

Образование биопленок стафилококков на поверхности титана и титана с углеродной алмазоподобной пленкой и действие на них низкомолекулярного катионного пептида варнерина

И. Ш. Трахтенберг, А. П. Рубштейн, Л. М. Лемкина,
В. П. Коробов, И. А. Морозов

Изучены антибактериальные свойства углеродных алмазоподобных пленок, осажденных на титановые подложки методом импульсно-дугового распыления графита. Полученные результаты сравнительного исследования формирования бактериальных пленок на титане и титане с алмазоподобной пленкой показали, что алмазоподобный углерод тормозит рост бактериальной пленки, то есть обладает антибактериальными свойствами. Этот эффект связан с физико-химическими особенностями поверхности алмазоподобного углерода.

Ключевые слова: алмазоподобный углерод, антибактериальные свойства, стафилококк

There are investigated antibacterial properties of the diamond-like carbon films deposited on titanium substrates by pulse arc sputtering of graphite. Obtained results of comparative studying of bacterial films formation on Ti and Ti with diamond-like carbon showed that diamond-like carbon inhibit the growth of bacterial film, i.e. possesses antibacterial properties. This effect is connected with physical and chemical features of a surface of diamond-like carbon.

Key words: diamond-like carbon, antibacterial properties, staphylococcus.

Введение

Углеродные алмазоподобные пленки обладают уникальным комплексом свойств: высокой твердостью (до 100 ГПа) и износостойкостью, низким коэффициентом трения ($\leq 0,1$), химической инертностью, а также биосовместимостью [1 – 5]. Это обусловило перспективность их применения для полезной модификации поверхности искусственных имплантатов: снижения коэффициентов трения в искусственных суставах, подавления тромбообразования в устройствах, контактирующих с кровью, а также для улучшения остеоинтеграции имплантатов, замещающих костные дефекты [6 – 9]. Однако, независимо от физико-химических свойств имплантата его отторжение от живых тканей во многих случаях связано с присутствием на его поверх-

ности болезнестворных бактерий, типичными представителями которых являются стафилококки. Задача усложняется тем, что бактерии, образующие на поверхности имплантатов биопленки, проявляют высокую устойчивость к классическим антибиотикам. Все это указывает на необходимость поиска средств, подавляющих как сорбцию инфекционных агентов на поверхности имплантированных устройств, так и расщепление формирующихся на них бактериальных пленок. Эффективным подходом для решения проблем подавления биопленкообразования может стать использование антибактериальных покрытий для снижения роста биопленок, а также низкомолекулярных катионных пептидов, природных соединений, способных расщеплять образующиеся бактериальные пленки [10, 11].

Цель работы — анализ процесса образования биопленок стафилококков на поверхность титана и титана с углеродной алмазоподобной пленкой; исследование действия низкомолекулярного катионного пептида варнерина на биопленки, образующиеся на титане и алмазоподобной пленке.

Методика эксперимента

В качестве материала образцов был выбран титан, поскольку этот металл и его сплавы широко используются в медицине для изготовления имплантатов [12]. В качестве тестовых образцов и подложек для нанесения покрытий использовали пластины титана марки ВТ1-0 размером $10 \times 10 \times 1$ мм. Подготовка поверхности пластин включала в себя шлифовку, предварительную очистку в спиртовой ультразвуковой ванне (80 Вт), и финишную очистку путем бомбардировки ионами аргона энергией 4 кэВ, 30 мин, в вакууме $6 \cdot 10^{-3}$ Па на установке УВНИИПА-001. Алмазоподобные углеродные покрытия (общепринятое название DLC) толщиной до 50 нм наносили методом вакуумного импульсного дугового распыления графита при частоте импульсов 1 Гц [13]. Необходимое количество образцов (24 пластины) было изготовлено в трех независимых циклах процесса.

Для микробиологических исследований автоклавированные пластины (1,5 атм., 121°C, 60 мин) помещали в среду LB, содержащую бактерии *S. epidermidis* 33 (10^7 КОЕ/мл), инкубировали в течение 1, 3 и 5 суток в термостате при 37°C, после чего трижды промывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,2) для удаления планктонных бактерий. Часть покрытых биопленками пластин инкубировали в течение 24 ч при 37°C в этом же буферном растворе, содержащем антибактериальный пептид варнерин (128 мкг/мл), после чего вновь промывали тем же буферным раствором. Изучение биомассы пленок проводили путем измерения связывания клеточными стенками бактерий и матриксом биопленок красителя генцианвиолета [14]. Жизнеспособность клеточных элементов биопленок выявляли по уровню восстановления тетразолия MST в системе Cell Proliferation Assay (“Promega”, США) по прописи фирмы. Оптическую плотность экстрактов окрашенных пленок измеряли спектрофотометрически на приборе BenchMark Plus (BioRaq, США) при длинах волн 570 и 490 нм.

Результаты и обсуждение

При подготовке образцов для исследования особое внимание было обращено на рельеф по-

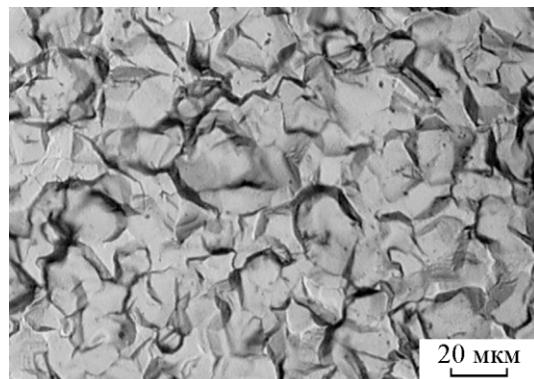


Рис. 1. Поверхность титановой пластины, используемая для осаждения биопленок (сканирующая электронная микроскопия).

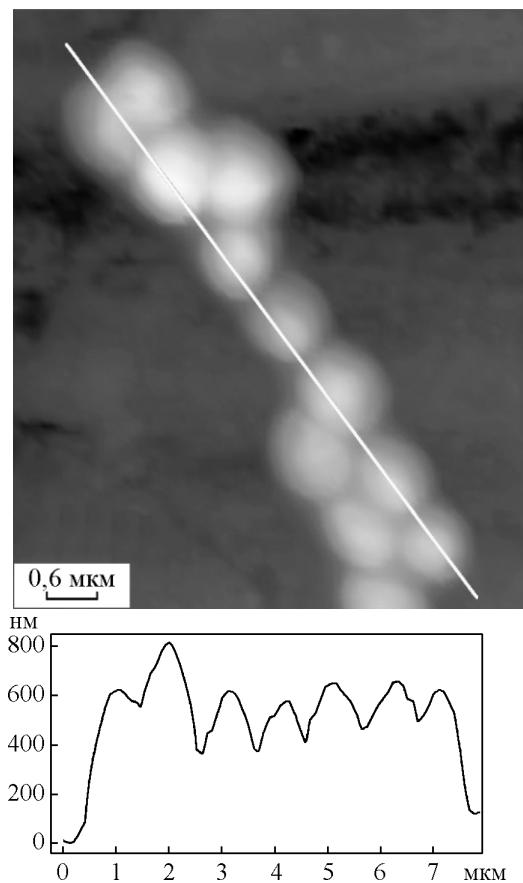


Рис. 2. Клетка стафилококка и ее профиль (атомно-силовая микроскопия).

верхности титановых пластин, так как известно, что он оказывает существенное влияние на адгезию клеток и развитие клеточных структур [15]. Для эксперимента были отобраны пластины со средней шероховатостью $R_a = 1,7 \pm 0,1$ мкм. Поверхность титановых пластин представлена на рис. 1. Средняя

Таблица 1

Биомасса стафилококка на поверхности Ti и (Ti + DLC) пластин (M_{Ti} , M_{DLC}), относительное количество жизнеспособных клеток (L_{Ti} , L_{DLC}), а также эти величини после действия варнерина (M_{Ti}^V , M_{DLC}^V , L_{Ti}^V , L_{DLC}^V , соответственно)

| Время, сутки | M_{Ti} , усл. ед. | M_{Ti}^V , усл. ед. | L_{Ti} , усл. ед. | L_{Ti}^V , отн. ед. | h , нм | M_{DLC} , усл. ед. | M_{DLC}^V , усл. ед. | L_{DLC} , усл. ед. | L_{DLC}^V , усл. ед. |
|--------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-----------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| 1 | 0,94 | 0,55 | 2,36 | 0,38 | 30 | 0,71 | 0,20 | 1,23 | 0,29 |
| | | | | | 35 | 0,74 | 0,27 | 1,40 | 0,30 |
| | | | | | 40 | 0,66 | 0,20 | 1,20 | 0,30 |
| | | | | | Ср. знач. | $0,70 \pm 0,04$ | $0,22 \pm 0,04$ | $1,28 \pm 0,11$ | $0,30 \pm 0,01$ |
| 3 | 1,77 | 0,78 | 4,26 | 1,21 | 30 | 0,96 | 0,31 | 2,24 | 0,70 |
| | | | | | 35 | 1,28 | 0,61 | 2,61 | 0,93 |
| | | | | | 40 | 0,94 | 0,44 | 2,32 | 0,63 |
| | | | | | Ср. знач. | $1,06 \pm 0,19$ | $0,45 \pm 0,15$ | $2,39 \pm 0,19$ | $0,75 \pm 0,16$ |
| 5 | 2,13 | 0,91 | 6,28 | 2,52 | 30 | 1,53 | 0,42 | 3,11 | 1,43 |
| | | | | | 35 | 1,73 | 0,69 | 3,10 | 1,15 |
| | | | | | 40 | 1,61 | 0,50 | 3,60 | 1,55 |
| | | | | | Ср. знач. | $1,62 \pm 0,10$ | $0,54 \pm 0,14$ | $3,27 \pm 0,29$ | $1,38 \pm 0,21$ |

шероховатость в два раза превышает высоту клеток стафилококка и сравнима с их размером (рис. 2). Толщина покрытий h , определенная по шкале цвет — толщина покрытия [16], в трех циклах напыления составила 30, 35 и 40 нм. Шероховатость поверхности титановых пластин после осаждения DLC покрытий (Ti + DLC) составила $R_a = 1,85 \pm 0,15$ мкм, что недостоверно отличается от R_a образцов титана без покрытия.

Результаты по накоплению на поверхности титановых и (Ti + DLC) пластин биомассы стафилококка — M_{Ti} , M_{DLC} , количеству жизнеспособных клеток — L_{Ti} , L_{DLC} , а также эти величины после действия варнерина — M_{Ti}^V , M_{DLC}^V , L_{Ti}^V , L_{DLC}^V , соответственно, приведены в табл. 1. Значения для образцов с пленками различной толщины приведены отдельно для каждой из трех партий образцов. Из табл. 1 следует, что изменение толщины DLC от 30 до 40 нм досто-

верно не влияет на приведенные в таблице величины. Поэтому далее для построения зависимостей $f = M(t)$ и $f = L(t)$, где t — время инкубации, использованы средние по всем трем образцам значения для каждого времени инкубации (рис. 3). Из рис. 3 видно, что на поверхности как Ti, так и (Ti + DLC), наиболее быстрый прирост биомассы происходит в первые часы инкубации, а на временном отрезке 1–5 суток величины M и L ведут себя линейно. Присутствие DLC на поверхности титана заметно подавляет рост биомассы (рис. 3а) и снижает количество присутствующих в ней жизнеспособных клеток (рис. 3б).

Более быстрый прирост массы биопленок в первые часы инкубации (рис. 3а) связан, вероятно, с тем, что процесс формирования биопленок определяется адгезией клеток и происходит более интенсивно, когда клетки закрепляются на наиболее “удобных” местах шероховатой поверхности образцов.

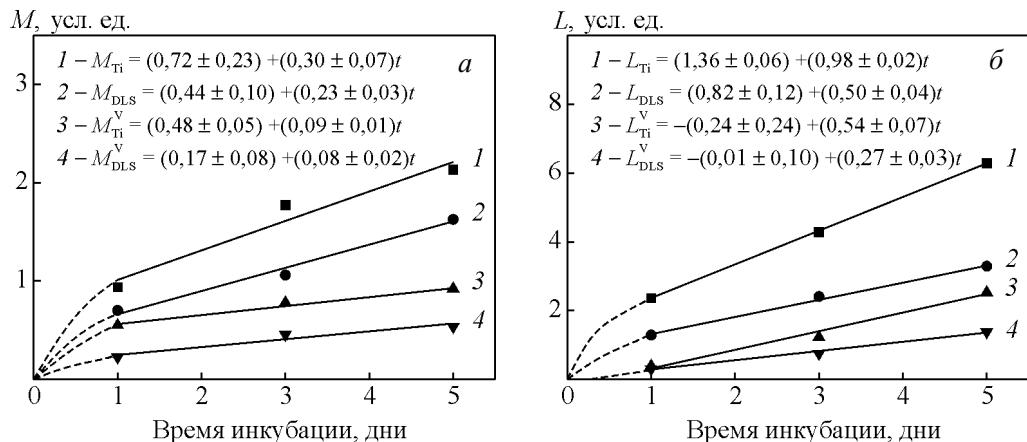


Рис. 3. Зависимости накопления массы биопленки (а) и количества жизнеспособных клеток стафилококка (б) от времени инкубации на титановой пластине (M_{Ti} , L_{Ti}), титановой пластине с DLC пленкой (M_{DLC} , L_{DLC}) и на этих же пластинах после действия варнерина (M_{Ti}^V , M_{DLC}^V , L_{Ti}^V , L_{DLC}^V).

Однако, кроме уменьшения вероятности адгезии клеток на (Ti + DLC), обращает на себя внимание уменьшение пленкой DLC темпа увеличения количества жизнеспособных клеток на линейном участке процесса. Действительно, если $\frac{\partial M_{\text{Ti}}/\partial t}{\partial M_{\text{DLC}}/\partial t} \cong 1$, то

$\frac{\partial L_{\text{Ti}}/\partial t}{\partial L_{\text{DLC}}/\partial t} \cong 2$. Поскольку общая биомасса M включает в себя как клетки, не способные осуществлять метаболические процессы, так и жизнеспособные

клетки, то результат $\frac{\partial M_{\text{Ti}}/\partial t}{\partial M_{\text{DLC}}/\partial t} \neq \frac{\partial L_{\text{Ti}}/\partial t}{\partial L_{\text{DLC}}/\partial t}$ может иметь место только тогда, когда количество жизнеспособных клеток составляет малую часть от всех адгезировавших на поверхность образцов клеток стафилококка. Кроме того, часть жизнеспособных клеток способны дополнительно наращивать биомассу за

счет деления. Тот факт, что $\frac{\partial M_{\text{Ti}}/\partial t}{\partial M_{\text{DLC}}/\partial t} < \frac{\partial L_{\text{Ti}}/\partial t}{\partial L_{\text{DLC}}/\partial t}$ свидетельствует о том, что основную роль в уменьшении количества жизнеспособных клеток в биомассе играет уменьшение вероятности их адгезии на алмазоподобной пленке. Известно, что адгезия клеток зависит не только от шероховатости, но и энергетического состояния поверхности, в частности от соотношения полярной и дисперсионной компонент свободной поверхностной энергии [17]. В [18] было показано, что на водородосодержащих а-С:Н пленках, в которых формируются полярные С-Н связи, количество адгезировавших бактерий было выше по сравнению с DLC. Осаждение DLC пленок на поверхность титана, доля полярной компоненты свободной поверхностной энергии у которых в 1,5 раза ниже, чем у титана [19, 20], приводит к снижению количества адгезировавших бактерий.

Для количественной оценки степени влияния DLC на биомассу бактериальных структур и жизнеспособность клеток стафилококка, а также для ответа на вопрос, влияет ли материал подложки на способность варнерина подавлять биопленки этих клеток, рассмотрим средние по всем трем временам эксперимента отношения следующих величин, значения которых представлены на рис. 4:

$$\frac{M_{\text{DLC}}}{M_{\text{Ti}}}, \frac{L_{\text{DLC}}}{L_{\text{Ti}}}, \frac{M_{\text{DLC}}^V}{M_{\text{Ti}}^V}, \frac{L_{\text{DLC}}^V}{L_{\text{Ti}}^V}, \quad (1)$$

$$\frac{M_{\text{Ti}}^V}{M_{\text{Ti}}}, \frac{L_{\text{Ti}}^V}{L_{\text{Ti}}}, \frac{M_{\text{DLC}}^V}{M_{\text{DLC}}}, \frac{L_{\text{DLC}}^V}{L_{\text{DLC}}}, \quad (2)$$

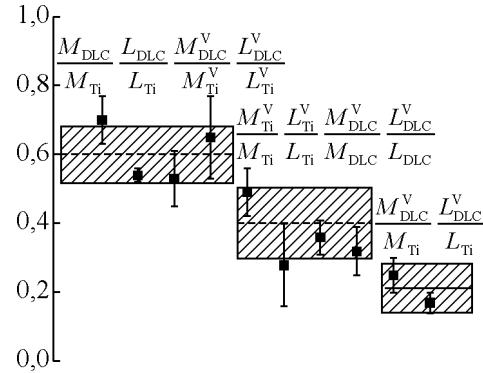


Рис. 4. Значения средних по всем трем временам инкубации отношений биомассы (M) и жизнеспособности клеток (L) на титане (Ti) и алмазоподобной пленке (DLC) до и после действия варнерина (M и L с верхним индексом V).

$$\frac{M_{\text{DLC}}^V}{M_{\text{Ti}}}, \frac{L_{\text{DLC}}^V}{L_{\text{Ti}}}. \quad (3)$$

Как видно из рис. 4, величины $\frac{M_{\text{DLC}}}{M_{\text{Ti}}}$, $\frac{L_{\text{DLC}}}{L_{\text{Ti}}}$ для

разных времен инкубации достоверно не различались. Их среднее значение составило $0,60 \pm 0,08$, то есть DLC пленки независимо от времени инкубации снижают биомассу и жизнеспособность клеток в 1,5–1,9 раз по сравнению с титаном. После действия

варнерина средние значения $\frac{M_{\text{DLC}}^V}{M_{\text{Ti}}^V}$, $\frac{L_{\text{DLC}}^V}{L_{\text{Ti}}^V}$ находятся в тех же пределах. Это означает, что варнерин, активируя аутолитические ферменты стафилококков [21], действует однотипно на бактерии, сорбированные как на поверхности Ti, так и на (Ti + DLC).

Среднее значение величин второй группы

$\left(\frac{M_{\text{Ti}}^V}{M_{\text{Ti}}}, \frac{L_{\text{Ti}}^V}{L_{\text{Ti}}}, \frac{M_{\text{DLC}}^V}{M_{\text{DLC}}}, \frac{L_{\text{DLC}}^V}{L_{\text{DLC}}} \right)$ составляет $0,36 \pm 0,09$, то есть варнерин снижает массу бактериальных пленок и жизнеспособность клеток в 2,2–3,7 раза и на поверхности титана, и на поверхности DLC.

Среднее значение величин третьей группы

$\left(\frac{M_{\text{DLC}}^V}{M_{\text{Ti}}}, \frac{L_{\text{DLC}}^V}{L_{\text{Ti}}} \right)$ составляет $0,21 \pm 0,06$, то есть применение DLC пленок в сочетании с варнерином снижает биомассу бактериальных пленок и жизнеспособность клеток в 3,7–6,7 раз по сравнению с титаном.

Таким образом, модификация поверхности титана тонкими (≤ 50 нм) DLC пленками снижает биомассу стафилококка и количество жизнеспособных клеток в ней в 1,5 – 2 раза и отрицательно не влияет на действие варнерина. Использование модификации титана DLC пленками с последующей выдержкой в варнерине способно снизить биомассу стафилококка и количество жизнеспособных клеток в 4 – 7 раз.

Заключение

Полученные в работе результаты позволяют рекомендовать модификацию поверхности имплантатов на основе титана углеродными алмазоподобными нано-пленками с целью снижения вероятности осложнений, вызванных стафилококковой инфекцией. Необходимо отметить, что использованные методики позволяют получать значения M и L в условных единицах, то есть не дают возможности непосредственно установить количественное соотношение между биомассой всех бактерий. Поэтому обсуждение результатов возможно только на основе математического анализа соотношения величин, полученных одним методом и их зависимости от времени инкубации в содержащей стафилококк среде.

Полученные результаты стимулируют проведение исследовательских работ в направлении полезного использования модификации DLC пленками изделий на основе других материалов, в частности, хирургического инструмента. В данном случае DLC пленки одновременно способны улучшать и трибологические свойства этих изделий [22].

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине”, проект № 12-П-2-1012, программы инициативных проектов УрО РАН, проект № 12-У-4-1003 и РФФИ, проекты № 11-04-96025-р-урал_a и 12-04-01431-а.

Литература

1. Robertson J. Diamond-like amorphous carbon. *Materials Science and Engineering R*, 2002, v. 37, p. 129 – 281.
2. Стрельницкий В.Е. Процессы синтеза и физические свойства алмазоподобных углеродных покрытий, полученных вакуумно-дуговым методом. Труды Харьковской научной ассамблеи ISTFE-15, 2003, с. 104 – 115.
3. Lifshitz Y. Hydrogenfree amorphous carbon films: correlation between growth conditions and properties. *Diamond and Related Materials*, 1996, v. 5, p. 388 – 400.
4. Rubshtain A.P., Trakhtenberg I.Sh., Volkova E.G. et al. The interrelation between structure and mechanical properties of CN_x films ($0 \leq x \leq 0.5$), deposited by arc sputtering of graphite. *Diamond and Related Materials*, 2005, v. 14, p. 1820 – 1823.
5. Трахтенберг И.Ш., Владимиров А.Б., В.А.Югов и др. Аттестация механических свойств твердых алмазоподобных покрытий. *ФММ*, 2005, т. 99(6), с. 103 – 107.
6. Dion I., Roques X., Barquey C. et al. Haemocompatibility of diamond-like carbon. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2003, v. 311, p. 51 – 55.
7. Nitta Y., Okamoto K., Nakatani T. et al. Diamond-like carbon thin film with controlled zeta potential for medical material application. *Diamond and Related Materials*, 2008, v. 17, p. 1972 – 1976.
8. Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш., Макарова Э.Б. и др. Влияние нанокомпозитных азотсодержащих углеродных пленок на формирование костной ткани в пористом титановом имплантате, содержащем гидроксиапатит. *Перспективные материалы*, 2009, № 3, с. 52 – 56.
9. Rubstein A.P., Makarova E.B., Trakhtenberg I.Sh. et al. Osseointegration of porous titanium modified by diamond-like carbon and carbon nitride. *Diamond and Related Materials*, 2012, v. 22, p. 128 – 135.
10. Коробов В.П., Polyudova T.V., Filatova L.B. et al. Activation of Autolytic Activity of *Staphylococcus epidermidis* 33 by a Low_Molecular Weight Cationic Peptide Warnerin, *Microbiology*, 2010, v. 79(1), p. 124 – 126.
11. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Монахов В.И. Анализ чувствительности процессов формирования биопленок *Staphylococcus epidermidis* 33 к некоторым факторам внешней среды. *Вестник Пермского университета. Биология*, 2010, вып. 1(1), с. 59 – 63.
12. Geetha M., Singh A.K., Asokamani R. et al. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. *Progress in Materials Science*, 2009, v. 54, p. 397–425.
13. Трахтенберг И.Ш., Рубштейн А.П., Югов В.А. и др. Влияние температуры на формирование рельефа углеродных алмазоподобных пленок (АПП) и его модификация ионной бомбардировкой, *ФММ*, 2006, т. 102 (6), с. 671 – 677.
14. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Полядова Т.В. Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином, *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2011, т. 13, № 5(3), с. 156 – 159.
15. Zhao G., Rains A.L., Wieland M. et al. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*, 2007, v. 28, p. 2821 – 2829.
16. Trakhtenberg I.Sh., Vykhotets V.B., Arbuzov V.L. et al. DLC coating for video head, *Diamond and Related Materials*, 1999, v. 8, p. 1770 – 1775.
17. Feng B., Weng J., Yang B.C. et al. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblasts. *Biomaterials*, 2003, v. 24, p. 4663 – 4670.
18. Zhou H., Xu L., Ogino A., Nagatsu M. Investigation into the antibacterial property of carbon films. *Diamond and Related Materials*, 2008, v. 17, p. 1416 – 1419.

19. Zhao Q., Lui Y., Abel E.W. Effect of temperature on the surface free energy of amorphous carbon films. *J. of colloid and Interface Science*, 2004, v. 280, p. 174 – 183.
20. Ponsonnet L., Reybier K., Jaffrezic N. et al. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior, *Materials Science and Engineering C*, 2003, v. 23, p. 551 – 560.
21. Hofmann C.M, Bednar K.J, Anderson J.M, Marchant R.E. Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a targeted cationic peptide, *Journal of Biomedical Material Research, Part A*, 2012, v.100A, p. 1061 – 1067.
22. Arbuzov V.L., Vladimirov A.B., Vakhodets V.B. et al. Practical use of strength anticorrosion properties of amorphous carbon thin films. *Diamond and Related Materials*, 1994, v. 3, p. 775 – 778.

Статья поступила в редакцию 26.04.2012 г.

Трахтенберг Илья Шмулевич — Институт физики металлов УрО РАН (г. Екатеринбург), кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области диффузии и физики пленок и покрытий. E-mail: trakhtenberg@imp.uran.ru.

Рубштейн Анна Петровна — Институт физики металлов УрО РАН (г. Екатеринбург), кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник. Специалист в области физики пленок и покрытий. E-mail: rubshtein@imp.uran.ru.

Коробов Владимир Павлович — Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г.Пермь), кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией. Специалист в области физиологии и биохимии микроорганизмов. E-mail: korobov@iegm.ru.

Лемкина Лариса Марковна — Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г.Пермь), кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник. Специалист в области физиологии и биохимии микроорганизмов. E-mail: l.lemkina@iegm.ru.

Морозов Илья Александрович — Институт механики сплошных сред УрО РАН (г.Пермь), кандидат физико-математических наук, научный сотрудник. Специалист в области микромеханики и атомно-силовой микроскопии. E-mail: ilya.morozov@gmail.com.