

Л. Б. Суходуб, Т. П. Осолодченко, Г. Е. Христьян, Л. Г. Штикер, Г. М. Козубова, Н. М. Шульга,
В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук

Вплив протимікробних компонентів біокомпозитних матеріалів на основі гідроксиапатиту на адгезію мікроорганізмів

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ», м. Харків

Ключові слова: мікроорганізм, адгезія, гідроксиапатит, хітозан, срібло.

Вивчили вплив біоматеріалу на основі гідроксиапатиту із вмістом хітозану та іонів срібла на процес адгезії мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 щодо формалінованих еритроцитів людини. Як контроль обрали гідроксиапатит без додавання протимікробних засобів. Результати експерименту засвідчили, що в порівнянні з контрольним зразком додавання іонів срібла знижує індекс адгезивності *E. coli* ATCC 25922 на 40%, а хітозану – від 22% до 39% залежно від концентрації. Індекс адгезивності *S. aureus* ATCC 25923 під дією іонів срібла зменшується на 23%, а під впливом хітозану – на 27%.

Влияние противомикробных компонентов биокompозитных материалов на основе гидроксиапатита на адгезию микроорганизмов

Л. Б. Суходуб, Т. П. Осолодченко, Г. Е. Христьян, Л. Г. Штикер, А. Н. Козубова, Н. Н. Шульга, В. В. Невмержицький, В. В. Казмірчук

Изучено влияние биоматериала на основе гидроксиапатита с содержанием хитозана и ионов серебра на процесс адгезии микроорганизмов *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923 по отношению к формализованным эритроцитам человека. Контролем служил образец гидроксиапатита без содержания противомикробных средств. Результаты эксперимента показали, что по сравнению с контрольным образцом внесение ионов серебра в состав композита снижает индекс адгезивности *E. coli* ATCC 25922 на 40%, а хитозана – от 22% до 39% в зависимости от концентрации. Индекс адгезивности *S. aureus* ATCC 25923 под влиянием ионов серебра уменьшается на 23%, а под влиянием хитозана – на 27%.

Ключевые слова: микроорганизм, адгезия, гидроксиапатит, хитозан, серебро.

Запорожский медицинский журнал. – 2014. – №2 (83). – С. 112–114

Influence of antimicrobial components of the hydroxyapatite based biocomposites on microorganisms adhesion

L. B. Sukhodub, T. P. Osolodchenko, G. E. Khristyian, L. G. Shtiker, G. M. Kozubova, N. M. Shulga, V. V. Nevmerzhitsky, V. V. Kazmirchuk

Adhesion of *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 to the formalin-treated erythrocytes, influenced by the biomaterial, based on the hydroxyapatite with the content of silver ions and chitosan was studied. As a control was chosen hydroxyapatite without impurities. Results of the experiment showed that the addition of silver ions and chitosan to the biomaterial reduces by 40% and 22–39%, respectively, adhesive microorganism index (AMI) of the *E. coli* ATCC 25922, compared with control. Adhesive microorganism index of *S. aureus* ATCC 25923 was reduced for 23% and 27% under action of silver ions and chitosan respectively.

Key words: microorganism, adhesion, hydroxyapatite, chitosan, silver.

Zaporozhye medical journal 2014; №2 (83): 112–114

У процесі виникнення післяопераційних ускладнень, зумовлених мікробними агентами, що набувають усе більшої полірезистентності до антибіотиків, значну роль відіграє адгезивна активність мікроорганізмів як фактор запуску інфекційного процесу [1]. Адгезія залежить, з одного боку, від особливостей поверхневої структури патогенів, з іншого, – від наявності відповідних рецепторів для прикріплення на поверхні клітин макроорганізму [2]. Відомо, що бактерії прикріплюються до епітеліальних клітин за допомогою особливих білково-полісахаридних макромолекул – адгезинів.

У зв'язку зі значним ростом кількості імплантацій у хірургічній ортопедії та стоматології в останні десятиліття, зусилля учених зосереджені на вивченні взаємодії бактерій із матеріалом поверхні імплантів і розробці сучасних матеріалів, котрі б протидіяли їх адгезії та розвитку гнійно-запальних ускладнень [3].

Робота присвячена дослідженню біоматеріалів на основі гідроксиапатиту (ГА) із вмістом хітозану та срібла як протимікробних композитних речовин. Гідроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ широко застосовується для імплантації у стоматології та ортопедії.

Хітозан – полісахарид, один із небагатьох природних

катіонітів. Макромолекули хітозану мають велику кількість функціональних гідроксильних та аміногруп, що дозволяє йому зв'язувати водорозчинні речовини, у тому числі бактеріальні токсини, лікарські засоби, комплексні сполуки (наприклад, етилендіамінтетраоцтова кислота) [4]. Хітозан є біодеградаційно стійким матеріалом, має гарну біосумісність із нативними тканинами, характеризується протимікробними властивостями [5,6]. За даними фахової літератури [7], існує прямий зв'язок між антибактеріальною активністю хітозану та характеристиками поверхні стінки бактеріальної клітини. Грамнегативні бактерії є більш чутливими до позитивно заряджених аміногруп хітозану. Величина щільності негативного заряду на поверхні мікробної клітини визначає ступінь пригнічуючої дії хітозану на цю клітину.

Протимікробні властивості іонів срібла відомі ще з античних часів, і нині вони мають широке практичне застосування в медицині [8].

Мета роботи

Дослідження здатності протимікробних компонентів (хітозан, іони срібла), що входять до складу біоматеріалів на основі гідроксиапатиту (ГА), впливати на процес адгезії мікроорганізмів різних таксономічних груп.



Матеріали і методи дослідження

Для вивчення адгезії мікроорганізмів застосовували загальноприйнятну методику, котра передбачає використання формалізованих еритроцитів людини O (1) групи Rh (+). Еритроцити використовували як універсальну модель еукаріотичних клітин хазяїна, адже вони мають на своїй поверхні глікофорин – речовину, що ідентична глікокаліксу епітеліальних клітин [9,10].

Досліджували такі зразки:

ГА-контроль (без протимікробних компонентів);

ГА+Ag (іони срібла, 0,001 г/л);

ГА+ хітозан (0,025г/л);

ГА+хітозан (0,1 г/л);

Тест-культури мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923.

Для дослідження адгезії зразки готували так: суспензії дрібнодисперсних порошків (зразки 1–4) із концентрацією 4 мг/мл в 0,5% оцтової кислоти залишали при температурі 37°C на ніч. Досліджувані культури мікроорганізмів вирощували протягом 24 годин на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА), використовували суспензію мікроорганізмів із концентрацією 10⁹ клітин/мл у фізіологічному розчині (0,9% NaCl). До пробірок із підготованими зразками 1–4 вносили суспензію мікроорганізмів та по 0,5 мл зависі формалізованих еритроцитів, що підготовлена згідно з методикою [9]. Суміш інкубували при температурі 37°C протягом 30 хвилин, періодично струшуючи. На ретельно знежиреному предметному склі готували мазок суспензії, що досліджували, висушували при кімнатній температурі, фіксували мазок етиловим спиртом, фарбували за Романовським – Гімзою (для *E. coli*) та за Грамом (для *S. Aureus*).

Методом світлової мікроскопії по кожному мікроорганізму для кожного зразка обстежували й обраховували не менше ніж 50 еритроцитів (по 10 еритроцитів у 5 різних полях зору).

Адгезію мікроорганізмів оцінювали за індексом адгезивності мікроорганізмів (ІАМ), який розраховували за формулою:

$$ІАМ = \frac{СПА}{КУЕ} \cdot 100\% ,$$

де ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізмів (середня кількість мікробних клітин, адгезованих на одному еритроциті, що бере участь у адгезивному процесі);

СПА – середній показник адгезії (середня кількість мікроорганізмів, що прикріпились до 1 еритроцита, при підрахунку не менше ніж 50 еритроцитів);

КУЕ – коефіцієнт участі еритроцитів (відсоток еритроцитів, що мають на поверхні адгезовані мікроорганізми).

Під час оцінювання критеріїв адгезії вважали, що при значенні ІАМ ≤ 1,75 мікроорганізм був неадгезивним; від 1,76 до 2,5 – низькоадгезивним; від 2,51 до 4,0 – середньоадгезивним, > 4,0 – високоадгезивним.

Результати експериментів опрацьовували за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003. Для порівняння відмінностей дослідних груп із контрольною використовували однофакторний дисперсійний аналіз і критерій Даннета.

Результати та їх обговорення

За результатами дослідження аналізували вплив проти-мікробних компонентів (хітозан, срібло) на адгезію та обчислювали індекс адгезивності мікроорганізмів (табл. 1,2).

Таблиця 1

Показники адгезії *E. coli* ATCC 25922 за наявності гідроксиапатиту із протимікробними компонентами

Тип зразка	СПА, М±SD	КУЕ, %	ІАМ	ІАМ, % від контролю
ГА-контроль	1,82±0,21	52	3,48	100
ГА+ Ag	1,14±0,18*	54	2,10	60
ГА+0,025 г/л хітозану	1,31±0,19*	62	2,11	61
ГА+0,1 г/л хітозану	1,17±0,15*	43	2,71	78

Примітки: М – середнє арифметичне, SD – стандартне відхилення; * – відмінності статистично значущі в порівнянні з контрольною групою (p≤0,05).

Таблиця 2

Показники адгезії *S. aureus* ATCC 25923 за наявності гідроксиапатиту із протимікробними компонентами

Тип зразка	СПА, М±SD	КУЕ, %	ІАМ	ІАМ, % від контролю
ГА-контроль	2,02±0,32	58	3,50	100
ГА+ Ag	1,36±0,26*	50	2,71	77
ГА+0,025г/л хітозану	1,30±0,14*	51	2,55	73
ГА+0,1г/л хітозану	1,33±0,16*	52	2,54	73

Примітки: М – середнє арифметичне, SD – стандартне відхилення, * – відмінності статистично значущі в порівнянні з контрольною групою (p≤0,05).

Встановили, що тест-штами мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 були високоадгезивними (ІАМ = 4,64 і 4,47 відповідно). У зразках ГА(К), які не містили протимікробних домішок і були обрані як контрольні, відбулось часткове зменшення ІАМ обох мікроорганізмів (3,48 і 3,50 відповідно), що є результатом дії 0,5% оцтової кислоти, котра входила до складу суспензії як розчинник. У зразках ГА+Ag відбулось зниження ІАМ *E. coli* та *S. aureus* на 40% та 23% у порівнянні із контрольним. Додавання хітозану в зразках 3 і 4 знизило ІАМ обох культур від 22% до 39%. Очевидно, таке зниження індексу адгезивності мікроорганізмів демонструє ефективність дії іонів срібла та хітозану.

Висновки

1. Додавання хітозану та іонів срібла до біоматеріалів на основі гідроксиапатиту підвищує їхні протимікробні властивості.

2. Під дією іонів срібла, котрі додавали до матеріалу покриття, знижується індекс адгезивності *E. coli* ATCC 25922 щодо формалізованих еритроцитів – на 40%, а *S. aureus* ATCC 25923 – на 23%.

3. Хітозан у складі біоактивного покриття зменшує індекс адгезивності мікроорганізму *E. coli* ATCC 25922 від 22% до 39% залежно від концентрації, а *S. aureus* ATCC 25923 – на 27%.

4. Результати дослідження свідчать про перспективність створення медичних імплантів на основі гідроксиапатиту з додаванням іонів срібла та хітозану для застосування їх в ортопедії та стоматології.



Список літератури

1. Towner K.J. Mechanism of acquired resistance / K.J. Towner // *Antimicrobial chemotherapy* / 4th ed. In: Greenwood D. – Oxford; New York : Oxford University Press, – 2001. – P. 145–155.
2. Черкес Ф.К. Микробиология / [под редакцией Ф.К.Черкес]. – М.: Медицина, 1986. – 512 с.
3. Ploux L. Bacteria/material interfaces: role of the material and cell wall properties / L. Ploux, A. Ponche, K. Anselme // *Journal of Adhesion Science and Technology*. – 2010. – V. 24. – no 13–14. – P. 2165–2201.
4. Bernkop S. Comparative in vitro study of different chitosan-complexing agent conjugates / S. Bernkop, J. Freudl // *Pharmazie*. – 1999. – V. 54. – P. 369–371.
5. Vande Vord P.J. Evaluation of the biocompatibility of chitosan scaffold in mice / P.J. Vande Vord, H.W.T. Matthew, S.P. Desilva [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 59. – P. 585–590.
6. Eugene K. Implantable application of chitin and chitosan / K. Eugene, Y.L. Lee // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24. – P. 2339–2349.
7. Chung Y. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall / Y. Chung, Y. Su, C. Chen [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* – 2004. – V. 25(7). – P. 932–936.
8. Klassen H.J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver / H.J. Klassen // *Burns*. – 2000. – V. 26. – no 2. – P. 131–138.
9. Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Т.А. Брилис, Х.П. Ленцер, А.А. Ленцер // *Лабораторное дело*. – 1986. – № 2. – С. 210–212.
10. Осолодченко Т.П. Адгезивні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення : метод. рек. / [уклад. Т.П. Осолодченко та ін.] ; МОЗ України, АМН України, Укр.центр НМІ та ПЛР. – К.: Знання України, 2009. – 19 с.

References

1. Towner, K. J. (2001) Mechanism of acquired resistance // *Antimicrobial chemotherapy* / 4th ed. In: Greenwood D. – Oxford; New York : Oxford University Press, 145–155.
2. Cherkes, F. K. (Ed.) (1986) *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Moscow: Medicine [in Russian].
3. Ploux, L., Ponche, A., & Anselme, K. (2010). Bacteria/Material Interfaces: Role of the Material and Cell Wall Properties. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 24(13-14), 2165–2201.
4. Bernkop, S. & Freudl, J. (1999) Comparative in vitro study of different chitosan-complexing agent conjugates. *Pharmazie*, 54, 369–371.
5. Vande Vord, P. J., Matthew, H. W. T., Desilva, S. P. & [et al.] (2002) Evaluation of the biocompatibility of chitosan scaffold in mice. *J. Biomed. Mater. Res.*, 59, 585–590.
6. Eugene, K. & Lee, Y. L. (2003) Implantable application of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24, 2339–2349.
7. Chung, Y., Su, Y., Chen C. & [et al.] (2004) Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin.*, 25(7), 932–936.
8. Klassen, H.J. (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26(2), 131–138.
9. Brilis, V. I., Brilis, T. A., Lentser, Kh. P. & Lentser, A. A. (1986) Metodika izucheniya adgezivnogo processa mikroorganizmov [Methodology of study of microorganisms adhesive process]. *Laboratornoe delo*, 2, 210–212 [in Russian].
10. Osolodchenko, T. P. (2009) *Adkhezivni vlastyivosti mikroorganizmiv ta metody yikh vyznachennia: metodychni rekomendatsii*. [Adhesive properties of microorganisms and methods of their determination: methodical recommendations]. Kyiv: Znanntia Ukrainy [in Ukrainian].

Відомості про авторів:

Суходуб Л. Б., к. хім. н., ст. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ», E-mail: l.sukhodub@gmail.com.

Осолодченко Т.П., к. біол. н., ст. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Христян Г.Є., мол. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Штикер Л.Г., провідний інженер, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Козубова Г.М., мол. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Шульга Н.М., к. біол. н., ст. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Невмержицький В.В., мол. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Казмірчук В.В., к. мед. н., ст. науковий співробітник, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ».

Поступила в редакцію 05.11.2013 г.