

## Влияние наноразмерных покрытий из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода на микробную колонизацию биопротезов

### Аннотация

Создание наноразмерных покрытий из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода (ДУЛЦУ) на поверхности биологических протезов клапанов сердца не оказывает существенного влияния на адгезию клинических штаммов микроорганизмов. Однако изучение выживаемости тест-культур на поверхности модифицированной биоткани показало, что в дальнейшем адгезированные стафилококковые культуры не сохраняют жизнеспособность за исключением *S. saprophyticus*. Результаты по выживаемости для грамотрицательных культур варьируют: от отсутствия роста культуры *Kl. pneumoniae* на биоткани с ДУЛЦУ до сплошного роста штаммов *Ps. aeruginosa* и *A. baumannii* на таких же поверхностях. Легирование азотом покрытий из ДУЛЦУ предотвращает адгезию и колонизацию тест-культур (кроме *C. albicans*) при искусственной инокуляции модифицированных биопротезов клиническими штаммами микроорганизмов.

Инновационным подходом к решению комплексной проблемы долговечности биопротезов клапанов сердца является создание на поверхности биоткани покрытий, эффективно маскирующих промотирующую кальцификацию лиганды. В этом аспекте перспективными являются покрытия из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода (ДУЛЦУ) [1]. Безусловный интерес представляет изучение микробной колонизации биоткани, модифицированной углеродными покрытиями. Технология нанесения ДУЛЦУ-покрытий методом низкотемпературной плазмы на различные подложки, включая биологические объекты, такие как перикард, разработана на физическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова [2].

В рассматриваемой работе для оценки влияния покрытий из ДУЛЦУ на адгезию и выживаемость различных штаммов микроорганизмов, адгезированных на поверхность биоткани, была использована оригинальная авторская методика, позволяющая получать воспроизводимые результаты для любых покрытий. Для удобства анализа полученных результатов был введен показатель индекса адгезии (ИА) и его десятичного логарифма (lg). За индекс адгезии принимается среднее количество жизнеспособных клеток тест-культур, адгезированных на 1 см<sup>2</sup> поверхности тест-образцов [3], [4].

В качестве тест-культур были выбраны этиологически значимые клинические штаммы микроорганизмов, как грамположительные: *Staphylococcus aureus* MRSA (MRSA – метициллинрезистентный золотистый стафилококк), *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, так и грамотрицательные: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*. С каждой тест-культурой исследование проводилось в 15 повторностях.

Исследование выполнено в рамках государственного контракта № 12411.1008799.13.056 от 15 мая 2012 г. «Разработка

технологии и организация производства жестких и гибких протезов клапанов сердца с открытым центральным потоком, объединенных системой миниинвазивной имплантации», заказчик – Министерство промышленности и торговли Российской Федерации.

При оценке адгезивных свойств модифицированных биопротезов выявлена определенная закономерность. Так, индекс адгезии (ИА) тест-культур *S. haemolyticus* и *S. saprophyticus* на образцах, модифицированных ДУЛЦУ, выше соответственно на 0,19 и 0,69 lg единицы, чем на контрольных образцах. Для культуры *S. aureus* наблюдается противоположный эффект – снижение ИА на 0,28 lg единицы для образцов с покрытием из ДУЛЦУ в сравнении с контролем. Для грамотрицательных тест-культур *Ps. aeruginosa* и *A. baumannii* также отмечается снижение показателей адгезии на 0,29 lg единицы, а для культуры *Kl. pneumoniae* – на 2,89 lg единицы на модифицированных образцах. В то же время ИА *E. coli* для опытных и контрольных образцов практически одинаков: 3,15 и 3,17 lg единицы соответственно. Индекс адгезии *C. albicans* на образцах с покрытием из ДУЛЦУ также на 0,85 lg единицы ниже соответствующего показателя для контроля.

Заслуживают внимания результаты по оценке выживаемости тест-культур, адгезированных на поверхности биоткани, модифицированной ДУЛЦУ. После суточной экспозиции искусственно инокулированных тест-образцов наблюдается сплошной рост стафилококковых тест-культур на поверхности контроля (аллогенной ткани) и отсутствие роста этих же культур на поверхности биоткани, модифицированной ДУЛЦУ, за исключением штамма культуры *S. saprophyticus*, единичный рост которого отмечается на поверхности опытных образцов. Количество жизнеспособных клеток *C. albicans* после суточной экспозиции уменьшилось, но незначительно – на 0,2 lg единицы, при положительной динамике на контроле (рис. 1).

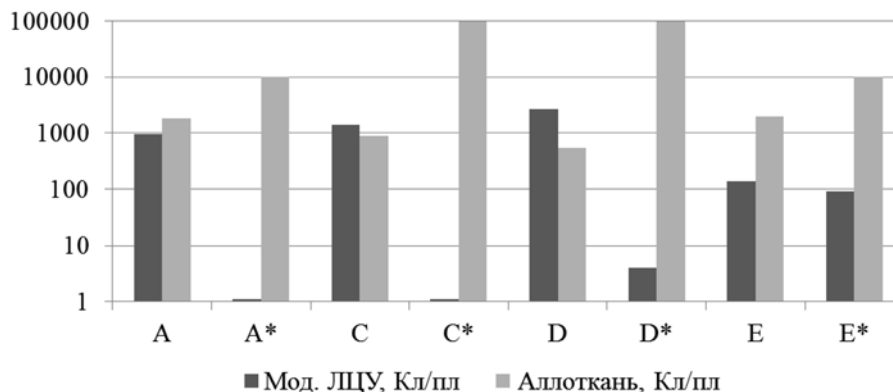


Рис. 1. Адгезия и выживаемость грамположительных тест-культур на поверхности модифицированных биопротезов ( $p < 0,001$ ):

A – адгезия *S. aureus*, A\* – выживаемость *S. aureus*; C – адгезия *S. haemolyticus*, C\* – выживаемость *S. haemolyticus*;  
D – адгезия *S. saprophyticus*, D\* – выживаемость *S. saprophyticus*; E – адгезия *C. albicans*, E\* – выживаемость *C. albicans*

Результаты, полученные для грамотрицательных культур, неоднозначны. Штаммы *Ps. aeruginosa* и *A. baumannii* сохранили свою жизнеспособность через 24 ч инкубации при оптимальных температурных режимах и влажности; на модифицированных образцах наблюдается сплошной рост тест-культур *Ps. aeruginosa* и *A. baumannii*, в то время как на аллогенной ткани – сливной рост. В то же время количество жизнеспособных клеток *E. coli*, адгезированных на поверхности образцов с покрытием ДУЛЦУ, после суточной инкубации снизилось на 0,64 lg единицы при сплошном росте кишечной палочки на контрольных образцах. Культура *Kl. pneumoniae* не выжила на образцах с покрытием из ДУЛЦУ в отличие от контрольных образцов, на которых этот же штамм дал сливной рост (рис. 2).

Изучение процесса бактериальной колонизации нанопокровов из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода, легированных азотом ( $N_2$ ), показало, что происходит прерывание адгезии и колонизации тест-культур. На поверхности биопротезов, модифицированных ДУЛЦУ с азотом ( $N_2$ ), наблюдается отсутствие роста представителей грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, кроме культуры *S. albicans*. Индекс адгезии *S. albicans* составил 2,04 lg единицы и практически не изменился (2 lg ед.) после суточной экспозиции при оптимальных условиях (рис. 3).

В последние годы широко изучаются свойства покрытий на основе углеродных наноматериалов, в том числе их влияние на жизнеспособность бактериальных культур. Ряд исследователей отмечают отсутствие антимикробной активности латексных пленок с многостенными углеродными нанотрубками (МСНТ) по отношению к метициллин-резистентным штаммам (MRSA) золотистого стафилококка. Только присое-

динение фермента лизостафина (*Lst*) к нанотрубкам позволило создать эффективное стабильное антистафилококковое покрытие [5].

Изучение воздействия различных углеродных наночастиц на кишечную палочку показало, что очищенные нанотрубки контактируют с поверхностью клеток *E. coli*, но достоверного влияния на жизнеспособность культуры исследователи не обнаружили. Фуллерены и их карбоксильная модификация не повлияли на жизнеспособность и морфологию бактерий, в то время как фуллерен, модифицированный аминными группами ( $-NH_2$ ), интенсивно взаимодействовал с бактериями и обладал выраженным бактерицидным эффектом. Это вещество обладало высоким сродством к клеточной стенке бактерий: около 97 % наночастиц связывались с ней и только 3 % оставались в растворе. В результате на поверхности бактерий появлялась характерная зернистость из наночастиц, что сопровождалось изменениями длины, ширины и высоты клеток. После контакта с модифицированным аминными группами фуллереном гибло 60 % бактерий по сравнению с контрольной группой [6].

Результаты, полученные в рассматриваемой работе, свидетельствуют, что покрытие из ДУЛЦУ не вызывает прерывания адгезии стафилококковых культур. Однако в дальнейшем адгезированные культуры стафилококков не сохраняют свою жизнеспособность, и наблюдается отсутствие роста стафилококковых культур (включая метициллин-резистентные штаммы золотистого стафилококка) на поверхности биопротезов, модифицированных углеродными покрытиями. Возможно, что проявляющийся бактерицидный эффект покрытия из ДУЛЦУ обусловлен его структурой, в которой линейные цепочки уг-

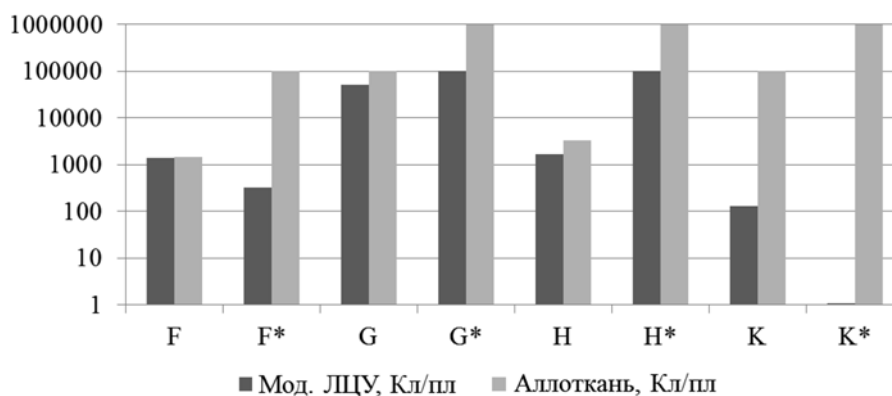


Рис. 2. Адгезия и выживаемость грамотрицательных тест-культур на поверхности модифицированных биопротезов ( $p < 0,001$ ): F – адгезия *E. coli*, F\* – выживаемость *E. coli*; G – адгезия *Ps. aeruginosa*, G\* – выживаемость *Ps. aeruginosa*; H – адгезия *A. baumannii*, H\* – выживаемость *A. baumannii*; K – адгезия *K. pneumoniae*; K\* – выживаемость *K. pneumoniae*

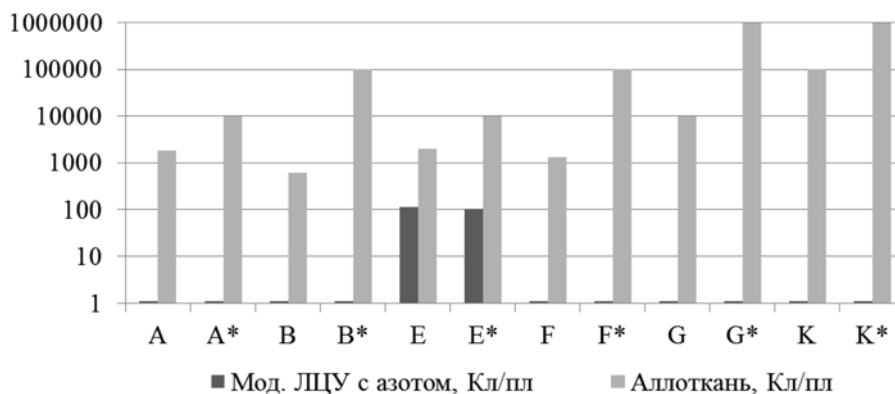


Рис. 3. Адгезия и выживаемость тест-культур на поверхности биопротезов, модифицированных ДУ ЛЦУ с азотом ( $N_2$ ) ( $p < 0,001$ ): A – адгезия *S. aureus*, A\* – выживаемость *S. aureus*; B – адгезия *S. epidermidis*, B\* – выживаемость *S. epidermidis*; E – адгезия *C. albicans*, E\* – выживаемость *C. albicans*; F – адгезия *E. coli*, F\* – выживаемость *E. coli*; G – адгезия *Ps. aeruginosa*, G\* – выживаемость *Ps. aeruginosa*; K – адгезия *K. pneumoniae*, K\* – выживаемость *K. pneumoniae*

леродных атомов образуют кристаллическую решетку с расстоянием между цепочками около 0,4...0,5 нм. Мы предполагаем, что при адгезии стафилококков происходит проникновение углеродных цепочек через бактериальные поры, размер которых составляет 1...6 нм, что приводит к нарушению метаболизма бактериальной клетки (или даже к повреждению клеточных органелл) и к последующей ее гибели.

Наличие перитрихально расположенных фимбрий (пили) у бактериальной клетки *E. coli* обеспечивает другой механизм взаимодействия бактерий с покрытием из ДУЛЦУ. Пили представляют собой белковые цилиндры длиной от 200 до 2 000 нм; диаметр фимбрий – 5...10 нм, а диаметр отверстий внутри цилиндра – 2...2,5 нм. Пили являются факторами колонизации и обеспечивают прикрепление бактериальной клетки к различным поверхностям. Взаимодействие полой структуры фимбрий с кристаллической решеткой углеродных цепочек покрытия может быть основным фактором, влияющим на выживаемость адгезированных бактерий *E. coli*.

Способность к продукции капсулоподобной экстрацеллюлярной слизи обеспечивает устойчивость бактериальной клетки к воздействию различных неблагоприятных условий окружающей среды. Видимо, этим фактором можно объяснить выживаемость культур *Ps. aeruginosa* и *Ac. baumannii* на поверхности нанопокровытия из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода.

Легирование азотом покрытий из ДУЛЦУ приводит к образованию тройных связей азот-углерод на концах линейных цепочек углеродных атомов и придает покрытию бактерицидные свойства. В результате наблюдается не только эффект прерывания бактериальной колонизации, но и предотвращение адгезии тест-культур (кроме *S. albicans*) при искусственной инокуляции модифицированных биопротезов. Способность *S. albicans* колонизировать покрытия из ДУЛЦУ с азотом может быть связана со способностью *S. albicans* образовывать хламидоспоры (споры с плотной двойной оболочкой) и таким образом адаптироваться к неблагоприятным условиям.

Результаты настоящей работы показали, что:

- создание на поверхности биоткани покрытий из ДУЛЦУ не препятствует адгезии клинически значимых штаммов микроорганизмов;
- адгезированные стафилококковые культуры, включая метициллинрезистентный золотистый стафилококк, не сохраняют свою жизнеспособность на поверхности биоткани с ДУЛЦУ;
- легирование азотом покрытий из ДУЛЦУ предотвращает адгезию и колонизацию тест-культур за исключением *S. albicans*.

Таким образом, нанопокровытие из двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода прерывает колонизацию биоткани стафилококковыми культурами. Эффект предотвращения колонизации тест-культур достигается при легировании азотом покрытий из ДУЛЦУ.

#### Список литературы:

1. Бакулева Н.П., Костава В.Т., Кондратенко Ж.Е., Лютова И.Г., Зеливянская М.В., Александров А.Ф., Корнеева Ю.В., Евдокимов С.В. Биологические протезы «БиоЛАБ» с наноглеродным покрытием – скажи кальцинозу «Нет» / Сборник трудов «Инновационные имплантаты в хирургии». Часть 3. – М.: НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2014. С. 248-249.

2. Александров А.Ф., Гусева М.Б., Савченко Н.В., Стрелецкий О.А., Хвостов В.В. Пленка двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода и способ ее получения / Патент RU 2564288 С2. 2015.
3. Лютова И.Г., Анучина Н.М., Бакулева Н.П., Костава В.Т., Чащин И.С. Антимикробные свойства биопротезов с покрытием наноструктурированным низкомолекулярным хитозаном // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2013. Т. 14. № 1. С. 52-57.
4. Gallyamov M.O., Chaschin I.S., Khokhlova M.A., Grigorev T.E., Bakuleva N.P., Lyutova I.G., Kondratenko J.E., Badun G.A., Chernysheva M.G., Khokhlov A.R. Collagen tissue treated with chitosan solutions in carbonic acid for improved biological prosthetic heart valves // Materials Science and Engineering. 2014. Vol. 37. PP. 127-140.
5. Pangule R.C., Brooks S.J., Dinu C.Z., Bale S.S., Salmon S.L., Zhu G., Metzger D.W., Kane R.S., Dordick J.S. Antistaphylococcal nanocomposite films based on enzyme nanotube conjugates // ACS Nano. 2010. Vol. 4. PP. 3993-4000.
6. Дерябин Д.Т., Васильченко А.С., Алешина Е.С., Тлягулова А.С., Никитин А.Н. Исследование взаимодействия углеродных наноматериалов с клетками *Escherichia coli* методом атомно-силовой микроскопии // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. № 11-12. С. 136-141.

*Вахтанг Тенгизович Костава,*  
канд. биолог. наук,

зав. группой имплантируемых изделий  
и медицинских клеев,

*Неля Михайловна Анучина,*  
научный сотрудник,

лаборатория клинической микробиологии  
и антимикробной терапии,

*Наталья Петровна Бакулева,*  
канд. хим. наук,

зав. научно-производственной лабораторией  
биологических протезов и материалов,

*Марина Викторовна Зеливянская,*  
операционная медицинская сестра,

*Жаннета Ерофеевна Кондратенко,*  
ведущий инженер,

*Ирина Геннадиевна Лютова,*  
врач-бактериолог,

группа имплантируемых изделий  
и медицинских клеев,

*Дмитрий Александрович Попов,*  
д-р мед. наук,

зав. лабораторией клинической  
микробиологии и антимикробной терапии,

ФБГУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии  
им. А.Н. Бакулева» Минздрава России,

г. Москва,

e-mail: [vtkostava@mail.ru](mailto:vtkostava@mail.ru)