

Д.А. Крупень, Е.Р. Паршикова
**ОЦЕНКА IN VITRO АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ПОКРЫТИЙ
ДЛЯ ХИРУРГИЧЕСКИХ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА
И ПЕКТИНА**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. А.В. Жура
Кафедра хирургических болезней
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск
УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», г. Минск

D.A. Krupen, E.R. Parshikova
**IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF COATINGS
FOR SURGICAL IMPLANTS BASED ON CHITOSAN AND PECTIN**

Tutor: Ph.D., associate professor Zhura A.V.
Department of Surgical Diseases
Belarusian State Medical University, Minsk
City clinical emergency hospital, Minsk

Резюме. Данное исследование призвано расширить область применения сетчатых имплантов в хирургии.

Ключевые слова: сетчатые импланты, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, воспалительный процесс в ране, хитозан, пектин, мультислойное нанопокрывтие.

Resume. This research is intended to expand the scope of mesh implants in surgery.

Keywords: mesh implants, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, inflammation in the wound, chitosan, pectin, multilayer nanocoating.

Актуальность. Современные принципы хирургического лечения грыж включают в себя использование ненатяжных методов закрытия грыжевого дефекта, позволяющих минимизировать натяжение тканей, а также эффективно предотвратить развитие рецидивов. Вместе с тем, ненатяжные методы пластики имеют ряд особенностей и ограничений, связанных с использованием дополнительных пластических материалов, таких как сетчатые импланты и протезы. Относительным противопоказанием для установки хирургических сеток служит наличие воспалительного процесса в ране. При контаминации раны, например, при ущемленной грыже с некрозом кишки, установка сетки несет определенные риски воспалительных послеоперационных осложнений, которые приводят к длительно текущему гнойному процессу, купировать который без удаления трансплантата в настоящий момент практически невозможно.

Одним из вариантов предупреждения таких осложнений может стать модификация сетчатых имплантов мультислойными нанопокрывтиями с антибактериальными антиадгезивными и/или бактерицидными свойствами.

Цель: оценить *in vitro* антимикробные свойства хирургических имплантов на основе хитозана и пектина.

Задачи:

1. Провести анализ результатов на микрофотографиях стёкол, полученных в результате исследования

2. На основе подсчёта количества бактерий на микрофотографиях разных нанопокровов выявить, которое из них обладает наибольшим бактерицидным эффектом.

Материалы и методы. В ходе работы были изготовлены четыре варианта покрытий на основе хитозана, а также пектина с включением молекулярного серебра:

- 1) хитозан-пектин,
- 2) хитозан-Ag-пектин,
- 3) хитозан-пектин-Ag,
- 4) хитозан-Ag-пектин-Ag.

Как контрольные образцы использовали нестерильные стекла без покрытий.

Исследуемые, контрольные образцы помещали в пробирки с триптиказо-соевым бульоном (ТСБ), содержащим взвеси тест-культур грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*) в концентрации $1,0 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Тару с ТСБ оставляли при температуре 37°C на 1 сутки. После образцы пинцетом извлекали из ТСБ, после чего для удаления излишков суспензионной бактериальной культуры погружали в стерильный физиологический раствор. Сушили образцы в естественных условиях, фиксировали препараты метанолом в течение 10 минут.

Проводился визуальный подсчет количества клеток в выбранных полях зрения площадью 1000 мкм², которые предварительно сохраняли в виде серий микрофотографий. При подсчёте учитывались клетки с сохраненной формой и структурой, а также клетки с нарушенной целостностью стенки. После подсчета каждой микрофотографии по каждому образцу высчитывалось среднее количество клеток на 1000 мкм².

Статистическая обработка данных проводилась в программах Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0.

Результаты и их обсуждение. Используя электронную микроскопию видно, что контрольные образцы были практически полностью покрыты микробными клетками, а количество повреждённых клеток было незначительное (3%). В отношении *E.coli* все разработанные образцы покрытий показали антибактериальное действие ($p < 0,05$). Для покрытия хитозан-пектин отмечалось уменьшение количества бактерий на 39,64% по сравнению с контролем. Для покрытия хитозан-Ag-пектин имело место снижение количества бактерий на 43,68% по сравнению с контролем. Такое снижение количества клеток можно гипотетически связать с антиадгезивным действием полисахаридного нанопокровов. Стоит отметить, что доля поврежденных клеток (61% и 65% соответственно) была значительно выше на образцах с покрытием, по сравнению с контролем (3%), основываясь на чём можно сделать вывод о неблагоприятной среде обитания для клеток ($p < 0,05$). У образца, покрытого хитозан-Ag-пектин-Ag уменьшилось количество бактериальных клеток на 65,51% по сравнению с контрольной группой образцов ($p < 0,05$). При покрытии образца хитозан-пектин-Ag среднее количество бактериальных клеток упало на 85,09% по сравнению с контрольным образцом ($p < 0,001$). Таким образом, наилучших результатов удалось достичь при применении покрытий со встроенным в состав серебром в конце молекулы.

В отношении *S.aureus* наилучший результат показало покрытие хитозан-пектин, при котором среднее количество клеток на 1000 мкм² было в 23,97 раза (на 95,83%) меньше, чем в контроле ($p < 0,001$).

Средние в этой группе показатели были у покрытий хитозан-пектин-Ag и хитозан-Ag-пектин-Ag: снижение в 1,4 (на 28,23%) и 1,65 раза (на 39,48%) соответственно по сравнению с контрольными образцами ($p > 0,05$).

В случае же с покрытием хитозан-Ag-пектин антибактериальное действие практически не отмечается. Для этого покрытия снижение количества клеток составило 1,16 раз, что меньше всего на 13,57%, если сравнивать с контрольными образцами. (таблица 1; рисунок 1, 2).

Табл. 1. Оценка антимикробных свойств мультислойных нанопокровов на основе хитозана и пектина

	Контроль	хитозан-пектин	хитозан-Ag-пектин	хитозан-пектин-Ag	хитозан-Ag-пектин-Ag
	Количество бактерий на 1000 мкм ² , Значение ± стандартное отклонение				
<i>E. coli</i>	305±65	185±30	170±50	45±5	95±25
Количество повреждённых клеток <i>E. coli</i> , %	2,67%	60,69%	64,71%	85,17%	52,09%
<i>S. aureus</i>	1030±90	45±30	890±140	740±150	625±25
Количество повреждённых клеток <i>S. aureus</i> , %	0%	95,83%	13,57%	28,23%	39,48%

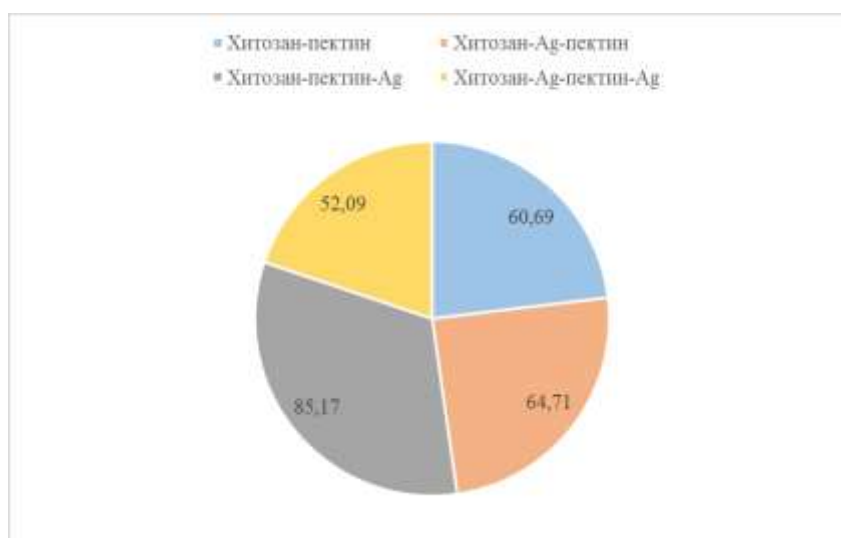


Рис. 1 – Количество повреждённых клеток *E.coli*. на 1000 мкм², %

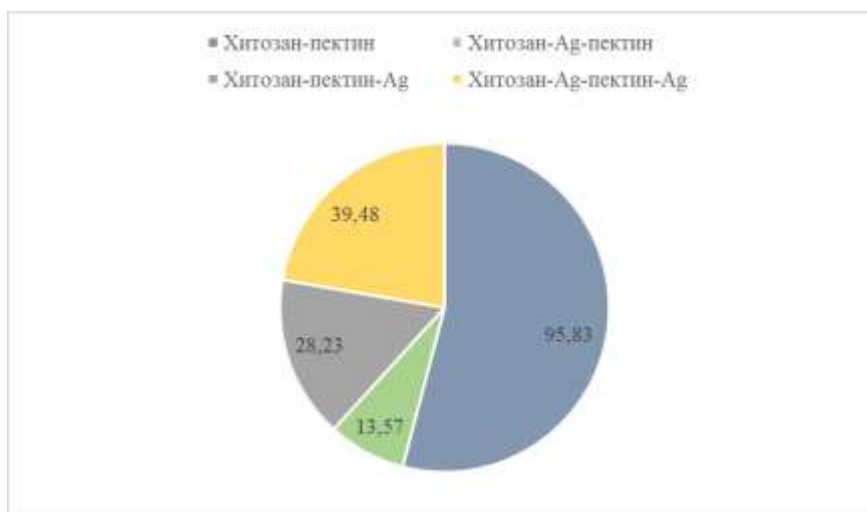


Рис. 2 – Количество повреждённых клеток *S.aureus*. на 1000 мкм², %

Выводы: таким образом, покрытие хитозан-пектин-Аг показало статистически значимые результаты при использовании против как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов и, как следствие, может рассматриваться как перспективное потенциальное антибактериальное покрытие для хирургических имплантов.

Проанализировав полученные результаты, можно сделать следующие выводы:

1 наибольшей эффективностью против представителя грамотрицательной флоры *E.coli* среди 4 разработанных вариантов покрытий обладает мультислойное нанопокрывтие хитозан-пектин-Аг;

2 при использовании покрытия хитозан-пектин-Аг среднее количество микроорганизмов *E.coli* было на 85,09% меньше, чем в контрольном образце ($p < 0,001$)

3 отношении *S.aureus* как представителя грамположительной флоры наилучший результат показала пленка хитозан-пектин;

4 среднее количество клеток *S.aureus* на 1000 мкм² при использовании пленки хитозан-пектин было в 23,97 раза (на 95,83 %) меньше, чем в контрольном образце ($p < 0,001$).

Литература

1. Arciola, C. R. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion / C. R. Arciola, D. Campoccia, L. Montanaro // Microbiology. – 2018. – Vol.16. – P. 397–409.
2. Zhu, X. Layer-by-layer assemblies for antibacterial applications / X. Zhu, X. Jun Loh // Biomater. Sci. – 2015. – Vol.12. – P. 1505–1518.
3. Banerjee, I. Antifouling Coatings: Recent Developments in the Design of Surfaces That Prevent Fouling by Proteins, Bacteria, and Marine Organisms / I. Banerjee, R. C. Pangule, R. S. Kane // Adv. Mater. – 2011. – Vol.114. – P. 8883–8942.
4. Имплантат-ассоциированные инфекции, связанные с проблемой биопленкообразования / Л.С. Бузолева [и др.]. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №5. – С. 10–18.
- 5 Жура, А. В. Исследование биологической активности мультислойных полисахаридных покрытий в эксперименте / А. В. Жура, В. Г. Козлов, С. И. Третьяк // Актуальные вопросы и современные подходы в оказании хирургической помощи в Республике Беларусь : сб. материалов респ. науч. конф. с международным участием и XXVIII Пленума Правления Белорусской ассоциации хирургов – Минск, 2021. – С. 132–133.