

УДК: 615.462.03.616.314–089.28:546.821].015.8

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОБНОЙ ПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS 33* НА ПОЛИМЕРНОМ СТОМАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ С ВВЕДЕННЫМ В ЕГО СОСТАВ НАНОРАЗМЕРНЫМ ДИОКСИДОМ ТИТАНА

Рогожников Г. И.¹, Шулятникова О. А.¹, Коробов В. П.², Лемкина Л. М.²

¹ ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е. А. Вагнера» Минздрава России, г. Пермь, Россия

² Лаборатория биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь, Россия

Аннотация

Предмет. Проблема образования микробных пленок на конструкционных материалах не теряет своей актуальности несмотря на современный уровень развития стоматологического материаловедения. При этом наибольший риск представляют пациенты с приобретенными дефектами и деформациями челюстно-лицевой области. В большинстве случаев это связано с затруднением проведения гигиенических мероприятий и сложной топографией дефекта и, соответственно, сложно-челюстного протеза. В статье рассматривается вариант ингибирования образования микробной пленки на базисном конструкционном материале путем модификации его состава.

Цель. Экспериментально-лабораторное изучение возможности ингибирования образования биопленки *Staphylococcus epidermidis 33* на полиамидном конструкционном материале Vertex ThermoSens при введении в его состав наноразмерного диоксида титана.

Методология. Исследование роста микробных биопленок проводили на образцах полиамидного материала Vertex ThermoSens. Изучение биомассы пленок проводили путем измерения связывания клетками бактерий и матриксом биопленок красителя – генцианвиолета. Количество жизнеспособных клеток в биопленках выявляли по уровню восстановления водорастворимого тетразолия. Последующую детекцию оптической плотности измеряли на спектрофотометре.

Результаты. Экспериментальные образцы Vertex ThermoSens с введенным в состав наноразмерным диоксидом титана показали большую резистентность в отношении общей биомассы и живых клеток после 48-часового культивирования микробной пленки *Staphylococcus epidermidis 33*, имея достоверное статистически значимое снижение в два и более раза.

Выводы. Включение в состав базисного конструкционного материала Vertex ThermoSens наноразмерного диоксида титана в количестве до 1 мас.% приводит к угнетению пленкообразующей способности *Staphylococcus epidermidis 33* на поверхности экспериментальных образцов как в отношении общей биомассы, так и живых клеток.

Данный факт имеет практическое значение для использования полученных результатов эксперимента в клинической стоматологии в качестве способа ингибирования образования микробной пленки на стоматологическом базисном полимерном материале на этапе изготовления съёмных конструкций сложно-челюстных протезов и аппаратов.

Ключевые слова: *Staphylococcus epidermidis 33*, диоксид титана, полиамид, микробная пленка, ингибирование

Адрес для переписки:

Оксана Александровна ШУЛЯТНИКОВА

к.м.н., доцент, кафедра ортопедической стоматологии,
Пермский государственный медицинский университет
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь,
Российская Федерация
Адрес для переписки: 614007, г. Пермь, ул. Революции, 18-15.
Тел.: 8 (902)838-62-22, 8 (342)233-08-97
anasko06@mail.ru

Correspondence address:

Oksana A. SHULIATNIKOVA

Doctor of Philosophy of Medicine, Associate Professor of
the Dentistry Department of the State Budgetary Institution
of Higher Professional Education of the Perm State Medical
University Named After Academician E.A. Wagner, Perm,
Russian Federation
614007, Perm, Revolyucii, 18-15.
Тел.: +7 (902)838-62-22, +7 (342)233-08-97
anasko06@mail.ru

Образец цитирования:

Рогожников Г.И., Шулятникова О.А., Коробов В.П.,
Лемкина Л.М.
«Экспериментально-лабораторное исследование образования
микробной пленки *Staphylococcus Epidermidis 33* на полимерном
стоматологическом материале с введенным в его состав
наноразмерным диоксидом титана»
Проблемы стоматологии, 2017, Т. 13, № 1. С. 41-45
doi: 10.18481/2077-7566-2017-13-1-41-45
© Рогожников Г.И. и соавт., 2017

For citation:

Rogozhnikov G.I., Shulyatnikova O.A., Korobov V.P.,
Lemkina L.M.
«Effect of the introduction of nanodimensional titanium dioxide
on the formation of *Staphylococcus epidermidis 33* films grown
on vertex thermosens substrates»
The actual problems in dentistry,
2017, Vol. 13, № 1, pp. 41-45
DOI: 10.18481/2077-7566-2017-13-1-41-45

EFFECT OF THE INTRODUCTION OF NANODIMENSIONAL TITANIUM DIOXIDE ON THE FORMATION OF STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS 33 FILMS GROWN ON VERTEX THERMOSENS SUBSTRATES

Rogozhnikov G. I.¹, Shulyatnikova O. A.¹, Korobov V. P.², Lemkina L. M.²

¹ Perm State Medical University of the Academician E. A. Wagner, Perm, Russian Federation

² Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

Abstract

Background The problem of formation of microbial films on denture base materials remains relevant despite the high level of dentistry materials science. At the same time, patients with acquired defects and deformations of the maxillofacial area have the greatest risk of formation of biofilms on constructional material. In most cases, this risk is connected with the difficulty of maintaining hygiene in situations with complicated defect topographies and correspondingly complex maxillary prostheses. In this paper, the possibility of inhibiting the formation of microbial films on basic constructional materials by modifying their structure is considered.

Objectives To experimentally study the possibility of inhibiting the formation of Staphylococcus epidermidis 33 biofilms on the polyamide constructional material Vertex ThermoSens by introducing nanodimensional titanium dioxide into its structure.

Methods Microbial biofilms were grown on Vertex ThermoSens polyamide base material samples. At the same time, half of the experimental samples contained nanodimensional titanium dioxide in the amount of 1 mas. % in their structure. The study of film biomass was carried out by measuring bacterial cell adhesion and biofilm matrix using gentian violet. The quantity of living cells in biofilms was identified according to the restoration level of water-soluble tetrazolium. The subsequent detection of optical density was carried out using a spectrophotometer.

Results The experimental samples of Vertex ThermoSens with nanodimensional titanium dioxide introduced into their structure showed strong resistance with regard to overall biomass and living cells following 48-hour cultivation of Staphylococcus epidermidis microbial 33 films, demonstrating a statistically significant decrease by two times or more, compared to the same constructional materials without any change to their structure.

Conclusions Introduction of nanodimensional titanium dioxide into the structure of denture base material Vertex ThermoSens in the amount of up to 1 mas. % leads to the suppression in the film-forming ability of Staphylococcus epidermidis 33 on the surface of experimental samples with regard to overall biomass and living cells.

Our experimental results have practical application in clinical dental practice as a means of inhibiting the formation of microbial films on denture base materials at the stage of manufacture of maxillary prostheses with complex topographies.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis 33, nanodimensional titanium dioxide, polyamide denture base materials, microbial film, inhibition*

Введение

Несмотря на современный уровень развития стоматологического материаловедения в большинстве случаев съёмные конструкции, выполняются из акриловых пластмасс [1], не лишённых ряда недостатков, которые проявляются в процессе пользования съёмными конструкциями протезов [2]. Широкое распространение акриловых пластмасс в практической деятельности врача стоматолога-ортопеда объясняется их удовлетворительными физико-механическими и эстетическими характеристиками, небольшой стоимостью и технически несложным процессом изготовления. Однако, когда речь заходит об изготовлении съёмных сложно-челюстных протезов и аппаратов, встает вопрос о повышенных требованиях к конструкционному материалу в отношении его физико-механических характеристик и способности к микробной адгезии. При этом следует учитывать, что в большинстве случаев уровень гигиены у пациентов с приобретенными дефектами и деформациями затруднен в силу сложности топографии дефекта и восполняющего его протеза. В связи с этим, поиск

возможности ингибирования образования микробной пленки на базисном конструкционном материале сложно-челюстного протеза вызывает определенный интерес.

При изучении физико-механических, эстетических и технологических характеристик базисных материалов, представленных на стоматологическом рынке, наше внимание привлекли полиамидные термопласты, которые в случае изготовления конструкций протезов не обладают свойствами аллергена, так как не имеют в своём составе остаточного мономера, а повышенная прочность и негигроскопичность увеличивают сроки их эксплуатации. Предварительно проведенные нами исследования о возможности ингибирования образования биопленок на конструкционном материале свидетельствуют о том, что наноструктурированный диоксид титана обладает такими свойствами [3].

В связи с этим, нами предложено введение в состав базисного полиамидного материала наноразмерного диоксида титана для ингибирования образования микробной пленки на поверхности конструкций.

Целью данной работы явилось экспериментально-лабораторное изучение возможности ингибирования образования биопленки на полиамидном конструкционном материале при введении в его состав наноразмерного диоксида титана.

Материалы и методы исследования

Образцы для исследований в количестве 40 шт. изготавливали на кафедре ортопедической стоматологии, которые представляли собой пластинки размерами 10×5×2 мм (рис. 1) и были выполнены из полиамидного материала Vertex ThermoSens (Vertex-Dental B. V., Нидерланды; ISO-Сертификат 9001:2008) по технологии термолитьевого пресования, которое осуществляли в автоматическом режиме на оборудовании Advanced technologies, Valplast.ru. При этом, половина образцов в своём составе содержала наноразмерный диоксид титана в количестве до 1 масс.% (заявка на изобретение № 2016144010 от 08.11.2016 г.).



Рис. 1. а) Образцы для исследования пленкообразования *Staphylococcus epidermidis* 33: а) из полиамида Vertex ThermoSens; б) из полиамида Vertex ThermoSens, с введённым наноструктурированным диоксидом титана

Fig. 1. a) Samples for a research of film formation *Staphylococcus epidermidis* 33: a) from Vertex ThermoSens polyamide; b) from Vertex ThermoSens polyamide, with the entered nanostructured dioxide of the titan

Источник: данные авторского исследования
Source: Data of an author's research

Наноразмерный порошок диоксида титана получали на кафедре «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета, путем синтеза из водно-этанольных растворов хлорида титана (III) обратным осаждением аммиаком, размер частиц составлял 25–35 нм (д. т. н., проф. С. Е. Порозова).

Исследование роста биопленок *S. epidermidis* 33 на образцах проведено в Лаборатории биохимии раз-

вития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь).

До начала экспериментов все образцы помещали по одному в индивидуальные стеклянные флаконы и подвергали стерилизации автоклавированием. В предварительном эксперименте без формирования микробных пленок изучали связывание красителей с пластинками контрольной и опытной группы.

В ходе эксперимента все образцы были разделены на две группы:

1 группа – контрольная (n=20) для определения сорбции красителей поверхностью термопласта. Из них образцы из термопласта Vertex ThermoSens (n=10) и образцы из Vertex ThermoSens с введенным состав наноразмерным диоксидом титана (n=10). В стерильные флаконы со стерильными образцами вносили по 2 мл богатой питательной среды LB. Флаконы помещали в термостат при температуре 37°C на 48 часов, затем дважды промывали 10 mM фосфатным буфером (pH=7,2) и окрашивали.

2 группа – экспериментальная (n=20) – образцы из термопласта Vertex ThermoSens (n=10) и образцы из Vertex ThermoSens с введенным состав наноструктурированным диоксидом титана (n=10). Для изучения процессов пленкообразования *S. epidermidis* 33 во флаконы со стерильными образцами добавляли по 2 мл инокулума *S. epidermidis* 33 в среде LB (10⁷ КОЕ/мл), помещали их в термостат при температуре 37°C на 48 час. без смены среды. После инкубации планктонную культуру удаляли, таблетки переносили в стерильные флаконы и дважды промывали 10 mM фосфатным буфером, после чего помещали их в новые флаконы и окрашивали.

Образцы окрашивали двумя способами для определения биомассы и количества живых клеток в биопленке. Изучение биомассы пленок проводили путем измерения связывания клетками бактерий и матриксом биопленок красителя – 0,1%-ный раствор генцианвиолет. Несвязанный краситель удаляли путем двукратного промывания буфером с последующей экстракцией связавшегося красителя 96% этанолом в течении 12 час. и детекцией оптической плотности (OD) спиртового экстракта на спектрофотометре PD-303 (APEL, Япония) при длине волны 570 нм в кюветах на 1 см.

Количество жизнеспособных клеток в биопленках выявляли по уровню восстановления водорастворимого тетразолия MTS в системе Cell Proliferation Assay («Promega», США) по прописи фирмы-производителя.

Количество образовавшегося формазана измеряли на спектрофотометре СФ РД-303 при длине волны 490 нм в кюветах на 1 см.

Эксперимент проведен трехкратно, полученные экспериментальные данные выражали в условных единицах (УЕ). В обеих группах определяли биомассу и количество живых клеток в биопленке

путем окрашивания, изучения и измерения способами по вышеописанным методикам в данной главе.

Статистическую обработку, полученных результатов эксперимента проводили с помощью программного обеспечения «Prism 6» (GraphPad Software Inc., США) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверность, полученных результатов, оценивали при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Связывание формазана контрольной пластинкой (Vertex ThermoSens) составило 0,224 УЕ, экспериментальной (Vertex ThermoSens+наноразмерный диоксид титана) – 0,227 УЕ; связывание генцианвиолета в контроле – 0,59 УЕ, в эксперименте – 0,56 УЕ.

Полученные и статистически обработанные результаты исследования пленкообразующих свойств *Staphylococcus epidermidis* 33 после 48 час. инкубации на экспериментальных образцах базисного полиамидного конструкционного материала Vertex ThermoSens, в том числе с введенным в состав наноразмерным диоксидом титана представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание живых клеток и общая биомасса пленок *Staphylococcus epidermidis* 33 через 48 часов роста на экспериментальных образцах из Vertex ThermoSens с введенным наноразмерным диоксидом титана

Table 1

Content of living cells and the general biomass of films *Staphylococcus epidermidis* 33 in 48 hours of growth on experimental samples from Vertex ThermoSens with the entered nanodimensional dioxide of the titan

Красители	Vertex ThermoSens (УЕ)	Vertex ThermoSens+наноразмерный диоксид титана (УЕ)
Биопленки (48 час.) <i>Staphylococcus epidermidis</i> 33 (M±m)		
Сорбция формазана в среде LB (живые клетки)	0,235±0,04 p<0,005	0,144±0,01 p<0,05
Сорбция генцианвиолета в среде LB (общая биомасса)	0,36±0,05 p<0,005	0,16±0,02 p<0,005

Источник: данные авторского исследования
 Source: Data of an author's research

Для большей наглядности результаты эксперимента сведены в сравнительном аспекте в диаграмму и представлены на рис. 2.

Из представленных данных видно, что, экспериментальные образцы Vertex ThermoSens с введенным в состав наноразмерным диоксидом титана показали большую резистентность в отношении общей биомассы и живых клеток после 48 часового культиви-

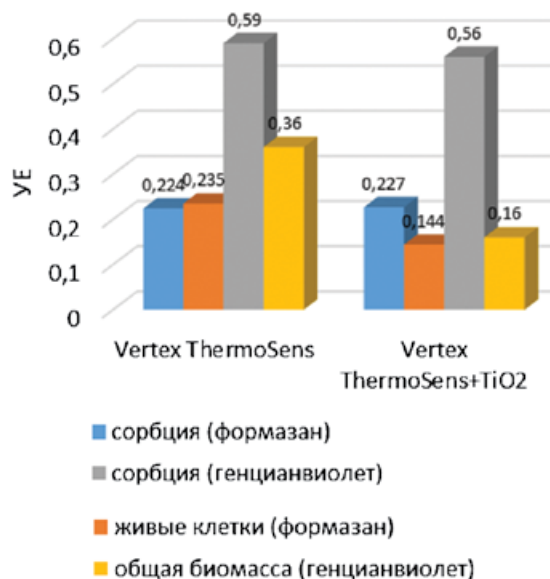


Рис. 2. Сравнение содержания живых клеток и общей биомассы пленок *Staphylococcus epidermidis* 33 через 48 час. роста на экспериментальных образцах из Vertex ThermoSens

Fig. 2. Comparison of content of living cells and the general biomass of films *Staphylococcus epidermidis* 33 in 48 hours of growth on experimental samples from Vertex ThermoSens

Источник: данные авторского исследования
 Source: Data of an author's research

вания микробной пленки *Staphylococcus epidermidis* 33 и имеют достоверное статистически значимое снижение в два и более, чем в два раза соответственно, в отличие от этого же конструкционного материала без введения в состав порошка наноразмерного диоксида титан.

Выводы

Введение в состав базисного конструкционного материала Vertex ThermoSens наноразмерного диоксида титана в количестве до 1 мас.% приводит к угнетению пленкообразующей способности *Staphylococcus epidermidis* 33 при культивировании в течении 48 час. на поверхности экспериментальных образцов как в отношении общей биомассы, так и живых клеток.

По нашему мнению, данный факт имеет практическое значение для использования полученных данных эксперимента в клинической стоматологии в качестве способа ингибирования образования микробной пленки на стоматологическом базисном материале на этапе изготовления съёмных конструкций сложно-челюстных протезов и аппаратов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Нестерко, Е. Э. Применение полимерных материалов в современной стоматологии / Е. Э. Нестерко, М. В. Бутова // Молодой ученый. – 2015. – №24 (1). – С. 49–51.
2. Первов, Ю. Ю. Иммунный гомеостаз слизистых оболочек, на фоне влияния материалов и конструкций съемных протезов / Ю. Ю. Первов // Казанский медицинский журнал. – 2012. – №2 (93). – С. 227–230.
3. Ингибирование образования микробной пленки при наноструктурировании поверхности конструкционного материала / О. А. Шулятникова [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2016. – №7 (140). – С. 20–24.

References

1. Nesterko E. Je., Butova M. V. [Use of polymeric materials in modern stomatology]. *Molodoj uchenyj = Young scientist*, 2015, no. 24 (1), pp. 49–51. (In Russ.)
2. Pervov Ju. Ju. [Immune homeostasis of mucous membranes, against the background of influence of materials and designs of removable artificial limbs]. *Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan medical magazine*, 2012, no. 2 (93), pp. 227–230. (In Russ.)
3. Shuliatnikova O. A. et al. [Inhibition of formation of a microbic film when nanostructuring a surface of constructional material]. *Ural'skij medicinskij zhurnal = Ural medical magazine*, 2016, no. 7, pp. 20–24. (In Russ.). doi: 10.18481/2077-7566-2016-12-3-65–72.

Авторы:

Геннадий Иванович РОГОЖНИКОВ

д.м.н., профессор, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии, Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Российская Федерация
info@digident.ru

Оксана Александровна ШУЛЯТНИКОВА

к.м.н., доцент, кафедра ортопедической стоматологии, Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Российская Федерация
anasko06@mail.ru

Владимир Павлович КОРОБОВ

к.м.н., доцент, лаборатория биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Российская Федерация
korobov@iegm.ru

Лариса Марковна ЛЕМКИНА

к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Российская Федерация
l.lemkina@iegm.ru

Authors:

Gennadij I. ROGOZHNIKOV

MD, Professor, Head of the department of orthopedic stomatology of Prosthetic Dentistry of the Perm State Medical University of the Academician E. A. Wagner of the Ministry of Healthcare of Russia, Perm, Russian Federation
info@digident.ru

Oksana A. SHULIATNIKOVA

Doctor of Philosophy of Medicine, Associate Professor of the Dentistry Department of the State Budgetary Institution of Higher Professional Education of the Perm State Medical University Named After Academician E.A. Wagner, Perm, Russian Federation
anasko06@mail.ru

Vladimir P. KOROBOV

Doctor of Philosophy of Medicine, Associate Professor of the Laboratory of Biochemistry of Development of Microorganisms of Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Office of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation
korobov@iegm.ru

Iarisa M. LEMKINA

Doctor of Philosophy of Medicine, Senior Research Associate of Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Office of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation
l.lemkina@iegm.ru

Поступила 12.01.2017
Принята к печати 25.02.2017

Received 12.01.2017
Accepted 25.02.2017