и ингибирования способности к образованию биопленок.

Ключевые слова: прототипирование, тонкопленочные покрытия, наночастицы оксида меди, имплантат ортопедический

For citation: Ulyanov VYu, Pichkhidze SYa, Rozhkova YuYu, Goryakin MV. Antibiofilm properties of the prototypes of thin-film coatings with copper oxide nanoparticles for orthopedic titanium and titanium alloy implants: An experimental study. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2023; 19 (4): 351–357. EDN: KJEYCW. DOI: <https://doi.org/10.15275/ssmj1904351> (In Russ.)

Abstract. Objective: at the assessment of bacteriostatic properties of the thin-film coating prototypes meant for orthopedic titanium and titanium alloys implants. **Material and methods.** The morphology of the Ti-6AL-4V, ASTM F1472 samples with the 50–70 nm thin-film CuO coating deposited on their surfaces with microarc oxidation was examined by scanning electron microscopy. Then we evaluated the effects of the thin-film prototypes on the clinical strains ability to adhere, form biofilms and their growth properties. **Results.** The newly designed prototype causes the significant decrease in the mass of biofilms pre-formed by the clinical strains (*Staphylococcus aureus* by 11%, *Staphylococcus epidermidis* by 38%, and *Pseudomonas aeruginosa* by 7%) and inhibits their growth properties (*S. aureus* by 12.7%, *S. epidermidis* by 13.3%, and *P. aeruginosa* by 10%). **Conclusion.** This thin-film coating prototype on the surfaces of the titanium and titanium alloys implants decreases pathogenic factors in the microorganism clinical strains due to its pronounced bacteriostatic effect, slowdown in adhesive activity and inhibition of their ability to form biofilms.

Keywords: prototyping, thin-film coatings, copper oxide nanoparticles, orthopedic implant

Введение. Абиотическая поверхность ортопедических имплантатов на основе титана и его сплавов может становиться реальным субстратом для формирования микробных биопленок, чему способствуют местные условия операционной раны, формируемой при проведении первичного хирургического вмешательства, а также реакция перипротезных тканей на металлоконструкцию. Именно по этой причине в современном материаловедении (металловедении), в том числе медицинском, трендом является создание покрытий с универсальными бактериостатическими свойствами для всех клинически значимых штаммов микроорганизмов, включая полиантибиотикорезистентные и панрезистентные штаммы

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, а также *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. При этом бактериостатические свойства покрытий, обусловленные их морфологией и физико-химическими свойствами, должны действовать в течение всего времени пребывания имплантата в организме, предупреждать колонизацию микробных биопленок и не разрушаться, постепенно высвобождая активные компоненты в перипротезные ткани [1].

Для получения бактериостатических покрытий ортопедических имплантатов используются различные способы, включая пассивную обработку абиотической поверхности с антиадгезивными свойствами с возможной последующей элюцией антимикробных препаратов или созданием биodeградируемых покрытий, что обеспечивает временный эффект. С целью реализации пролонгированного антимикробного воздействия поверхности ортопедических

Ответственный автор — Владимир Юрьевич Ульянов
Corresponding author — Vladimir Yu. Ulyanov
Тел.: +7 (917) 2140870
E-mail: v.u.ulyanov@gmail.com

имплантатов физически или химически модифицируют с целью изменения кристаллической фазы оксидов металлов, образующихся в виде новых слоев. Новая морфология этих покрытий, не влияя на остеоинтеграцию, может обеспечивать снижение микробной колонизации [2, 3].

Перспективным направлением разработок в области медицинского материаловедения и борьбы с биопленкообразованием в настоящее время является применение CuO для так называемого контактного уничтожения (contact killing) микроорганизмов на поверхностях, в том числе создание поверхностных нанокомпозитных покрытий на основе аморфной пленки, включающей наночастицы Cu , наносимой на покрытия из титана Ti через источник кластеров газовой агрегации. Описано также, что на поверхностях из полиэтилена с алмазоподобным углеродным покрытием, выполненным из Cu , противомикробный эффект был более выраженным, чем на таком же покрытии, не содержащим Cu [4]. Описывается также наличие бактериостатического эффекта тонких пленок Ti-Cu , сочетающееся с ростом остеобластических клеток [5]. Все эти покрытия обладают выраженными бактериостатическими свойствами и не вызывают цитотоксичности [6].

Для еще большего повышения антимикробной активности покрытий из сплава Ti-Cu используется ультразвуковое микродуговое окисление, оказывающее, по данным литературы, бактерицидное воздействие более чем на 99% клинических штаммов *Staphylococcus spp.* Существуют также покрытия из Ti и его сплавов, в том числе содержащие CuO , полученные методом электрохимического оксидирования. Последний метод является трудоемким и времязатратным, а формируемое таким образом покрытие может содержать токсичные серосодержащие примеси [7].

Таким образом, разработка тонкопленочных покрытий для ортопедических имплантатов на основе наночастиц CuO с пролонгированными сроками биоцидного воздействия на абиотические поверхности и перипротезные ткани, а также оценка их бактериостатических и антибиопленочных свойств является перспективным направлением для травматологии и ортопедии.

Цель — оценить бактериостатические свойства разработанных прототипов тонкопленочных покрытий для ортопедических имплантатов из титана и его сплавов.

Материал и методы. Материалом для исследования стали тонкопленочные покрытия, содержащие в составе однокислотные порошки биоцидных наночастиц CuO , которые изготовлены в соответствии с сертификатом, разработанным ООО «Передовые порошковые технологии» (г. Томск, Россия) согласно ТУ 1791-003-36280340-2008, и предназначены для нанесения на ортопедические имплантаты, выполненные из титана и его сплавов. Паспорт безопасности CuO соответствует директиве Европейского сообщества 91/155, производителем и поставщиком наночастиц является ООО «Передовые порошковые технологии». В составе тонкопленочного покрытия также были использованы N-ацетилцистеин (АЦЦ) и химотрипсин (ХС) в качестве компонентов, уменьшающих бактериальную адгезию и способствующих разрушению матрикса биопленок (заявка на выдачу патента РФ №2023117375, вход №W23037127 от 30.06.2023, выдан Федеральной службой

по интеллектуальной собственности ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности»).

Тонкопленочное покрытие формировали поэтапно путем предварительной пескоструйной обработки поверхности металлической подложки частицами алюминия с фракцией 150–400 мкм; очистки от технологических загрязнений в водном растворе поверхностно-активных веществ с использованием ультразвуковой ванны; микродугового оксидирования в анодном режиме при плотностях тока 2–2,5×103 А/м² продолжительностью 30 мин в водном щелочном электролите, содержащем 3–4 г/л NaOH с добавлением в него 10 мас.% CuO при комнатной температуре и барботаже воздуха в пузырьковом режиме при скорости 0,1–0,4 м/с; сушки покрытия и равномерного нагрева подложки в сушильном шкафу при температуре 600°C в течение 30 мин с принудительной конвекцией.

Толщину слоев покрытий прототипов определяли с помощью настольного сканирующего электронного микроскопа EXlорer (Aspex Corp., США) (РегистрИнформ, №13908, организация: Саратовский государственный технический университет им. Гагарина Ю.А.) в программе анализа геометрических параметров микрообъектов Metallograph.

Бактериостатические свойства прототипа покрытия, нанесенного на изделие, выполненное из титана и его сплавов Ti6Al-4V , ASTM F1472 и имеющего поверхностный слой, представленный композицией, состоящей из 5% водного раствора поливинилпирролидона, содержащей активное действующее вещество в виде 0,5 мас.% наночастиц CuO с дисперсностью 50–70 нм, а также АЦЦ — 0,3 мас.% и ХС — 0,01 мас.%, исследовали на примере образцов, полученных механически с помощью пробойника. Для этого из пластин размером 11×19 мм формировали диски диаметром 10 мм, толщиной 2 мм и весом 0,016±0,001 г. Изучали также бактериостатические свойства отдельных компонентов прототипа покрытия, а именно наночастицы CuO (1), АЦЦ (2), ХС (3).

Объект исследования составили 65 клинических штаммов микроорганизмов, возбудителей перипротезной инфекции (ППИ) в том числе 15 — *S. epidermidis*, 15 — *S. aureus*, 20 — *P. aeruginosa* и 15 — *E. coli*, выделенных у 60 пациентов обоего пола в возрасте 63,8±4,6 года, проходивших лечение в НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России в связи с осложнениями, связанными с внутренними ортопедическими протезными устройствами, имплантатами и трансплантатами (Т84 по Международной классификации болезней 10-го пересмотра). Идентификация выделенных штаммов проведена при помощи микробиологического анализатора BBL Auto Reader (Becton Dickinson, США). В качестве группы сравнения использовали референсные штаммы *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) и *E. coli* (ATCC 25922) из коллекции Becton Dickinson, США.

Чувствительность клинических и референс-штаммов к исследуемым образцам изучали в модификации стандартного диско-диффузионного метода в соответствии с МУК 4.2.1890–04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», принимая во внимание последние рекомендации Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) [8]. Располагая диски равноудаленно друг

от друга в чашках Петри, содержащих инокулированный исследуемыми штаммами Mueller — Hinton agar (Becton Dickinson, США), измеряли зоны задержки роста, вычисляя средние значения для 20 измерений в трех сериях экспериментов.

Особенности влияния исследуемых образцов изделия на адгезивные свойства микроорганизмов и кинетику формирования ими биопленок изучали согласно методологии, предложенной G. D. Christensen и соавт. [9]. Исходный раствор содержал концентрацию элементов, соответствующую 1 мг/мл.

Формирование моновидовых микробных биопленок осуществляли в статичных условиях в стерильных полистироловых 96-луночных планшетах (Медполимер, Россия, регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Планшет полистироловый для иммуноферментного анализа по ТУ 9398-058-00480230-2009» от 13.05.2019 г. №РЗН 2015/2665). Результаты оценивали с учетом МР 4.2.0161–19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах».

Использовали 18-часовые суспензии бактериальной культуры клинических изолятов и референсных штаммов 5×10^6 КОЕ/мл, эквивалентные 0,5 по стандарту МакФарланда в ГРМ-бульоне с глюкозой, которые в дальнейшем использовали также в качестве положительного контроля. Стерильный ГРМ-бульон использовали в качестве отрицательного контроля.

Элементы покрытия, содержащиеся в ГРМ-бульоне, смешивали с бактериальной суспензией в стерильных пробирках, после чего вносили по 150 мкл в лунки полистиролового планшета и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Контрольные лунки не содержали бактериальной взвеси. Затем планшеты промывали 3 раза 0,9% раствором натрия хлорида, после чего в каждую из лунок добавляли 0,1% водный раствор генцианового фиолетового красителя, оставляя его на 30 мин при температуре 22–25°C. После трехкратного промывания лунок планшета 0,9% раствором натрия хлорида в каждую из них вносили по 200 мкл 95° этилового спирта на 30 мин. По окончании инкубации проводили измерение оптической плотности (ОП) полученных элюатов кристаллического фиолетового красителя на спектрофотометре Erosch (BioTech, США, регистрационное удостоверение от 03.11.2010 №ФСЗ 2010/08269) при длине волны 620 нм и представляя полученные результаты в виде условных единиц ОП.

Ростовые свойства штаммов микроорганизмов изучали после 60-минутной инкубации бактериальной

суспензии с элементами покрытия в той же концентрации по последующим высевом на твердые среды и инкубацией при 37°C в течение 24 ч, подсчитывая КОЕ/мл.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 12.0. Проверку вариационных рядов на нормальность распределения выполняли по критерию Шапиро — Уилка и Колмогорова — Смирнова. Распределение значений толщины слоев покрытия соответствовало нормальному, значения представляли в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, SD — стандартное отклонение. Характеристики бактериостатических свойств покрытия не соответствовали закону о нормальном распределении, в связи с чем данные указывали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха 25 и 75%. Для сравнения результатов применяли непараметрический U -критерий Манна — Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$, что соответствует требованиям, предъявляемым к медико-биологическим исследованиям.

Результаты. Прототип тонкопленочного покрытия формировали поэтапно путем предварительной пескоструйной обработки поверхности металлической подложки частицами алюминия с фракцией 150–400 мкм; очистки от технологических загрязнений в водном растворе поверхностно-активных веществ с использованием ультразвуковой ванны; микродугового оксидирования в анодном режиме при плотностях тока $2\text{--}2,5 \times 10^3$ А/м² продолжительностью 30 мин в водном щелочном электролите, содержащем 3–4 г/л NaOH с добавлением в него 10 мас.% CuO при комнатной температуре и барботаже воздуха в пузырьковом режиме при скорости 0,1–0,4 м/с; сушки покрытия и равномерного нагрева подложки в сушильном шкафу при температуре 600°C в течение 30 мин с принудительной конвекцией. При осуществлении измерений толщины слоев покрытий прототипов методом сканирующей электронной микроскопии для них были определены следующие значения: для TiO_2 — 6 ± 1 мкм, TiO_2 и CuO — 6 ± 1 мкм.

При изучении бактериостатических свойств отдельных компонентов прототипа тонкопленочного покрытия в отношении референсных штаммов установлено, что максимальные значения диаметров зон подавления роста были достигнуты при применении вариантов тонкопленочного покрытия, включавшего в себя наночастицы CuO, стабилизированные поливинилпирролидоном (табл. 1).

Таблица 1

Диаметр зон подавления роста референсных штаммов микроорганизмов прототипом тонкопленочного покрытия и отдельными его компонентами, мм

Вариант покрытия	Состав покрытия/ референсный штамм	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
1	CuO	13 (12; 13)	14 (13; 14)	14 (13; 14)	9 (9,0; 10,0)
2	АЦЦ	4 (3; 4) $*p_{1-2}=0,00034$	5 (4; 5) $*p_{1-2}=0,00078$	4 (4; 5) $*p_{1-2}=0,00062$	1 (1; 1) $*p_{1-2}=0,00078$
3	ХТ	4 (3; 4) $p_{1-3}=0,0039$	4 (3; 4) $p_{1-3}=0,0017$	3 (2; 3) $p_{1-3}=0,0017$	4 (3; 4) $p_{1-3}=0,0039$
4	CuO+АЦЦ+ХТ	12 (11; 12) $p_{2-4}=0,0090$ $p_{3-4}=0,0017$	12 (11; 12) $p_{2-4}=0,00078$ $p_{3-4}=0,0028$	13 (13; 14) $p_{2-4}=0,00073$ $p_{3-4}=0,0021$	10 (10; 11) $p_{2-4}=0,00068$ $p_{3-4}=0,0049$

Примечание: результаты представлены в виде медианы (Me), 25 и 75% квартилей; $*p$ — уровень статистической значимости между бактериостатическим действием различных компонентов прототипа тонкопленочного покрытия и референсными штаммами микроорганизмов при $p < 0,05$.

Зоны подавления роста у референс-штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* и *E. coli* при использовании полнокомпонентного прототипа тонкопленочного покрытия были несколько менее выражены, чем при применении варианта покрытия, содержащего лишь CuO и поливинилпирролидон, однако различия не достигали уровня статистической значимости.

Особенности бактериостатического действия прототипа полнокомпонентного тонкопленочного покрытия в отношении клинических штаммов представлены в табл. 2.

Как следует из полученных результатов, наночастицы CuO оказывали бактериостатическое действие на клинические штаммы бактерий.

Влияние прототипа покрытия на адгезивные свойства и биопленкообразование референсных

и клинических штаммов имело ряд особенностей (табл. 3).

Способность к пленкообразованию среди референсных штаммов микроорганизмов была более выражена у *S. aureus* ATCC 25923 по сравнению с *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, а у *S. epidermidis* ATCC 12228 превышала таковую у *P. aeruginosa* ATCC 27853. Различия отмечали между клиническими штаммами *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

Проведение инкубации исследуемых штаммов с прототипом тонкопленочного покрытия приводила к ингибированию способности к адгезии и формированию биопленок (табл. 4).

Согласно полученным результатам инкубация клинических штаммов с прототипом тонкопленочного покрытия приводила к значимому снижению

Таблица 2

Диаметр зон подавления роста клинических штаммов микроорганизмов прототипом тонкопленочного покрытия и отдельными его компонентами, мм

Вариант покрытия	Компонент покрытия/клинические штаммы	<i>S. aureus</i> n=15	<i>S. epidermidis</i> n=15	<i>E. coli</i> n=15	<i>P. aeruginosa</i> n=20
1	CuO	13 (12; 13)	13 (13; 14)	14 (14; 15)	10 (9,0; 10,0)
2	АЦЦ	3 (2; 3) $*p_{1-2}=0,0039$	4 (3; 4) $*p_{1-2}=0,0039$	4 (4; 4) $*p_{1-2}=0,0018$	2 (1; 2) $*p_{1-2}<0,00042$
3	ХТ	3 (3; 4) $*p_{1-3}=0,0018$	5 (4; 5) $*p_{1-3}=0,0040$	3 (2; 3) $*p_{1-3}=0,00078$	2 (2; 3) $*p_{1-3}=0,00078$
4	CuO+АЦЦ+ХТ	16 (15; 16) $*p_{2-4}=0,00078$ $p_{3-4}=0,0008$	15 (15; 15) $*p_{2-4}=0,0018$ $p_{3-4}=0,0017$	13 (12; 13) $*p_{2-4}=0,00078$ $*p_{3-4}=0,0061$	14 (14; 15) $*p_{2-4}=0,00035$ $*p_{3-4}=0,00058$

Примечание: результаты представлены в виде медианы (Me), 25 и 75% квартилей; *p — уровень статистической значимости различия между влиянием отдельных компонентов прототипа тонкопленочного покрытия на клинические изоляты возбудителей ППИ при $p<0,05$.

Таблица 3

Уровни оптической плотности генцианового фиолетового красителя клинических и референсных штаммов микроорганизмов до воздействия на них прототипа тонкопленочного покрытия, у. е.

Виды штаммов	Значения ОП генцианового фиолетового красителя, у. е.	Уровень p
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,091 (0,089; 0,091)	—
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,088 (0,079; 0,092)	$p_{1-2}=0,712$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,084 (0,073; 0,089)	$p_{1-3}=0,694$ $p_{2-3}=0,911$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,071 (0,066; 0,073)	$*p_{1-4}=0,045$ $*p_{2-4}=0,047$ $*p_{3-4}=0,049$
<i>S. aureus</i> клинические	0,604 (0,565; 0,683)	$*p_{1-5}=0,0039$ $*p_{2-5}=0,00077$ $*p_{3-5}=0,00068$ $*p_{4-5}=0,00051$
<i>S. epidermidis</i> клинические	0,578 (0,564; 0,599)	$*p_{1-6}=0,0044$ $*p_{2-6}=0,00089$ $*p_{3-6}=0,00074$ $*p_{4-6}=0,00062$
<i>E. coli</i> клинические	0,584 (0,561; 0,596)	$*p_{1-7}=0,0055$ $*p_{2-7}=0,00096$ $*p_{3-7}=0,00082$ $*p_{4-7}=0,00070$
<i>P. aeruginosa</i> клинические	0,473 (0,441; 0,535)	$*p_{1-8}=0,00084$ $*p_{2-8}=0,00024$ $*p_{3-8}=0,00035$ $*p_{4-8}=0,00041$ $*p_{5-8}=0,039$

Примечание: результаты представлены в виде медианы (Me), 25 и 75% квартилей; *p — уровень статистической значимости различий адгезивных свойств и способности к образованию бактериальных биопленок между референсными штаммами и клиническими изолятами возбудителей ППИ при $p<0,05$.

адгезивных свойств и способности к образованию биопленок следующими клиническими штаммами: *S. aureus* на 10,6%), *S. epidermidis* — на 37,9% и *P. aeruginosa* — на 6,8%.

60-минутное воздействие компонентов прототипа тонкопленочного покрытия на исследуемые штаммы микроорганизмов оказывало ингибирующее действие на их ростовые свойства, что подтверждалось

при последующем высеве на твердые питательные среды (табл. 5).

Прототип тонкопленочного покрытия ингибировал рост референсных штаммов микроорганизмов *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 на 6,6; 22,5 и 7,3% соответственно, а также снижал ростовые способности *S. aureus* — на 12,7%, *S. epidermidis* — на 13,3% и *P. aeruginosa* — на 6,3%.

Таблица 4

Уровни оптической плотности генцианового фиолетового красителя после завершения инкубации клинических и референсных штаммов микроорганизмов с прототипом полнокомпонентного тонкопленочного покрытия, у. е.

Виды штаммов	Значения ОП генцианового фиолетового красителя, у. е.	Уровень p
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,086 (0,082; 0,090)	—
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,083 (0,076; 0,089)	$p_{1-2}=0,865$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,073 (0,069; 0,080)	$p_{1-3}=0,794$ $p_{2-3}=0,780$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,071 (0,066; 0,073)	$p_{1-4}=0,034$ $p_{2-4}=0,042$ $p_{3-4}=0,047$
<i>S. aureus</i> клинические	0,546 (0,528; 0,567)	$*p_{1-5}=0,00035$ $*p_{2-5}=0,00029$ $*p_{3-5}=0,000088$ $*p_{4-5}=0,000070$
<i>S. epidermidis</i> клинические	0,419 (0,385; 0,462)	$*p_{1-6}=0,00054$ $*p_{2-6}=0,00042$ $*p_{3-6}=0,00017$ $*p_{4-6}=0,00011$
<i>E. coli</i> клинические	0,560 (0,521; 0,578)	$*p_{1-7}=0,00022$ $*p_{2-7}=0,00014$ $*p_{3-7}=0,000065$ $*p_{4-7}=0,000051$
<i>P. aeruginosa</i> клинические	0,443 (0,417; 0,468)	$*p_{1-8}=0,00050$ $*p_{2-8}=0,00037$ $*p_{3-8}=0,00010$ $*p_{4-8}=0,00006$

Примечание: результаты представлены в виде медианы (Me), 25 и 75% квартилей; $*p$ — уровень статистической значимости различий адгезивных свойств способности к образованию бактериальных биопленок между референсными штаммами и клиническими изолятами при $p<0,05$.

Таблица 5

Влияние прототипа полнокомпонентного тонкопленочного покрытия на ростовые свойства референс-штаммов и клинических изолятов-возбудителей ППИ, КОЕ/мл

Штамм/варианты опыта	До воздействия	После воздействия прототипа тонкопленочного покрытия
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2119 (2017; 2165)	1988 (1964; 1990) $*p=0,0035$
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2014 (1973; 2028)	1824 (1792; 1980) $p=0,079$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1216 (1182; 1234)	992 (976; 1000) $*p=0,0039$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1228 (1201; 1256)	1139 (1113; 1155) $*p=0,015$
<i>S. aureus</i> клинические	2241 (2227; 2269)	1988 (1964; 2001) $*p=0,0078$
<i>S. epidermidis</i> клинические	2113 (1985; 2134)	1865 (1841; 1904) $*p=0,0019$
<i>E. coli</i> клинические	1276 (1259; 1292)	1219 (1185; 1263) $p=0,822$
<i>P. aeruginosa</i> клинические	1249 (1217; 1277)	1174 (1159; 1188) $*p=0,0042$

Примечание: результаты представлены в виде медианы (Me), 25 и 75% квартилей; $*p$ — уровень статистической значимости различий ростовых свойств референс-штаммов микроорганизмов и клинических изолятов возбудителей ППИ до и после воздействия прототипа тонкопленочного покрытия при $p<0,05$.

Обсуждение. Основным материалом выбора при изготовлении имплантатов является титан, обладающий необходимыми прочностными свойствами, стойкостью к коррозии и высокой биосовместимостью [10].

Возрастающая частота случаев развития послеоперационных инфекционных осложнений при имплантации металлоконструкций способствует развитию направления исследований, связанных с разработкой модификации их поверхности путем нанесения различных препаратов с широким антимикробным спектром, что призвано существенно повысить срок «выживаемости» имплантатов [11–13].

Сложность разработки подходов к профилактике и лечению ППИ обусловлена формированием на границе взаимодействия абиотической и биотической сред в зоне имплантации бактериальных биопленок, в отношении которых традиционные методы воздействия демонстрируют сравнительно низкую эффективность [14, 15].

Изученные нами клинические изоляты возбудителей инфекционных процессов, полученные от пациентов ортопедического профиля, проявляли усиленные адгезивные свойства по отношению к абиотическим поверхностям, а также повышенную кинетику нарастания биопленки по сравнению с аналогичными референсными штаммами, о чем сообщают и другие исследователи [16].

Перспективным направлением исследований является применение нанотехнологий с адресной доставкой лекарств с программируемым высвобождением активных компонентов [17]. Известна аддитивная технология лазерного спекания сплава Ti_3Al_2V с использованием 10 мас.% Ta (10Ta) и 3 мас.% Cu (3Cu), что повышает бактериостатическую активность изделия на 78–86% по отношению к *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Доказана эффективность данной разработки в эксперименте на крысах с переломом бедренной кости, осложненном инфекционным процессом [18].

При проведении нашего исследования были подтверждены бактериостатические свойства разработанных изделий из титана и его сплава с нанесенным на его поверхность тонкопленочным покрытием, содержащим наночастицы оксида меди с дисперсностью 50–70 нм по отношению к клиническому изолятам *S. aureus*, *S. epidermidis* и *P. aeruginosa*.

G. Karabulut и соавт. в 2023 г. также применили наночастицы CuO с аналогичной дисперсностью с целью обеспечения бактериостатического эффекта медицинских изделий, выполненных из нержавеющей стали, и сообщили о положительных результатах эксперимента [19].

Разработанный нами прототип тонкопленочного покрытия позволил добиться ингибирующего влияния на адгезивные свойства и способность к формированию биопленок клиническими штаммами *S. aureus*, *S. epidermidis* и *P. aeruginosa*, полученными от пациентов ортопедического профиля, что подтверждает перспективность разработки подходов к его внедрению в клиническую практику.

Заключение. Разработанный прототип тонкопленочного покрытия в составе изделий из титана и его сплавов снижает факторы патогенности клинических штаммов микроорганизмов за счет выраженного бактериостатического действия и адгезивной активности, а также ингибирования способности к образованию биопленок.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка средств, эффективных в отношении пленкообразующих микроорганизмов при лечении инфекционных осложнений эндопротезирования суставов», номер государственной регистрации НИОКТР 121032300172–2.

References (Список источников)

1. Kuzmin II, Isaeva MP. The problem of infectious complications in joint replacement. Vladivostok: Dalnauka, 2006; 123 p. (In Russ.) Кузьмин И.И., Исаева М.П. Проблема инфекционных осложнений в эндопротезировании суставов. Владивосток: Дальнаука, 2006; 123 с.
2. Del Curto B, Brunella MF, Giordano C, et al. Decreased bacterial adhesion to surface-treated titanium. Int J Artif Organs. 2005; 28 (7): 718–30. DOI:10.1177/0391398805028007114
3. Hu J, Li H, Wang X, et al. Effect of ultrasonic micro-arc oxidation on the antibacterial properties and cell biocompatibility of Ti-Cu alloy for biomedical application. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2020; (115): 110921. DOI:10.1016/j.msec.2020.110921
4. Parvizi J. Periprosthetic joint infection: Could bearing surface play a role? CeraNews. 2014; (1): 11–2.
5. Stranak V, Rebl H, Wulff H, et al. Deposition of thin titanium-copper films with antimicrobial effect by advanced magnetron sputtering methods. Mat Sci Eng. 2011; 31 (7): 1512–9. DOI: 10.1016/j.msec.2011.06.009
6. Mamonova IA, Matasov MD, Babushkina IV, et al. Study of physical properties and biological activity of copper nanoparticles. Nanotechnologies in Russia. 2013; 8 (5-6): 25–9. (In Russ.) Мамонова И.А., Матасов М.Д., Бабушкина И.В. и др. Изучение физических свойств и биологической активности наночастиц меди. Российские нанотехнологии. 2013; 8 (5-6): 25–9.
7. Balgazarov S, Ramazanov Z, Abilov R, et al. Copper and silver plated implants for periprosthetic knee infection. Traumatology and Orthopaedics of Kazakhstan. 2021; 56 (1): 43–7. (In Russ.) Балгазаров С.С., Рамазанов Ж.К., Абилов Р.С., и др. Применение имплантов с напылением медью и серебром при перипротезной инфекции коленного сустава. Травматология и ортопедия Казахстана. 2021; 56 (1): 43–7.
8. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985; 22 (6): 996–1006. DOI:10.1128/jcm.22.6.996–1006
9. Breakpoint of MIC and diameters of growth inhibition zones for interpretation of sensitivity findings (version 13.0). URL: [\(https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/\(25 Sept 2023\)\)](https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/(25%20Sept%202023)) (In Russ.) Пограничные значения МПК и диаметров зон подавления роста для интерпретации результатов определения чувствительности (версия 13.0). URL: [\(https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/\(дата обращения: 25.09.2023\)\)](https://www.antibiotic.ru/library/eucast-eucast-clinical-breakpoints-bacteria-13-0-rus/(дата%20обращения%2025.09.2023))
10. Spriano S, Yamaguchi S, Bairo F, Ferraris S. A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. Acta Biomater. 2018; (79): 1–22. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.08.013
11. Liventsov VN, Bozhkova SA, Kochish AY, et al. Difficult-to-treat periprosthetic hip infection: Outcomes of debridement. Traumatology and Orthopaedics of Russia. 2019; 25 (4): 88–97. (In Russ.) Ливенцов В.Н., Божкова С.А., Кочиш А.Ю., Артюх В.А., Разоренов В.Л., Лабутин Д.В. Трудноизлечимая перипротезная инфекция тазобедренного сустава: результаты санитизирующих операций. Травматология и ортопедия России. 2019; 25 (4): 88–97. DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-4-88-97
12. Matveeva EL, Gasanova AG, Spirikina ES, et al. Hematological markers of periprosthetic joint infection after revision total hip arthroplasty. Genij Ortopedii. 2023; 29 (5): 512–7. (In Russ.) Матвеева Е.Л., Гасанова А.Г., Спиркина Е.С. и др. Гематологические маркеры перипротезной инфекции при ревизионном эндопротезировании тазобедренного

сустава. Гений ортопедии. 2023; 29 (5): 512–7. DOI:10.18019/1028-4427-2023-29-5-512-517

13. Plakunov VK, Martyanov SV, Teteneva NA, Zhurina MV. Controlling of microbial biofilms formation: Anti- and probiofilm agents. Microbiology. 2017; 86 (4): 402–20. (In Russ.) Плакунов В. К., Мартянов С. В., Тетенева Н. А., Журина М. В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты. 2017; 86 (4): 402–20.

14. Shabunin AV, Arakelov SE, Dubrov VE, et al. The direction of increasing effectiveness of the treatment of periprosthetic joint infection. Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ". Rehabilitation, Doctor and Health. 2023; 13 (5): 63–7. (In Russ.) Шабунин А. В., Аракелов С. Э., Дубров В. Э. и др. Направления повышения эффективности лечения перипротезной инфекции. Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье. 2023; 13 (5): 63–7. DOI:10.20340/vmi-rvz. 2023.5. CLIN. 4

15. Hu L, Fu J, Zhou Y, et al. Microbiological profiles and antibiotic resistance of periprosthetic joint infection after hip replacement in patients with fracture or non-fracture: A comparative study. J Back Musculoskelet Rehabil. 2023; 36 (1): 147–54. DOI:10.3233/BMR-210319

16. Lisoń J, Taratuta A, Paszenda S, et al. Prospects for preventing biofilm formation for medical purposes. Coatings. 2022; 12 (2): 197. DOI:10.3390/coatings12020197

17. Ahmadi M, Borhan A, Ghorbani-Bidkorbeh F, et al. Nano-targeted drug delivery approaches for bacterial infections. In: Saravanan M, Barabadi H, Mostafavi E, Webster T. (eds.) Emerging nanomaterials and nano-based drug delivery approaches to combat antimicrobial resistance. Elsevier, 2022; p. 139–78. DOI:10.1016/B978-0-323-90792-7.00004-X

18. Bandyopadhyay A, Mitra I, Ciliveri S, et al. Additively manufactured Ti-Ta-Cu alloys for the next-generation load-bearing implants. Int J Extrem Manuf. 2024; 6 (1): 015503. DOI: 10.1088/2631-7990/ad07e7

19. Karabulut G, Ülgen NB, Karakuş S, Toruntay C. Improving the antibacterial and anticorrosive properties of 316L stainless steel by nanocoating copper oxide nanoparticles. Mat Chem Phys. 2023; (308): 128265. DOI:10.1016/j.matchemphys. 2023.128265

20. Guerini M, Condrò G, Friuli V, et al. N-acetylcysteine (NAC) and its role in clinical practice management of cystic fibrosis (CF): A review. Pharmaceuticals (Basel). 2022; 15 (2): 217. DOI:10.3390/ph15020217

Статья поступила в редакцию 06.09.2023; одобрена после рецензирования 11.11.2023; принята к публикации 24.11.2023. The article was submitted 06.09.2023; approved after reviewing 11.11.2023; accepted for publication 24.11.2023.

Информация об авторах:

Ульянов Владимир Юрьевич — заместитель директора по научной и инновационной деятельности НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, доцент, доктор медицинских наук, v.u.ulyanov@gmail.com, ORCID 0000-0002-9466-8348; **Пичхидзе Сергей Яковлевич** — ведущий научный сотрудник отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, доктор технических наук, serg5761@yandex.ru, ORCID 0000-0002-9563-6022; **Рожкова Юлия Юрьевна** — начальник отдела научно-технической информации НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, rozhkova280586@gmail.com, ORCID 0000-0001-9506-5234; **Горякин Максим Владимирович** — старший научный сотрудник отдела инновационных проектов в травматологии и ортопедии НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, кандидат медицинских наук, gorjakinmax@mail.ru, ORCID 0000-0002-7450-3095.

Information about the authors:

Vladimir Yu. Ulyanov — Director for Science and Innovations of the Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, Associate Professor, DSc, v.u.ulyanov@gmail.com, ORCID 0000-0002-9466-8348; **Sergey Ya. Pichkhidze** — Leading Researcher of the Department of Fundamental, Clinical and Experimental Research of the Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, DSc Tech., serg5761@yandex.ru, ORCID 0000-0002-9563-6022; **Yulia Yu. Rozhkova** — Head of the Department of Scientific and Technical Information Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, rozhkova280586@gmail.com, ORCID 0000-0001-9506-5234; **Maxim V. Goryakin** — Senior Researcher of the Department of Innovative Projects for Traumatology and Orthopedics of the Research Institute of Traumatology, Orthopedics and Neurosurgery, PhD, gorjakinmax@mail.ru, ORCID 0000-0002-7450-3095.