

УДК 617.5-089.844:678.743.4:579.61]-092.4

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ ФТОРОПЛАСТА-4

Кудло В. В. (*kudloviktor@gmail.com*), Павлюковец А. Ю. (*anastasiayk@mail.ru*),
Жмакин А. И. (*microbiology@grsmu.by*), Домостой Т. С. (*domostoy_ts@gmail.com*)
УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

Цель. Проведение оценки антимикробной эффективности разработанного способа модифицирования поверхности фторопласта-4, осуществленного с помощью лекарственных веществ фотолон и кальция хлорида.

Материал и методы. Выполнено микробиологическое исследование образцов синтетических материалов с использованием штаммов *E. coli* и *S. aureus*, устойчивых к некоторым антибиотикам.

Выводы. У разработанного способа установлено наличие антибактериального действия по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям, связанного с развитием эффекта летальной фотосенсибилизации бактерий.

Ключевые слова: фторопласт, модифицирование поверхности, фотолон, бактерии, лазерное излучение, фотосенсибилизация

Введение

Фторопласты (ПТФЭ, тефлон) – это группа полимеров тетрафторэтилена, которые отличаются от других синтетических материалов наличием особых физико-химических и технических свойств [9]. Им свойственна высокая радиационная, химическая и термическая стойкость, низкий коэффициент трения, а также наличие таких качеств, как высокая упругость и электропроводимость. Благодаря низкой поверхностной энергии, фторопласты практически не смачиваются водой и обладают слабой адгезионной способностью. Это обуславливает широкое применение изделий из фторопласта в промышленности, технике и электронике. Однако для использования в медицине, особенно при имплантации в живой организм, полимеры должны отличаться несколькими другими характеристиками, а именно биоинертностью, прочностью и безопасностью.

Изделия из фторопластов нашли применение в разных отраслях и специальностях медицины. В сердечно-сосудистой хирургии используются сосудистые протезы, фетр для реконструктивных операций на сердце и искусственные клапаны, изготовленные на основе фторопласта [5]. В литературе описано применение лоскутов фторопласта для закрытия дефектов передней брюшной стенки [14]. В ряде исследований показано, что при использовании пористого ПТФЭ в качестве барьерного материала при операциях на органах брюшной полости он уменьшает активность спаечного процесса при закрытии им травмированного участка органа [12].

Модифицирование полимеров медицинского назначения открыло широкие перспективы в решении актуальных проблем практической медицины. Однако в отношении фторопластов возникают трудности в связи с их физико-химическими особенностями. Существующие способы модификации фторопластов разделяются на химические и физические. Однако при использовании физических вариантов не всегда удается достичь равномерности изменения поверхностной структуры исходных материалов. Среди химических способов изменения поверх-

ности изделий из ПТФЭ используется обработка металлороматическими комплексами на основе щелочных металлов и ароматических углеводородов, представляющими собой ион-радикальные соединения [9]. На основе ПТФЭ изготавливают имплантаты, на поверхность которых нанесены алмазоподобные нанопокртия и распределенные наноразмерные частицы серебра. В экспериментах на животных показана биосовместимость и формостабильность материалов [10].

В ранее проведенных клинических исследованиях [2, 7] установлено, что при микробиологической оценке отделяемого из внутрибрюшных абсцессов обнаруживали широкий спектр возбудителей. В 68-71,4% случаев определяли ассоциации 2-3 видов микроорганизмов, а в 24% – анаэробную моноинфекцию. Чаще всего выделяли *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* [3, 6], среди которых были устойчивые к антибиотикам штаммы.

Известно, что характерными проблемами после резекций паренхиматозных органов являются крово- и/или желчеистечение, несвоевременное устранение которых способствует развитию абсцессов [8]. Соответственно, синтетические материалы, имплантируемые в область раны печени, должны обеспечивать профилактику данных осложнений.

Цель исследования: провести микробиологическую оценку разработанного способа модифицирования поверхности фторопласта-4.

Материал и методы

В эксперименте использовали лекарственные вещества: 10% раствор кальция хлорида и «Фотолон» («Белмедпрепараты», Республика Беларусь). Первый из них применяли для придания материалу гемостатических свойств за счет ионов кальция. Известно [1], что они принимают активное участие во внутреннем и внешнем путях свертывания крови. «Фотолон» относят к лекарственным средствам для фотодинамической терапии. Он представляет собой молекулярный комплекс натриевой соли хлорина е6 и поливинилпирролидона. Хлорин е6, основной

действующий компонент фотолон, при облучении светом лазера длиной волны 660-670 нм обеспечивает фотосенсибилизирующий эффект, приводящий к повреждению опухолевых и бактериальных клеток [11].

Модифицирование исходного волокнисто-пористого фторопласта-4 осуществлялось по разработанной нами оригинальной методике (рационализаторское предложение № 1717). Фрагменты фторопласта после обработки помещали в крафт-пакеты. Стерилизацию образцов проводили в газовой камере окисью этилена по стандартной методике.

Микробиологические исследования выполняли на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии имени С. И. Гельберга УО «ГрГМУ». В опыте использовались грамположительные и грамотрицательные бактерии, устойчивые к некоторым антибиотикам (таблица 1). Микроорганизмы были высеваны из гнойных ран пациентов отделений хирургического профиля лечебных учреждений г. Гродно.

Таблица 1. – Антибактериальная чувствительность микроорганизмов, использованных в исследовании

Вид микроорганизма	Антибиотики					
	АКЦ	ЦЗ	ЦФЛ	ЦИП	ГЕН	ЭРИ
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	R	S	S	S	S	R

Примечание: амоксициллин – АКЦ, цефазолин (ЦЗ), цефалексин (ЦФЛ), ципрофлоксацин (ЦИП), гентамицин (ГЕН), эритромицин (ЭРИ); S – микроорганизм чувствителен к данному антибиотику; R – микроорганизм устойчив к данному антибиотику

Производили смывы суточной культуры со скошенного мясопептонного агара каждого вида бактерий 5 см³ стерильной дистиллированной воды при 37°C. Проведено 6 серий экспериментов (таблица 2), в каждой из которых использовали по 8 фрагментов полимерных материалов.

Таблица 2. – Характеристика экспериментальных серий

№ серии	Суть эксперимента
1	Волокнисто-пористый фторопласт-4
2	Фторопласт-4 с модифицированной поверхностью + воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ)
3	Посев <i>Staphylococcus aureus</i> на волокнисто-пористый фторопласт-4
4	Посев <i>Staphylococcus aureus</i> на модифицированный фторопласт-4+НИЛИ
5	Посев <i>Escherichia coli</i> на волокнисто-пористый фторопласт-4
6	Посев <i>Escherichia coli</i> на модифицированный фторопласт-4+НИЛИ

Во всех случаях для нанесения смывов культур бактерий использовали одну и ту же стандартную петлю с целью минимизации возмож-

ного расхождения посевной дозы.

В 1-й серии стерильные фрагменты исходного волокнисто-пористого фторопласта-4 размерами 1×5 см помещали в стерильные чашки Петри. Во 2-й серии аналогичного размера кусочки фторопласта-4 с модифицированной поверхностью помещались в стерильные чашки Петри.

В 3-й серии на поверхность лоскутов стерильного волокнисто-пористого фторопласта-4 размерами 1×5 см наносили смыв культуры *S. aureus* и помещали в стерильные чашки Петри. В 4-й серии на поверхность стерильных лоскутов модифицированного фторопласта-4 аналогичных размеров помещали смыв культуры *S. aureus* и укладывали в стерильные чашки Петри.

В 5-й серии на поверхность лоскутов стерильного волокнисто-пористого фторопласта-4 размерами 1×5 см одной стандартной петлей наносили смыв культуры *E. coli* и размещали в стерильные чашки Петри. В 6-й серии на поверхность лоскутов модифицированного фторопласта-4 аналогичных размеров одной стандартной петлей наносили смыв культуры *E. coli* и укладывали в стерильные чашки Петри.

Во 2-, 4- и 6-й сериях на следующем этапе проводилось облучение каждого из фрагментов НИЛИ аппаратом «Родник-1» со следующими параметрами: красная область спектра, полупроводниковый лазер, длина волны – 0,67±0,02 мкм; время экспозиции – 5 мин.; мощность излучения – 20 мВт.

Все чашки Петри в последующем инкубировали при 37°C в течение 24 часов. После этого в стерильных условиях в каждой из серий фрагменты материалов переносили в отдельные пробирки с 5 см³ мясопептонного бульона. Предварительно производили замер мутности исходных пробирок с помощью денситометра DEN-1 (BioSan, Латвия). Пробирки инкубировали при 37°C в течение 24 часов. На следующий день проводили повторные денситометрические измерения. Для каждой пробирки определяли разницу между исходным и конечным значениями. Согласно инструкции производителя, переводили относительные величины мутности по Мак-Фарланду в концентрации бактерий в среде. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Microsoft Excel 2013 и пакета прикладных программ (ППП) Statistica. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате инкубирования исходного волокнисто-пористого фторопласта-4 в питательной среде изменения мутности по отношению к исходной не установлено (таблица 3).

Во 2-й серии эксперимента увеличение относительной мутности мясопептонного бульона (таблица 3) объясняется диффузией в питательную среду компонентов раствора, использованного при модифицировании поверхности фторопласта-4 (фотолон и кальция хлорида). Во всех случаях показатель равнялся 2,5 единицам Мак-Фарланда.

Таблица 3. – Количественная оценка результатов микробиологического исследования (Me (Q25%; Q75%))

Серия	Результаты	
	Относительная разница мутности, в единицах Мак-Фарланда	Концентрация бактерий, $\times 10^6/\text{мл}$
1	0	0,0 (0,0; 0,0)
2	2,5	2,513 (2,171; 2,854)
3	2,4	716,25 (502,407; 930,093)
4	0,9	277,5* (133,267; 421,733)
5	3,4	1020,0 (930,069; 1109,931)
6	0,4	127,5* (0,0; 279,025)

Примечание: * – статистически достоверное снижение показателя в сравнении с предыдущей серией ($p < 0,05$)

Для расчета конечных результатов в 3-й и 5-й сериях эксперимента использовали следующую формулу:

$$X = (C-A) * 150 \times 106 / 0,5, \text{ где}$$

X – концентрация бактерий в 1 мл питательной среды, $\times 10^6$; C – конечное значение мутности через 24 ч после культивирования полимерного материала в питательной среде с нанесенными на поверхность бактериями; A – исходная мутность мясопептонного бульона; 150×106 – стандартное количество бактерий в 1 мл раствора при значении коэффициента Мак-Фарланда 0,5.

Для расчета изменения относительной мутности питательных сред и среднего количества микроорганизмов в мясопептонном бульоне в 4- и 6-й сериях эксперимента использовали следующую формулу:

$$X = (C-A-B) * 150 \times 106 / 0,5, \text{ где}$$

X – концентрация бактерий в 1 мл питательной среды, $\times 10^6$; C – конечное значение мутности через 24 ч после культивирования полимерного материала в питательной среде с нанесенными на поверхность бактериями; A – исходная мутность мясопептонного бульона; B – повышение мутности за счет лекарственных веществ (2-я серия), использованных для модифицирования поверхности фторопласта-4 (равен 2,5 единицам); 150×106 – стандартное количество бактерий в 1 мл раствора при значении коэффициента Мак-Фарланда 0,5.

Литература

- Алипов, Н. Н. Основы медицинской физиологии : учеб. пособие / Н. Н. Алипов. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : Практика, 2013. – 496 с.
- Барсуков, К. Н. Абсцессы брюшной полости как причина послеоперационного перитонита / К. Н. Барсуков, Г. П. Рычагов // Новости хирургии. – 2011. – № 4. – С. 71-76.
- Белов, С. Г. Интраабдоминальные абсцессы – профилактика и лечение / С. Г. Белов, Т. И. Тамм, А. П. Захарчук // Международный медицинский журнал. – 2003. – № 4. – С. 69-71.

Как видно из таблицы 3, применение комбинации из модифицированного фторопласта-4 и НИЛИ (4-я серия) приводит к достоверному снижению мутности и средней концентрации *S. aureus* в питательной среде в 2,58 раза ($p < 0,05$) по сравнению с применением исходного волокнисто-пористого фторопласта-4 (3-я серия), обсемененного аналогичным количеством микроорганизмов.

В 6-й серии эксперимента отмечено уменьшение относительной мутности мясопептонного бульона и среднего количества *E. coli* в нем в 8,0 раз ($p < 0,05$) по сравнению с 5-й серией.

Известно, что использование по отдельности фотосенсибилизатора фотолон и светового излучения не может обеспечить антимикробного эффекта [4]. Полученные в нашем исследовании результаты, вероятно, связаны с процессом летальной фотосенсибилизации бактерий [13, 15]. Основан он на том, что молекула фотосенсибилизатора, поглотив квант света, переходит в возбужденное состояние и вступает в фотохимические реакции двух типов. В первом случае после взаимодействия непосредственно с молекулами биологического субстрата образуются свободные радикалы, во втором – происходит взаимодействие возбужденного фотосенсибилизатора с молекулой кислорода, в результате образуется синглетный кислород, который является цитотоксическим для бактериальных клеток.

Выводы

- Обработка полимеров на основе фторопласта-4 по стандартной методике в газовой камере окисью этилена обеспечивает полную стерильность материалов.
- Комбинированное применение фторопласта-4 с модифицированной поверхностью и НИЛИ проявляет антибактериальный эффект как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов.
- На основании данных микробиологических исследований установлено, что модифицированный фторопласт-4 с нанесенным на его поверхность фотосенсибилизатором фотолоном и кальция хлоридом, в комбинации с низкоинтенсивным лазерным излучением красного спектра действия даже при однократной обработке обладает противомикробным эффектом, снижает степень инфицирования зоны имплантации, может предотвратить развитие гнойно-септических осложнений при его применении для закрытия резецированной поверхности печени.

References

- Alipov, N. N. Osnovy medicinskoj fiziologii : ucheb. posobie / N. N. Alipov. – 2-e izd., ispr. i dop. – M. : Praktika, 2013. – 496 s.
- Barsukov, K. N. Abscessy brjushnoj polosti kak pricina posleoperacionnogo peritonita / K. N. Barsukov, G. P. Rychagov // Novosti hirurgii. – 2011. – № 4. – S. 71-76.
- Belov, S. G. Intraabdominal'nyye abscessy – profilaktika i lechenie / S. G. Belov, T. I. Tamm, A. P. Zaharchuk // Mezhdunarodnyj medicinskij zhurnal. – 2003. – № 4. – S. 69-71.

4. Буравский, А. В. Светодиодное излучение: результаты антимикробного фотодинамического воздействия в эксперименте *in vitro* / А. В. Буравский, Е. В. Баранов, Г. А. Скороход // Новые технологии в медицине. – 2014. – № 4. – С. 80-86.
5. Каниюков, В. Н. Материалы для современной медицины : учеб. пособие / В. Н. Каниюков [и др.]. – Оренбург : ГОУ ОГУ, 2004. – 113 с.
6. Кипшидзе, А. А. Особенности гнойно-септического процесса у больных с бактериальными абсцессами печени / А. А. Кипшидзе // Таврический медико-биологический вестник. – 2011. – Т. 14, № 4, ч. 1. – С. 83-85.
7. Малков, И. С. Диагностика и лечение послеоперационных интраабдоминальных осложнений / И. С. Малков, А. П. Киршин, Э. К. Салахов // Практ. медицина. – 2010. – № 8. – С. 66-69.
8. Нартайлаков, М. А. Хирургическое лечение кист печени / М. А. Нартайлаков. – Уфа : Изд-во БГМУ, 1997. – 52 с.
9. Паншин, Ю. А. Фторопласты / Ю. А. Паншин, С. Г. Малкевич, Ц. С. Дунаевская. – Л. : Химия, 1978. – 230 с.
10. Ситников, В. П. Новые технологии использования протезов из фторопласта с алмазоподобным нанопокрытием в хирургии уха (экспериментальное исследование) / В. П. Ситников [и др.] // Омский научный вестник. – 2014. – № 2 (134). – С. 75-76.
11. Федорук, С. Л. Исследование термо- и фотодеструкции хлорина е6 и лекарственного средства Фотолон / С. Л. Федорук [и др.] // Вестник фармации. – 2014. – Т. 64, № 2. – С. 70-74.
12. Haney, A. F. Removal of surgical barriers of expanded polytetrafluoroethylene at second-look laparoscopy was not associated with adhesion formation / A. F. Haney // Fertility and sterility. – 1997. – Vol. 68, № 4. – P. 721-723.
13. Hope, C. K. Lethal photosensitization of porphyromonas gingivalis by their endogenous porphyrins under anaerobic conditions : an in vitro study / C. K. Hope [et al.] // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2013. – Vol. 10, № 4. – P. 677-682.
14. Seaman, D. S. Use of polytetrafluoroethylene patch for temporary wound closure after pediatric liver transplantation / D. S. Seaman [et al.] // Transplantation. – 1996. – Vol. 62, № 7. – P. 1034-1036.
15. Vahabi, S. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on streptococcus mutans : an in vitro study / S. Vahabi [et al.] // J. Dent. (Tehran). – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 48-54.
4. Buravskiy, A. V. Svetodiodnoe izluchenie: rezultaty antimikrobnogo fotodinamicheskogo vozdeystviya v eksperimente in vitro / A. V. Buravskiy, E. V. Baranov, G. A. Skorohod // Novye tehnologii v medicine. – 2014. – № 4. – S. 80-86.
5. Kanjukov, V. N. Materialy dlja sovremennoj mediciny : ucheb. posobie / V. N. Kanjukov [i dr.]. – Orenburg : GOU OGU, 2004. – 113 s.
6. Kipshidze, A. A. Osobennosti gnojno-septicheskogo processa u bol'nyh s bakterial'nymi abscessami pecheni / A. A. Kipshidze // Tavricheskij mediko-biologicheskij vestnik. – 2011. – Vol. 14, № 4, ch. 1. – S. 83-85.
7. Malkov, I. S. Diagnostika i lechenie posleoperacionnyh intraabdominal'nyh oslozhnenij / I. S. Malkov, A. P. Kirshin, Je. K. Salahov // Prakt. medicina. – 2010. – № 8. – S. 66-69.
8. Nartaylakov, M. A. Hirurgicheskoe lechenie kist pecheni / M. A. Nartaylakov. – Ufa : Izd-vo BGMU, 1997. – 52 s.
9. Panshin, Ju. A. Ftoroplasty / Ju. A. Panshin, S. G. Malkevich, C. S. Dunaevskaja. – L. : Himija, 1978. – 230 s.
10. Sitnikov, V. P. Novye tehnologii ispol'zovanija protezov iz ftoroplasta salmazopodobnym nanopokrytiem v hirurgii uha (jeksperimental'noe issledovanie) / V. P. Sitnikov [i dr.] // Omskij nauchnyj vestnik. – 2014. – № 2 (134). – S. 75-76.
11. Fedoruk, S. L. Issledovanie termo- i fotodestrukcii hlorina e6 i lekarstvennogo sredstva Fotolon / S. L. Fedoruk [i dr.] // Vestnik farmacii. – 2014. – T. 64, № 2. – S. 70-74.
12. Haney, A. F. Removal of surgical barriers of expanded polytetrafluoroethylene at second-look laparoscopy was not associated with adhesion formation / A. F. Haney // Fertility and sterility. – 1997. – Vol. 68, № 4. – P. 721-723.
13. Hope, C. K. Lethal photosensitization of Porphyromonas gingivalis by their endogenous porphyrins under anaerobic conditions : an in vitro study / C. K. Hope [et al.] // Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2013. – Vol. 10, № 4. – P. 677-682.
14. Seaman, D. S. Use of polytetrafluoroethylene patch for temporary wound closure after pediatric liver transplantation / D. S. Seaman [et al.] // Transplantation. – 1996. – Vol. 62, № 7. – P. 1034-1036.
15. Vahabi, S. The effect of antimicrobial photodynamic therapy with radachlorin and toluidine blue on streptococcus mutans : an in vitro study / S. Vahabi [et al.] // J. Dent. (Tehran). – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 48-54.

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF FLUOROPLAST-4 SURFACE MODIFICATION

Kudlo V. V., Pavlyukovets A. Yu., Zhmakin A. I., Domostoy T. S.

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

Objective. The aim of the research is to evaluate antimicrobial efficiency of the developed method of fluoroplastic-4 surface modification, which was carried out by using drugs of photolon and calcium chloride.

Material and methods. Microbiological examination of samples of synthetic materials was carried out with the use of antibiotic-resistant strains of E. coli and S. aureus.

Conclusions. An antibacterial effect towards gram-positive and gram-negative bacteria of this method associated with the development of the effect of bacterial lethal photosensitivity was determined.

Keywords: *teflon, surface modification, photolon, bacteria, laser radiation, photosensitization.*

Поступила: 21.11.2016

Отрецензирована: 05.12.2016