

**ANTIMICROBIAL PROPERTY ANALYSIS
OF STOMATOLOGICAL IMPLANT'S NANOCOMPOSITE TUNICS**

**АНАЛІЗ ПРОТИМІКРОБНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
НАНОКОМПЗИТНИХ ПОКРИТТІВ
СТОМАТОЛОГІЧНИХ ІМПЛАНТІВ**

Khrystian Gennadiy¹

Torinyk Inna²

Kazmirchuk Viktor³

DOI: http://dx.doi.org/10.30525/978-9934-571-31-2_12

Abstract. Development of nanocomposite coatings for dental implants is one of the most up-to-date and promising scientific and practical areas of focus. Numerous studies on modification problems of surfaces of implants in order to accelerate their osteointegration and achieve a high long-lasting clinical result are conducted in the world. As they remain foreign in the living body, implants should be made of special classes of materials with a high level of biocompatibility. It is these requirements that are satisfied by hydroxylapatite (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, the main inorganic component of the osseous tissue. HA-based coatings are effective for providing osteointegration of metal implants. But it is known that about 2 % of implants do not facilitate early osteointegration, the total level of their survival failures averages 7.7 % during five years. The key role in cases of such failures is played by diseases with a microbial genesis (known as peri-implant diseases), they eventually resulting in a loss of the implant. In view of the above facts, the urgency of development of HA coatings for dental nanocomposite implants, which are functionalized with biologically activated molecules having an antimicrobial effect, does not cause

¹ Postgraduate Student at Laboratory of Antimicrobial Agent's State Institution "I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Ukraine

² PhD, Leader Research Scientists at Laboratory of Viral Infection State Institution "I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Ukraine

³ PhD, Head of Laboratory Antimicrobial, Laboratory of Antimicrobial Agent's State Institution "I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Ukraine

any doubts. The purpose of the planned study consisted in microbiological substantiation for development of new composite coatings for dental implants in order to improve the efficacy of prevention of peri-implant diseases. The research methodology was based on a unified algorithm of a complex of physicochemical (thermodeposition with a cooling system for maintaining a constant temperature gradient) and ultramicroscopic (scanning electron microscopy in study of morphological peculiarities of coating surfaces) methods, X-ray diffraction (for revealing the level of crystallinity/roughness of coating surfaces), microbiological (diffusion into agar) methods of serial dilutions, study of microorganism adhesion to formalinized blood erythrocytes, passages of bacterial test strains on culture media and mathematic-statistical (dispersion analysis) methods. The scientific novelty of the obtained results consists in the use of the technique of thermodeposition in conditions of a constant temperature gradient that resulted in development of specimens of new nanocomposite coatings for dental implants on the basis of HA and components with antimicrobial (chitosan, ions of silver, decamethoxine) and osteointegrating (chitosan, collagen) properties. As a result of the study a high antimicrobial activity of HA-based specimens (chitosan 0.050 g/l, decamethoxine 0.025 g/l, chitosan 0.100 g/l, decamethoxine 0.025 g/l, collagen 0.300 g/l) to both reference test strains of microorganisms and clinical isolates of peri-implant diseases was proved. The highest effect of inhibition of strains of *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 was found out. The phenomenon of the slowest formation of resistance in clinical strains of *E. coli* and *S. aureus* due to the use of effective nanocoatings was revealed. The promising outlook of using specimens of the new coating for dental implants was objectively substantiated with obtained results.

1. Вступ

Розробка нанокомпозитних покриттів для стоматологічних імплантів є одним із надсучасних та перспективних науково-практичних напрямків. У світі проводяться численні дослідження з проблем модифікації поверхонь імплантів з метою прискорення їх остеointegraції та досягнення високого довгострокового клінічного результату [1, р. 88-100].

Залишаючись чужорідними в живому організмі, імпланти повинні бути виготовленими зі спеціальних класів матеріалів з високим рів-

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

нем біосумісності. Саме таким вимогам відповідає гідроксилапатит (ГА) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, що є основним неорганічним компонентом кісткової тканини. Покриття на основі ГА є ефективними для забезпечення остеointegraції металевих імплантів. Однак відомо, що близько 2% імплантів не в змозі досягти ранньої остеointegraції, а загальний рівень відмов їх приживлення становить у середньому 7,7 % за п'ять, років [2, р. 158-174]. Ключова роль у випадках невдач приживлення імплантів належить захворюванням мікробного генезу, визначених як періімплантні захворювання, які у підсумку призводять до втрати імпланту.

З огляду на зазначене вище, актуальність розробки гідроксилапатитних покриттів для стоматологічних імплантів нанокompозитного складу, функціоналізованих біологічно активованими молекулами з протимікробною дією не викликає жодного сумніву.

Метою запланованого дослідження стало мікробіологічне обґрунтування розробки нових композитних покриттів стоматологічних імплантів для підвищення ефективності профілактики періімплантних захворювань. Орієнтуючись на заявлену мету роботи та враховуючи виключну гостроту її проблематику для сучасної стоматологічної імплантології, було окреслене коло головних завдань дослідження. Серед останніх розробка серії нових нанокompозитних покриттів стоматологічних імплантів на основі гідроксилапатиту і допоміжних компонентів із протимікробними та остеointегруючими властивостями, вивчення їх фізико-хімічні характеристик; визначення протимікробної активності експериментальних зразків композитних покриттів щодо референтних тест-штамів мікроорганізмів; дослідження спектру та рівня антибактеріальної та протигрибкової дії експериментальних зразків композитних покриттів щодо клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань; вивчення впливу нових композитних покриттів на адгезію мікроорганізмів, дослідження швидкості формування резистентності мікроорганізмів до найбільш перспективних зразків розроблених композитних покриттів. Об'єктом започаткованого дослідження стали нанокompозитні покриття для стоматологічних імплантів, збудники періімплантних захворювань. Предметом – склад, протимікробна та антиадгезивна активність зразків нових нанокompозитних покриттів стоматологічних імплантів на основі гідроксилапатиту (ГА) і компонентів із протимікробними та остеointегруючими

властивостями (хітозан, декаметоксин, іони срібла, колаген), швидкість формування резистентності до них у штамів збудників периімплантних захворювань.

Методологію дослідження базувалась на уніфікованому алгоритмі комплексу фізико-хімічних (метод термодепозиції з системою охолодження для утримання стабільного градієнту температури для створення експериментальних зразків нових нанокompозитних покриттів; ультрамікроскопічних (скануюча електронна мікроскопія при дослідженні особливостей морфології поверхні покриттів та встановлення їх молярного стехіометричного співвідношення Ca/P) методів; рентгенівської дифракції (для визначення рівня кристалічності/шорсткості поверхні покриттів), мікробіологічних (метод дифузії в агар для вивчення протимікробної дії створених зразків покриттів щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів збудників периімплантних захворювань; методів серійних розведень у рідких поживних середовищах з подальшим дозованим висівом на відповідні тверді поживні середовища для визначення мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) та мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) зразків покриттів щодо типових штамів мікроорганізмів; методів дослідження прояву адгезії мікроорганізмів до формалінізованих еритроцитів крові людини для оцінки антиадгезивної дії покриттів; багаторазових послідовних пасажів тест-штамів бактерій на живильні середовища із зростаючим градієнтом суббактеріостатичних концентрацій суспензій матеріалу покриттів для вивчення швидкості формування резистентності у мікроорганізмів до перспективних зразків покриттів), математико-статистичних (методи дисперсійного аналізу для обробки результатів експериментальних досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів полягає у використанні технології термодепозиції в умовах утримання стабільного градієнту температури, за рахунок чого було розроблено зразки нових нанокompозитних покриттів для стоматологічних імплантів на основі ГА та компонентів із протимікробними (хітозан, іони срібла, декаметоксин) та остеointегруючими (хітозан, колаген) властивостями. Експериментальним шляхом вперше доведено високу протимікробну активність зразків на основі ГА (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л, хітозан 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л, декаметоксин 0,025 г/л, колаген

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

0,300 г/л) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників периімплантних захворювань. У роботі встановлено найвищий ефект пригнічення адгезії штамів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923. За рахунок застосування ефективних нанопокриттів визначено феномен найбільш повільного формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КЛПЗ-22 та *S. aureus* КЛПЗ-3. Отриманими результатами об'єктивно обґрунтована перспективність застосування зразків нового покриття для стоматологічних імплантів з метою підвищення ефективності профілактики периімплантних захворювань.

Науково-практичне значення започаткованого дослідження полягає у створенні нового способу отримання модифікованого протимікробним засобом кальцій-фосфатного покриття для стоматологічних імплантів, розробці нового протимікробного засобу місцевої дії для застосування в медичних закладах стоматологічного профілю з метою підвищення ефективності профілактики і лікування запальних захворювань пародонту. Отримані результати наукових досліджень щодо антимікробних властивостей (відносно домінуючих різновидів збудників для підвищення ефективності профілактики периімплантних захворювань) нових зразків нанокомпозитних покриттів на основі ГА із декаметоксином є перспективними для використання у навчальних програмах вищих медичних закладів та закладів післядипломної освіти МОЗ України.

2. Фізико-хімічна характеристика зразків нанокомпозитних покриттів імплантів

На сьогодні найбільш затребуваними у стоматології залишаються нанокомпозитні покриття стоматологічних імплантів не лише із протимікробними, але й остеointегруючими властивостями (табл. 1). Зазначений факт об'єктивно вимагав від дослідників дотримання певних умов для робочого алгоритму (подібність мінеральному складу кістки, формування надійного безпосереднього зв'язку з її живою тканиною, певна механічна стійкість, високодоступна технологічність нанесення на імплант, задовільна резорбційна активність для включення додаткових компонентів (рис. 1; рис. 2) з протимікробною дією тощо). Останнє сприяло активному застосуванню сучасних покриттів дентальних імплантів [4, р. 2-6].

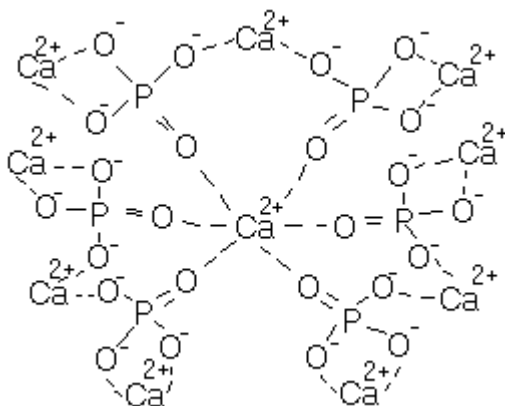


Рис. 1. Структурна формула гідроксиапатиту $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

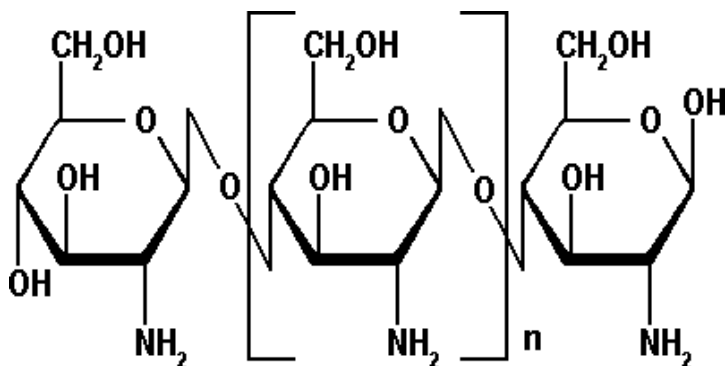


Рис. 2. Структурна формула хітозану

В якості компонентів із протимікробними та остеointегруючими властивостями (таблиця 1), доданих до ГА-покриттів, використовувались хітозан (у концентраціях від 0,025 до 0,100 г/л), іони срібла (у концентраціях 0,025, 0,050 і 0,100 г/л), декаметоксин (у концентраціях 0,013 і 0,025 г/л), колаген (у концентрації 0,300 г/л). Протимікробні властивості зазначених речовин зрозумілі, однак їх цільове використання у створенні нових вітчизняних покриттів дентальних імплантів залишається пріоритетним [4, р. 4-7]. У разі конструювання

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

аналогічних покриттів, як правило, рекомендують застосовувати хітозан, іони срібла, у меншій мірі – колаген [3, р. 51-54].

Таблиця 1

**Склад зразків нових нанокомпозитних покриттів
для стоматологічних імплантів, розроблених на основі ГА
тахкомпонентів із протимікробними
та остеointегруючими властивостями**

Зразок №	Компоненти із протимікробними та остеointегруючими властивостями, концентрація у зразку покриття			
	хітозан, г/л	іони срібла, г/л	декаметоксин, г/л	колаген, г/л
1	-	-	-	-
2	0,025	-	-	-
3	0,050	-	-	-
4	0,100	-	-	-
5	-	0,100	-	-
6	-	-	0,013	-
7	-	-	0,025	-
8	-	-	-	0,300
9	0,050	0,100	-	-
10	0,100	0,100	-	-
11	0,050	-	0,025	-
12	0,100	-	0,025	-
13	0,050	-	0,013	-
14	0,100	-	0,013	-
15	-	0,050	0,013	-
16	-	0,025	0,025	-
17	-	-	0,025	0,300
18	-	-	0,013	0,300

Зразки створених нанокомпозитних покриттів характеризуються перспективними фізико-хімічними властивостями, їхньою визначальною специфічною рисою є морфологія поверхні покриттів (пориста структура покриттів з виразною рельєфністю поверхні, достатня здатність іммобілізувати/ утримувати компоненти з протимікробною та біологічною активністю), рис. 3.

Додавання до покриттів органічного компоненту – хітозану (А, Б) підвищує пористість, порівняно із зразком з чистого ГА (Г). Відносно

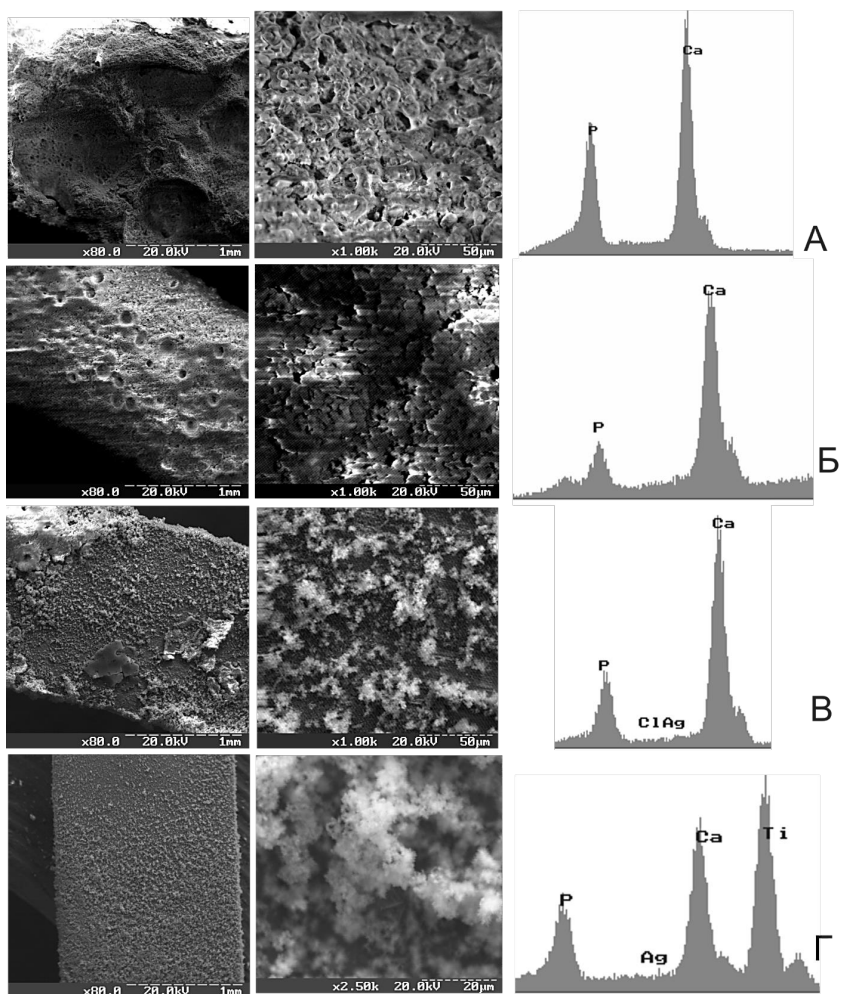


Рис. 3. Морфологія покриттів на основі ГА з додаванням хітозану та срібла, отриманих методом термодепозиції

збільшення частки хітозану в покритті до 0,100 г/л (Б) порівняно з 0,025 г/л (А) призводить до зменшенню вмісту фосфору та порушенню оптимального молярного стехіометричного співвідношення Ca/P (1, 67). Введення іонів срібла (0,100 г/л) до складу ГА-покриття не

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

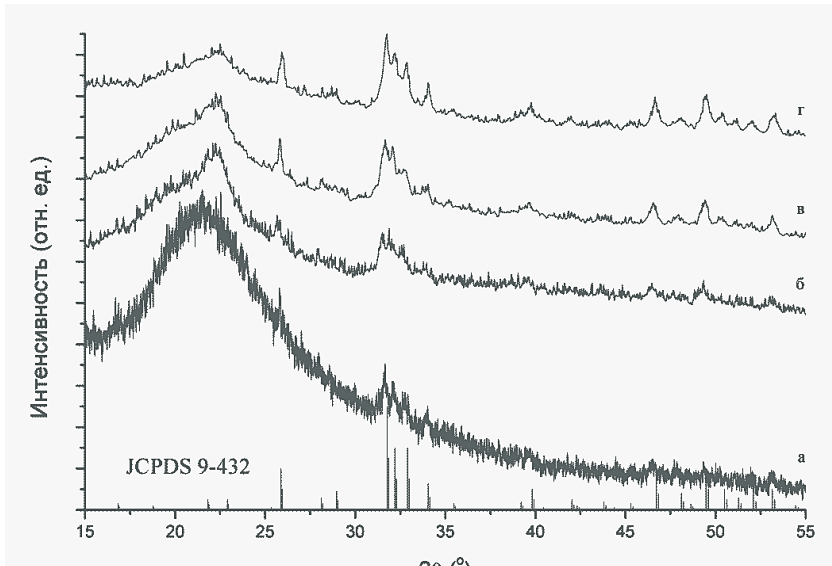
погіршувало пористість його поверхні (В). Результати рентгенографічних досліджень показали, що підвищення вмісту хітозану в покритті зменшує кристалічність структури ГА і викликає появу додаткових фаз (рис. 2).

А – ГА + хітозан, 0,025 г/л;

Б – ГА + хітозан, 0,100 г/л;

В – ГА + Ag^+ , 0,100 г/л;

Г – ГА.



**Рис. 4. Дифрактограми покриттів,
отриманих методом термодепозиції**

а – ГА + Ag^+ , 0,100 г/л;

б – ГА + хітозан, 0,100 г/л;

в – ГА + хітозан, 0,025 г/л,

г – ГА.

Крім того, зменшення кристалічності ГА спостерігається також і при додаванні іонів срібла. Параметри розширення середньої лінії піків на дифрактограмі (рис. 4), довжина хвилі випромінювання та кут

дифракції дозволили встановити, що наближений розмір кристалітів ГА нових зразків покриттів складає за взаємоперпендикулярними напрямками 10-15 нм і 3-5 нм. Ці параметри підтверджують правомірність віднесення створених покриттів до групи наноматеріалів. Достатньо виражений рівень кристалічності (шорсткість) поверхні покриттів забезпечує ефективний контакт, остеоінтеграцію та довготривале функціонування дентальних імплантів.

Властивості інтеграції та утримання компонентів з протимікробною активністю, що притаманні ГА і хітозану, має також і колаген. Крім того, ця речовина надає імплантам пружність і еластичність, а також відіграє певну роль в стимуляції періімплантних клітин. Для створення протимікробного ефекту нових покриттів нами були використані іони срібла (Ag^+) та антисептик декаметоксин. Срібло успішно застосовується в якості протимікробного компонента покриттів імплантів і має багато переваг: широкий протимікробний спектр дії, тривалий антибактеріальний ефект, відсутність місцевих і системних побічних ефектів. Таким чином, з використанням методу термодепозиції створено серію зразків нових покриттів для стоматологічних імплантів на основі ГА та різних компонентів із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями: хітозан (у концентраціях від 0,025 до 0,100 г/л), іони срібла (у концентрації 0,100 г/л), декаметоксин (у концентраціях 0,013 і 0,025 г/л), колаген (у концентрації 0,300 г/л). За характеристиками пористості структури з виразною кристалічною рельєфністю поверхні (10-15 x 3-5 нм) та молярним стехіометричним співвідношенням Ca/P нові покриття відносяться до групи нанокомполімерних із потенційно високими остеоінтегруючими властивостями.

3. Вплив нанопокриттів на референтні тест-штами мікроорганізмів

Виникнення постімплантаційних ускладнень мікробного генезу залишається нагальною загрозою до теперішнього часу. Одним із пріоритетних напрямків запобігання виникненню таких ускладнень є розробка нових типів покриттів імплантів, до складу яких включають компоненти із вираженими протимікробними властивостями (антибіотики, антисептики, біоактивні пептиди тощо) [5, р. 2423].

У експериментах з вивчення протимікробної активності на референтних тест-штамах було використано нові нанокомполімерні покриття,

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

що вирізнялись за якісним та кількісним складом. Дослідження складалось із декількох етапів. До ГА-покриттів додавали активні компоненти у різних концентраціях: хітозан (у концентраціях від 0,025 до 0,100 г/л), іони срібла (у концентрації 0,100 г/л), декаметоксин (у концентраціях 0,025 і 1,000 г/л), колаген (у концентрації 0,300 г/л). На першому етапі методом дифузії в агар визначали протимікробну активність зразків щодо референтних тест-штамів та клінічних ізолятів мікроорганізмів – збудників периімплантних захворювань. На другому етапі для найбільш перспективних зразків нових покриттів (відібраних за результатами попередніх експериментів) визначено МІК – методом серійних розведень у рідких поживних середовищах та МБК – шляхом дозованого висіву на певні тверді поживні середовища із серії суспензій без ознак видимого росту для контролю виживання мікроорганізмів. З метою дослідження протимікробної дії створених зразків покриттів (№№ 1-18) використовували еталонні тест-культури як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій та грибів роду *Candida*, що належать до групи клінічно значущих збудників периімплантних захворювань: *S. aureus* ATCC 25923, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277 та *C. albicans* ATCC 885-653.

За даними проведених аналізів контрольний зразок (№ 1) покриття, що містив лише ГА проявив низьку протимікробну активність із зоною затримки росту усіх взятих в експеримент тест-штамів мікроорганізмів у межах від 10,0 до 13,0 мм. У порівнянні із даним зразком достовірно вищу протимікробну дію ($p < 0,05$) продемонстрували зразки покриттів № 6 (відносно штаму *P. gingivalis* ATCC 33277), № 7 (відносно штамів *S. haemolyticus* ATCC 29970, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277 і *C. albicans* ATCC 885-653), № 10 (відносно штамів *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277 та *C. albicans* ATCC 885-653), а №№ 11 – 18 щодо усіх різновидів тест-штамів мікроорганізмів. За цим цим, вищим рівнем протимікробної активності (за діаметром зон затримки росту зазначених мікроорганізмів від 23,0 до 28,0 мм) характеризувались зразки покриттів №№ 11, 12 та 17, до складу яких крім ГА входять у певній концентрації додаткові компоненти із протимікробними (хітозан і декаметоксин) та остеоінтегруючими (хітозан та колаген) властивостями. Тому, ці зразки покриттів було відібрано для проведення поглибленого

дослідження їх протимікробної активності стосовно клінічних штамів збудників періімплантних захворювань.

З іншого боку, результати визначення протимікробної дії на референтних тест-штамах мікроорганізмів для подальших експериментів було відібрано три найбільш перспективні зразки покриттів №№ 11, 12 та 17. Вивчення протимікробної активності відібраних зразків покриттів щодо клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань виконували традиційно методом дифузії в агар з порівнянням ступеню антибактерійної та протигрибової дії та відповідними показниками контрольного зразку № 1 (ГА без антимікробних компонентів). Результатами експериментальних досліджень протимікробної дії відібраних зразків покриттів на клінічні штами збудників періімплантних захворювань було підтверджено висновок щодо високого рівня протимікробної активності зразків покриттів №№ 11, 12 та 17 зі вмістом додаткових компонентів із протимікробними (хітозан і декаметоксин) та остеointегруючими (хітозан та колаген) властивостями. Так, протимікробна дія вказаних зразків покриттів проявлялась діаметрами зон затримки росту для клінічних штамів: *S. aureus* від 25,2 до 27,2 мм; *S. haemolyticus* від 25,8 до 28,1 мм; *S. mutans* від 26,2 до 28,1 мм; *Acinetobacter* spp. від 25,8 до 27,3 мм; *E. coli* від 24,1 до 27,2 мм; *E. faecalis* від 24,2 до 27,8 мм; *P. gingivalis* від 25,0 до 27,0 мм; *P. intermedia* від 23,5 до 26,0 мм; *A. actinomycetemcomitans* від 24,0 до 28,0 мм; *C. perfringens* від 24,2 до 27,3 мм, а для грибів *C. albicans* від 23,0 до 28,2 мм. Таким чином, нові зразки покриттів №№ 11, 12 та 17 характеризуються широким спектром і достатньо високим рівнем протимікробної активності щодо різновидів грамположитивних і грамнегативних, аеробних та анаеробних бактерій, а також грибів роду *Candida*, які є найбільш клінічно значущими збудниками періімплантних захворювань.

Згідно рекомендацій «Європейського комітету з тестування антимікробної чутливості» (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST) більш точно протимікробну активність необхідно визначати за показниками МІК та МБК. Відповідно до зазначених рекомендацій було визначено МІК (методом серійних розведень у рідких поживних середовищах) та МБК (дозованим висівом на певні тверді поживні середовища із серії суспензій без ознак видимого росту для контролю виживання мікроорганізмів) зразків покриттів №№ 11, 12 і 17.

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

Як свідчили дані серед групи досліджених покриттів зразку № 12 була властивою відносно вища ($p < 0,05$) протимікробна активність за показниками МІК з нижньою межею ($4,2 \pm 0,2$) мкг/мл для *P. gingivalis* ATCC 33277 та верхнім рівнем ($25,0 \pm 0,0$) мкг/мл для *C. albicans* ATCC 885-653. Значення МІК зразка № 11 були дещо вищими для всіх референтних тест-штамів мікроорганізмів, у тому числі для *P. gingivalis* ATCC 33277 та *C. albicans* ATCC 885-653, відповідно ($6,3 \pm 0,0$) та ($33,3 \pm 0,3$) мкг/мл. Зразок № 17 у порівнянні із вищезазначеними варіантами композитних покриттів характеризується істотно вищими ($p < 0,05$) рівнями МІК для всіх взятих в експеримент тест-штамів мікроорганізмів від ($11,1 \pm 0,2$) мкг/мл для *S. haemolyticus* ATCC 29970 до ($66,7 \pm 0,1$) мкг/мл для *C. albicans* ATCC 885-653.

Показники МБК відібраних зразків покриттів для досліджених тест-штамів перевищували відповідні значення МІК від 1,2 рази у *C. albicans* ATCC 885-653 (зразок № 17) до 3,9 разів у *P. gingivalis* ATCC 33277 (зразок № 12). При цьому, для всіх референтних тест-штамів мікроорганізмів рівень МБК зразку № 12 був достовірно нижчим у порівнянні із зразками № 11 і 17 із значенням нижньої межі ($12,5 \pm 0,0$) мкг/мл для *S. haemolyticus* ATCC 29970 та верхньої – ($41,7 \pm 0,2$) мкг/мл МФК для *C. albicans* ATCC 885-653. Антибактерійна та протигрибкова активності експериментальних зразків покриттів для стоматологічних імплантів обумовлена комбінованим ефектом їх компонентів, що характеризуються безпосередньою протимікробною дією (хітозан, декаметоксин) та пролонгуючим ефектом (колаген). Встановлено, що рівень фунгіцидної дії хітозану зростає при більш низьких значеннях рН середовища. Важливим фактором прояву протимікробної активності хітозану є його здатність депонувати і поступово вивільняти інші речовини із протимікробними властивостями, що є компонентами композитних матеріалів.

Протимікробну активність лікарської композиції для місцевого лікування гінгівіту, яка містить декаметоксин визначена методом двократних серійних розведень на клінічних штаммах *S. aureus*, *E. coli* та *C. albicans*, виділених від хворих із запальними захворюваннями ротової порожнини. За цим, МІК для *S. aureus* та *E. coli* була на рівні 0,55 та 2,32 мкг/мл відповідно, а для *C. albicans* – 7,41 мкг/мл. За даними цього ж дослідження МБК для *S. aureus* та *E. coli* була на рівні

1,09 та 4,49 мкг/мл відповідно, а МФК для *C. albicans* – 8,19 мкг/мл. За результатами проведених досліджень встановлено переваги протимікробної дії лікарської композиції із декаметоксином у порівнянні з хлоргексидином. Встановлено, що у порівнянні із фурациліном усі досліджені збудники до декаметоксину мали вищий рівень чутливості. Зокрема, у *S. aureus* і *S. epidermidis* виявляли вищий рівень чутливості у 4 – 5 разів, а у *S. pneumoniae* – у 43 рази, з показниками МБК (1,56±0,79) та (67,14±21,07) мкг/мл, відповідно. Бактерицидний ефект досягався швидко – вже через 5 хв. не виявлялося життєздатних клітин *S. epidermidis*. У цьому дослідженні відмічено, що клінічні штами *K. pneumoniae* були більш стійкими до впливу декаметоксину: лише впродовж 1 години кількість КУО зменшувалася більш ніж у 4 рази, а за 2 години досягалось повне припинення життєздатності збудників. Автори довели ефективність композиції із декаметоксином для місцевого використання з метою лікування пацієнтів з інфекційними ускладненнями бронхіальної астми.

Отже, зразки нанокompatитних покриттів на основі ГА № 11 (хітозан 0,050 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 12 (хітозану 0,100 г/л, декаметоксин 0,025 г/л), № 17 (декаметоксин 0,025 г/л, колаген 0,300 г/л) за показником діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів на щільних поживних середовищах характеризуються найвищою антимікробною дією ($p < 0,05$) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників періімплантних захворювань, що належать до різних таксономічних груп – грам-позитивних і грам-негативних, аеробних та анаеробних бактерій, а також грибів роду *Candida*. У серії дослідів, виконаних методом серійних розведень у рідких поживних середовищах та дозованого висіву на певні тверді поживні середовища із зразків суспензій без ознак видимого росту (контроль виживання мікроорганізмів), для тест-штамів мікроорганізмів *S. aureus* ATCC 25923, *S. haemolyticus* ATCC 29970, *E. coli* ATCC 25922, *P. gingivalis* ATCC 33277, *C. albicans* ATCC 885-653 значення МІК, МБК та МФК були відносно вищими ($p < 0,05$) у зразків покриттів №№ 11 і 12. МІК цих покриттів для бактерій становив від (8,3±0,3) до (25,0±0,0) та від (4,2±0,2) до (16,7±0,1), а для грибів – (33,3 ± 0,3) і (25,0 ± 0,0) мкг/мл, відповідно. МБК зазначених зразків покриттів визначено у межах від (16,7±0,3) до (66,7 ±0,1) та від (12,5±0,0) до (33,3±0,1), а МФК – (50,0 ± 0,0) і (41,7 ± 0,2) мкг/мл, відповідно.

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

Антибактерійна та протигрибкова активність зразків нових композитних покриттів для стоматологічних імплантів №№ 11, 12 і 17 обумовлено комбінованим ефектом їх компонентів, що володіють безпосередньою протимікробною дією (хітозан, декаметоксин) та пролонгуючим її ефектом (хітозан та колаген).

4. Нанокompозитні покриття та адгезія мікроорганізмів

У процесі виникнення післяопераційних ускладнень, зумовлених мікробними агентами значну роль відіграє адгезивна активність мікроорганізмів як первинного фактору у патогенезі периімплантних інфекцій. Адгезія залежить, з одного боку, від особливостей наявних на поверхні клітин патогенів певних структур з адгезивними властивостями, з іншого – відповідних рецепторів для їх прикріплення (клітин-мішеней) [1, р. 95-99]. Відомо, що мікроби тримаються на поверхні епітеліальних клітин за допомогою особливих білково-полісахаридних макромолекул – адгезинів. У зв'язку зі значним ростом кількості імплантацій у хірургічній ортопедії та стоматології, в останні десятиліття зусилля вчених зосереджені на вивченні взаємодії патогенів із поверхнями імплантів і розробці сучасних матеріалів, які запобігали б їх адгезії та розвитку гнійнозапальних периімплантних ускладнень [2, р. 157-159].

За результатами проведених досліджень встановлено, що використані тест-штами мікроорганізмів *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 виявились високоадгезивними (ІАМ – 4,64 та 4,47, відповідно). При дослідженні зразку покриття № 1, який не містить протимікробних, чи інших біологічних компонентів, і був обраний в якості контролю для порівняння із іншими досліджуваними покриттями, спостерігалось часткове зменшення вихідних значень ІАМ у обох мікроорганізмів (3,48 та 3,50, відповідно). Зразок зі вмістом хітозану (0,050 г/л) і декаметоксину (0,025 г/л) забезпечував зниження ІАМ *E. coli* та *S. aureus* на 38,3 і 22,6 % у порівнянні з контролем. Дія зразку двічі вищою дозою хітозану (0,100 г/л) та аналогічною дозою декаметоксину (0,025 г/л) знижувала ІАМ обох зазначених штамів мікроорганізмів на 39,9 та 27,4 %, відповідно. Зниження рівня адгезії тест-штамів мікроорганізмів демонструвало ефективність протиадгезивної дії хітозану. Менш ефективною на адгезію тест-штамів мікроорганізмів виявилась дія зразку зі вмістом декаметоксину (0,025 г/л) та колагену

у концентрації 0,300 г/л. При цьому, значення ІАМ знижувалось для *E. coli* ATCC 25922 на 22,2 %, а для *S. aureus* ATCC 25923 – на 27,1 %.

Результати дослідження свідчать на користь того, що ГА, який є морфологічно-структурною основою розроблених покриттів характеризується низким рівнем протиадгезивної дії. Уведення до складу покриттів певних доз компонентів із протимікробною та остеointегруючою дією (хітозану, декаметоксину і колагену) забезпечило помірний рівень їх протиадгезивної активності.

Проводячи узагальнення та об'єктивізацію отриманих результатів, стає зрозумілим, що нанесення хітозану на поверхню катетерів сприяє інгібіції утворення біоплівки культурами грибів *C. albicans* та *C. parapsilosis* і може бути пов'язаним із здатністю катіонного хітозану руйнувати негативно заряджені мембрани клітин грибів після їх осадження на щільній поверхні. За цим відбувається вихід білкових та інших внутрішньоклітинних молекул, які спричиняють загибель мікроорганізмів. Окремими дослідниками акцентується увага на пригнічення адгезії грамнегативних і грампозитивних бактерій (у тому числі ешеріхій та стафілококів) антисептичними препаратами, до складу яких входить декаметоксин: септефрил®, себедін®, аджисепт®, декасан®, горостен® [4, р. 6-7]. Навпаки, вплив колагену на адгезію мікроорганізмів у поширених теоретичних джерелах із цього питання не встановлено. Чисельна перевага у зазначеному сенсі відводиться тематичним дослідженням зарубіжних авторів щодо вивчення впливу хітозану і колагену на адгезію мікроорганізмів. Особливе значення фахівці надають вивченню феноменів плівкоутворення мікобактеріями, коли хітозан, крім пригнічення адгезії бактеріальних клітин у планктонній фазі, запобігає утворенню біоплівок. Останнє дослідження наголошує щодо висновків на користь електростатичних взаємодій та домінуючий ролі хітозану за умов індукованої флокуляції грамнегативних бактерій. Слід відмітити добру поінформованість дослідників щодо здатності модифікованого хітозану (6-О-карбоксиметилхітозан) пригнічувати адгезію *Escherichia coli* до поверхні мембран тромбоцитів. Спеціалістами також доведений факт (у дослідях на дорослих респондентах-добровольцях) можливість суттєвого зниження ($p \leq 0,05$) водними розчинами хітозану процесів утворення біоплівок та відповідно тривалість життєздатності *S. mutans*, іншої мікрофлори дентальних бляшок. За цим інгибування *S. mutans* у порівнянні із іншими мікроорганізмами

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

потребувало відповідно вищої концентрації хітозану та більшої його експозиції. В останні роки значно удосконалено отримання наночастинок хітозану, які характеризувались як високим антиадгезивним, так і антимікробним потенціалом у цілому. Показано ефективний вплив наночастинок хітозану на запобігання адгезії метицилінрезистентних штамів епідермального стафілококу (MRSE) та високу протидію утворення біоплівки штамів золотистого стафілококу резистентних і чутливих до метициліну (MRSA та MSSA, відповідно). При вивченні впливу колагену на процес адгезії мікроорганізмів у багатьох джерелах описано два відмінні його ефекти. З одного боку, у переважній більшості тематичних робіт вказується на здатність мікроорганізмів до адгезії на структурах колагену. З іншого боку, колаген у композиціях із іншими сполуками активно використовується для створення виробів медичного призначення з антиадгезивними властивостями. Відомо, що густий (15 %) колагеновий гідрогель у поєднанні із протимікробним засобом (ванкоміцин) був використаний для створення штучної роговиці та запобігав адгезії мікроорганізмів з подальшим розвитком постімплантаційних інфекційних ускладнень. У разі створення імплантаційних композитних сіток для хірургічного лікування гриж колаген використовувався у якості їх полімерних компонентів, здатних утримувати інші додані антимікробні препарати. Відмічено значне пригнічення бактеріального росту MRSA матеріалом таких композитних сіток. Пояснення встановленого ефекту ґрунтується на концепції колагену не лише як вираженого антиадгезивного бар'єру, але й акцептора антибіотиків пролонгованої дії та фактора – запобіжника бактеріальної колонізації [5, р. 2423].

Отже, як результати власних досліджень, так і наведений науково-теоретичний аналіз відомих джерел вітчизняних і зарубіжних літератури виявились цілком релевантними та підтвердили остаточно здатність матеріалу нових нанокомпозитних покриттів, створених на основі ГА та компонентів із протимікробними та остеоінтегруючими властивостями (хітозану, декаметоксину та колагену) суттєво впливати на процес адгезії штамів мікроорганізмів різних таксономічних груп. Наведені вище результати сприяють формулюванню деяких положень, що висвітлюють сутність започаткованих досліджень, їхнього ідеологічного базису. Нові нанокомпозитні покриття здатні до антиадгезивної дії відносно мікроорганізмів різних таксономічних груп (*E. coli*

ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923). Рівень антиадгезивного впливу залежить від складу покриття, атомарної маси хімічних компонентів, їхніх властивостей, тощо. Зразки із моно компонентним покриттям (ГА) мінімально пригнічують адгезію мікроорганізмів (із зменшенням ІАМ на 25,0 та 21,7 %, відповідно). Найбільш виразним ефектом пригнічення адгезії характеризуються зразки покриття, що мають полі компонентний склад (крім ГА, входять хітозан: концентрація 0,100 г/л та декаметоксин: концентрації 0,025 г/л). Відповідні факти підтверджуються зменшенням заявлених величин у порівнянні з контролем на 39,9 і 27,4 %.

5. Висновки

1. Розробка нових типів покриттів для імплантів із протимікробними/ остеointегруючими властивостями є пріоритетним напрямком попередження та усунення постімплантаційних ускладнень мікробного генезу.

2. Метод термодепозиції об'єктивно сприяє створенню зразків нових нанопокриттів стоматологічних імплантів на основі ГА та компонентів із протимікробними та остеointегруючими властивостями: хітозан, іони срібла, декаметоксин, колаген.

3. Зразки композитних нанопокриттів на основі ГА, хітозану, домішок декаметоксину, колагену характеризуються найвищою протимікробною активністю ($p < 0,05$) як до референтних тест-штамів мікроорганізмів, так і до клінічних ізолятів збудників перімплантних захворювань різних таксономічних груп (грам позитивних/грамнегативних, аеробних/анаеробних бактерій, тест-штамів мікроорганізмів).

4. Композитні покриття здатні до антиадгезивної дії щодо мікроорганізмів різних таксономічних груп (*E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923). Рівень антиадгезивного впливу залежить від складу покриття та молярного співвідношення його хімічних компонентів.

5. Найбільш повільне формування резистентності у клінічних штамів *E. coli* КЛПЗ-22 та *S. aureus* КЛПЗ-3 встановлено до зразків покриттів №№ 11 і 12. Динаміка поступового зростання резистентності, як у ешеріхій, так і у стафілококів, спостерігалася з 5 до 25 пасажу із лінійно-подібним збільшенням МІК від 4 до 22 разів та подальшим більш інтенсивним її формуванням до 30 пасажу. Кінцевий рівень набутої ешеріхіями та стафілококами резистентності відзначався збільшен-

Antimicrobial property analysis of stomatological implant's nanocomposite...

ням вихідного значення МІК зразку покриття № 11 у 28 і 32 рази, а № 12 – у 26-28 разів, відповідно.

References:

1. Tobin, E. J. (2017). Recent coating developments for combination devices in rthopedic and dental applications: A literature review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol 112:88-100. doi: 10.1016/j.addr.2017.01.007
2. Romanos G. E. (2015) Peri-implant *Diseases*. *Dental Clinics*, 59 (1), 157–178.
3. Abraham, C. M. (2014). Suppl 1: A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. *The open dentistry journal*, 8, 50-55.
4. Jemat, A., Ghazali, M. J., Razali, M., & Otsuka, Y. (2015). Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *BioMed research international*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/791725>
5. Tu, J., Yu, M., Lu, Y., Cheng, K., Weng, W., Lin, J., ... & Han, G. (2012). Preparation and antibiotic drug release of mineralized collagen coatings on titanium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(10), 2413.