

Результаты изучения адгезии микроорганизмов к титановым пластинам, используемым при остеосинтезе костей лицевого скелета, в эксперименте

© А.М. СИПКИН¹, А.В. ДЕМЬЯНОВА¹, Т.В. ЦАРЕВА²

¹ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва, Россия;

²ГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Способность микроорганизмов к адгезии на поверхность устанавливаемых титановых минипластин и винтов является одним из ключевых факторов развития гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде. К вариантам решения этой проблемы относится использование ионно-плазменного покрытия минипластин и винтов.

Цель исследования — доказать снижение адгезии патогенных и условно-патогенных бактерий на образцы титановых минипластин с ионно-плазменным покрытием по сравнению с образцами без покрытия.

Материал и методы. В основу исследования легли современные представления о микробной адгезии как о первом и наиболее важном этапе развития микробной колонизации абиотических поверхностей, в том числе поверхности имплантатов. В исследовании были использованы штаммы аэробных и факультативно-анаэробных патогенов, неспорообразующих (неклостридиальных) облигатно-анаэробных патогенов. При выполнении экспериментов использовали стандартную методику определения остаточной адгезии. Полученные данные обрабатывали с применением программного пакета Biostat 9.0 для данных, полученных методами вариационной параметрической и непараметрической статистики. Использовали критерий Манна—Уитни с учетом средней величины, ошибки и количества наблюдений (достоверность различий при $p < 0,05$).

Результаты. Все различия индексов остаточной адгезии штаммов аэробных и факультативно-анаэробных патогенов на образцах с защитным покрытием и без него были статистически достоверны, однако адгезия отдельных видов различалась. Кроме того, все различия индексов остаточной адгезии штаммов облигатно-анаэробных патогенов были статистически достоверны.

Заключение. Низкий уровень адгезии, который наблюдался при использовании сплава с защитным покрытием, является весьма перспективным с практической точки зрения, так как эти возбудители представляют серьезную опасность в плане возможного развития гнойно-воспалительных осложнений и отторжения имплантатов, а снижение адгезии является благоприятным фактором, который снижает микробную нагрузку в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: микробная адгезия, титановые пластины, осложнения остеосинтеза.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Сипкин А.М. — <https://orcid.org/0000-0001-8287-741X>

Демьянова А.В. — <https://orcid.org/0000-0001-8836-0497>; e-mail: nastazzy@mail.ru

Царева Т.В. — <https://orcid.org/0000-0001-9571-0520>

Автор, ответственный за переписку: Демьянова А.В. — e-mail: nastazzy@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Сипкин А.М., Демьянова А.В., Царева Т.В. Результаты изучения адгезии микроорганизмов к титановым пластинам, используемым при остеосинтезе костей лицевого скелета, в эксперименте. *Стоматология*. 2020;99(5):7–10. <https://doi.org/10.17116/stomat2020990517>

Experimental study of a bacterial adhesion to titanium plates used for osteosynthesis of facial bones

© А.М. SIPKIN¹, А.В. DEMYANOVA¹, Т.В. TSAREVA²

¹Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia;

²Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

ABSTRACT

Background. The adhesion ability of microorganisms to the surface of titanium miniplates and screws is one of factors in the development of purulent-inflammatory complications in the postoperative period. One of the solutions to this problem is the use of an ion-plasma coating of mini-plates and screws.

Objective. The aim of the study was to prove a decrease adhesion level of pathogenic and conditionally pathogenic bacterium to samples of titanium mini-plates with ion-plasma coating, compared with samples without coating.

Material and methods. Present opinion about microbial adhesion, how the most important stage of development microbial colonization of abiotic surfaces, has been basis of this study. The strains of aerobic and facultative anaerobic pathogens, as well as the non-spore-forming (non-clostridial) obligate-anaerobic pathogens were used in the research. During the experiments the stan-

standard method for determining residual adhesion was applied. The data obtained were processed by the «Biostat 9.0» software package. For the data received by the methods of variational parametric and nonparametric statistics we used the Mann—Whitney test, taking into account the average value, error, and the number of observations (significance of differences at $p < 0.05$).

Results. As a result, the differences between the indices residual adhesion of strains aerobic and facultative anaerobic pathogens on the samples with and without a protective coating were statistically reliable, however, the adhesion of the individual species varied. The same differences between the indices residual adhesion were obtained among the strains of obligate anaerobic pathogens. The low level of adhesion, which was observed in the case of using the protective coating, is a very promising way of development, since these microorganisms are dangerous as they may lead to the development of purulent-inflammatory complications and the rejection of implants.

Conclusion. The decreased level of adhesion is a factor which reduces the microbial load during the postoperative period.

Keywords: *microbial adhesion, titanium plates, complications of osteosynthesis.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Sipkin A.M. — <https://orcid.org/0000-0001-8287-741X>

Demyanova A.V. — <https://orcid.org/0000-0001-8836-0497>; e-mail: nastazzy@mail.ru

Tsareva T.V. — <https://orcid.org/0000-0001-8836-0497>

Corresponding author: Demyanova A.V. — e-mail: nastazzy@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Sipkin AM, Demyanova AV, Tsareva TV. Experimental study of a bacterial adhesion to titanium plates used for osteosynthesis of facial bones. *Dentistry = Stomatologiya*. 2020;99(5):7–10. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/stomat2020990517>

В настоящее время во всем мире прослеживается постоянный рост общего травматизма, в связи с чем также имеется тенденция и к росту числа травм челюстно-лицевой области (ЧЛО). До сих пор «золотым стандартом» при лечении переломов костей ЧЛО является остеосинтез отломков костей титановыми минипластинами и винтами. Однако ввиду особенностей травм ЧЛО частота развития гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде не имеет тенденции к снижению. Предупреждение осложнений особенно актуально, так как больные с этой нозологией составляют 40–50% среди пациентов челюстно-лицевых стационаров. Первым и важнейшим местным фактором возникновения осложнений является способность микроорганизмов к адгезии на установленные титановые пластины. Использование биоинертного биорезистентного покрытия титановых минипластин, нанесенном методом ионно-плазменного напыления при хирургическом лечении травм костей ЧЛО, должно обеспечить снижение рисков развития послеоперационных осложнений.

Цель исследования — сравнительная оценка способности микроорганизмов к адгезии и колонизации образцов титановых минипластин с ионно-плазменным покрытием и без него.

Материал и методы

Моделирование остаточной адгезии в эксперименте *in vitro*. Основу экспериментального исследования составили современные представления о микробной адгезии как первом и важнейшем этапе микробной колонизации абиотических поверхностей, в том числе конструкционных материалов, используемых в современной ортопедии [1]. Следующим этапом является колонизация с формированием микробной биопленки, которая ведет к развитию воспаления тканей, с одной стороны, и деструкции использованного ортопедического материала, — с другой [2].

Эксперимент выполняли с образцами стандартных титановых пластин с ионно-плазменным защитным покрытием,

разработанным на базе АО «НИИВТ им. С.А. Векшинского». В эксперименте выполнены две серии работ *in vitro* для пластин с покрытием (основная группа) и без него (контрольная группа).

Учитывая вероятную роль микроорганизмов разных групп в развитии осложнений инфекционно-воспалительной природы после ортопедических операций на суставах и костях [3], мы использовали в экспериментах *in vitro* чистые тест-культуры бактерий следующих групп и видов:

1. Аэробные и факультативно-анаэробные патогены: *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, дрожжевые грибы *Candida albicans*.

2. Неспорообразующие (неклостридиальные) облигатно-анаэробные патогены: *Peptostreptococcus anaerobius*, *Parvimonas micra*, *Prevotella melaninogenica*.

Тест-штаммы предоставлены из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Все образцы являлись штаммами бактерий, вызывающими гнойно-воспалительные заболевания в челюстно-лицевой хирургии.

Для проведения экспериментов использовали модифицированную стандартную методику определения остаточной адгезии [4]. Образцы помещали в 10 мл взвеси тест-культуры микроорганизма концентрации 10^7 КОЕ/мл изотонического раствора хлорида натрия и инкубировали в течение 40 мин при температуре 37 °С, учитывая необходимые условия для обеспечения жизнеспособности микроорганизмов различных видов.

Механически осевшие микробные клетки, которые не вступили в процесс адгезии, удаляли с помощью ультразвуковой ванночки Ultra-Est («Геософт», Россия) в течение 5 мин. После этого раствор сливали, а образцы с микробными клетками, вступившими в процесс адгезии, трижды прикладывали к поверхности питательной среды. Таким образом, микробные клетки прилипали к питательной среде и давали рост изолированных колоний, что позволяло определить остаточную адгезию.

Питательной средой служил 5%-ный кровяной агар с добавлением гемина (5 мкг/мл) и менадиона (0,1 мкг/мл).

Для количественной оценки остаточной адгезии среду с посевами-отпечатками помещали в анаэростаты с бескислородной газовой смесью с дальнейшим использованием палладиевого катализатора для редуцирования кислорода. Индекс остаточной адгезии рассчитывали и переводили в процентный показатель [3] по формуле:

$$I_{ao} = \lg A / \lg N \cdot 100\%$$

где I_{ao} — индекс остаточной адгезии; $\lg A$ — число прилипших бактерий, выраженных через десятичный логарифм (КОЕ/мл); $\lg N$ — количество бактерий исходной взвеси, наносимой на стандартный образец, выраженное через десятичный логарифм (КОЕ/мл).

Для статистической обработки полученных данных использован программный пакет Biostat 9.0. Использовали критерий Манна—Уитни с учетом средней величины, ошибки и количества наблюдений (различия статистически значимы при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты изучения остаточной адгезии штаммов аэробных и факультативно-анаэробных патогенов к образцам титанового сплава с защитным покрытием. При исследовании адгезии к образцам титанового сплава штаммов бактерий условно-патогенной группы, относящихся к видам *K. pneumonia* и *E. faecium*, установлено, что в контрольной серии экспериментов (образцы без защитного покрытия) индексы остаточной адгезии находились на среднем уровне: процентный показатель остаточной адгезии составлял $45,3 \pm 8,4$ и $36,7 \pm 6,4\%$ для *K. pneumonia* и *E. faecium* соответственно. Таким образом, $45,3$ и $36,7\%$ бактериальных клеток из нанесенной на образцы взвеси вступали в процесс адгезии и хорошо прилипали к образцам сплава.

В то же время в опытной серии экспериментов (образцы с защитным покрытием) процентные показатели остаточной адгезии были статистически значимо ниже в 2 и 3 раза для *K. pneumonia* и *E. faecium* соответственно (табл. 1). На образцах с защитным покрытием сохранялось

лишь соответственно 23% и 11,8% бактериальных клеток от нанесенной взвеси.

Staphylococcus aureus характеризовался высоким уровнем адгезии на образцах как без покрытия, так и с покрытием ($69,7 \pm 8,2$ и $76,0 \pm 9,7\%$ соответственно, различия статистически незначимы).

Высокий уровень адгезии отмечен также в экспериментах с дрожжевыми грибами *Candida albicans*, процентный показатель остаточной адгезии которых составил $61,5 \pm 6,9\%$ в контроле, но снижался почти в 2 раза на образцах с защитным покрытием: $33,5 \pm 4,8\%$ ($p < 0,05$).

Таким образом, все различия индексов остаточной адгезии штаммов аэробных и факультативно-анаэробных патогенов, за исключением *S/s aureus* были статистически значимыми. Несмотря на отмеченную общую закономерность адгезия отдельных видов, судя по представленным данным, несколько различалась. Наиболее высокий уровень адгезии установлен у *S. aureus* и *C. albicans*, однако у грибов он существенно понижался в случае использования образцов сплава с защитным покрытием.

Следует отметить, что низкий уровень адгезии, который наблюдался при использовании сплава с защитным покрытием, является весьма перспективным с практической точки зрения, так как указанные возбудители представляют серьезную опасность в плане возможного развития гнойно-воспалительных осложнений и отторжения имплантатов, а снижение адгезии является благоприятным фактором, который снижает микробную нагрузку в послеоперационном периоде [3, 5].

Результаты изучения адгезии штаммов облигатно-анаэробных патогенов к образцам титанового сплава с защитным покрытием. При исследовании адгезии в контрольной серии экспериментов к образцам титанового сплава (образцы без электретного покрытия) штаммов облигатно-анаэробных бактерий, относящихся к видам *P. anaerobius*, *F. necroforum*, *P. melaninogenica* процентные показатели остаточной адгезии были на умеренном уровне и составляли от $55,7 \pm 13,2$ до $61,5 \pm 12,4\%$. Напротив, в опытной серии экспериментов (образцы с защитным покрытием) со всеми

Таблица 1. Остаточная адгезия штаммов аэробных и факультативно-анаэробных патогенов к титановому сплаву с защитным покрытием, %

Table 1. Residual adhesion of aerobic and facultative anaerobic pathogens to titanium alloy with protective coat, %

Вид обработки поверхности	Вид бактерии			
	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Поверхность без защитного покрытия	$45,3 \pm 8,4$	$36,7 \pm 6,4$	$69,7 \pm 8,2$	$61,5 \pm 6,9$
Поверхность с защитным покрытием	$23,0 \pm 6,9^*$	$11,8 \pm 8,2^*$	$76,0 \pm 9,7$	$33,5 \pm 4,8^*$
<i>p</i>	$< 0,05$	$< 0,025$	$< 0,025$	$< 0,05$

Примечание. * — статистически значимые различия между сравниваемыми сериями образцов ($p < 0,05$).

Таблица 2. Остаточная адгезия штаммов облигатно-анаэробных бактерий к титановому сплаву с защитным покрытием, %

Table 1. Residual adhesion of anaerobic pathogens to titanium alloy with protective coat, %

Вид обработки поверхности	Вид бактерии		
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Fusobacterium necroforum</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
Поверхность без защитного покрытия	$61,5 \pm 12,4$	$55,7 \pm 13,2$	$59,3 \pm 12,3$
Поверхность с защитным покрытием	$36,3 \pm 10,4^*$	$11,4 \pm 9,5^*$	$25,8 \pm 9,1^*$
<i>p</i>	$< 0,05$	$< 0,025$	$< 0,05$

Примечание. * — статистически значимые различия между сравниваемыми сериями образцов ($p < 0,05$).

взятыми штаммами наблюдалось статистически значимое снижение показателей адгезии, т.е. процентные показатели остаточной адгезии находились на низком уровне: для *P. anaerobius* — $36,3 \pm 10,4\%$, для *F. necroforum* — $11,4 \pm 9,5\%$, для *P. melaninogenica* — $25,8 \pm 9,1\%$. Выявленное нами снижение процентных показателей остаточной адгезии при использовании защитного покрытия было довольно значительным: в 1,5, в 5 и в 2 раза соответственно (табл. 2).

Таким образом, все различия индексов остаточной адгезии штаммов облигатно-анаэробных патогенов были статистически значимы. Несмотря на отмеченную общую закономерность, адгезия отдельных облигатно-анаэробных видов, как и аэробных, несколько различалась. Наиболее высокую адгезивную активность по отношению к титановому сплаву проявил анаэробный грамположительный микроб *P. anaerobius*, который отличается мелкими размерами от *F. necroforum* и *P. melaninogenica*. Полученные результаты объясняются малыми размерами этого микроорганизма и более сложными механизмами адгезии (наличие пилей, адгезинов), а также коагgregацией с другими бактериями [5].

При исследовании адгезии *P. melaninogenica* и *F. necroforum* индекс остаточной адгезии был в 2 и 5 раз ниже для экспериментальных образцов. Эти микроорганизмы спо-

собны вызывать воспалительную реакцию, что приводит к развитию переимплантата с последующей потерей имплантата [6].

Заключение

Подводя итоги, следует отметить, что чем меньше микроорганизмы способны к адгезии и колонизации материала имплантата, тем меньше вероятность развития периимплантата. Наличие статистически значимых различий между процентными показателями остаточной адгезии штаммов облигатно-анаэробных бактерий к титановому сплаву с защитным покрытием доказывает целесообразность применения покрытия, нанесенного методом ионно-плазменного напыления для профилактики осложнений. Следует также учитывать, что внутрикостная часть имплантата практически не способна контактировать с микробной экологической средой организма. Контакт с бактериями возможен, главным образом, в момент установки имплантата.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interests.**

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Арутюнов С.Д., Царев В.Н., Ипполитов Е.В. Формирование биопленки на временных зубных протезах: соотношение процессов первичной микробной адгезии, коагgregации и колонизации. *Стоматология*. 2012;91(5):5-10.
Arutjunov SD, Carev VN, Ippolitov EV. Biofilm formation on temporary dentures: the ratio of primary microbial adhesion, coaggregation and colonization processes. *Stomatologiya*. 2012;91(5):5-10 (In Russ.).
2. Воронов И.А., Митрофанов Е.А., Калинин А.Л. Разработка нового покрытия из карбида кремния для защиты зубных протезов от биодеструкции. *Российский стоматологический журнал*. 2014;1:4-9.
Voronov IA, Mitrofanov EA, Kalinin AL. Development of a new silicon carbide coating to protect dentures from biodegradation. *Rossiiskii stomatologicheskii zhurnal*. 2014;1:4-9. (In Russ.).
3. Царев В.Н. Грамположительные и грамотрицательные анаэробные бактерии. Руководство по медицинской микробиологии. 3(1). Под ред. Лабинской А.С., Костюковой Н.Н. М.: Бином; 2013.
Tsarev VN. Grampositive and gramnegative anaerobic bacteria. *Rukovodstvo po medicinskoj mikrobiologii*. 3(1). Pod red. Labinskoj A.S., Kostjukovoj N.N. M.: Binom; 2013. (In Russ.).
4. Давыдова М.М., Плахтий Л.Я., Царев В.Н. Экспериментальные методы изучения адгезии микроорганизмов к стоматологическим материалам. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013.
Davydova MM, Plahtij LJ, Carjov VN. Jeksperimental'nye metody izucheniya adgezii mikroorganizmov k stomatologicheskim materialam. *Mikrobiologija, virusologija i immunologija polosti rta*. M.: GJeOTAR-Media; 2013. (In Russ.).
5. Ушаков Р.В., Царев В.Н. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы. М.: Практическая медицина; 2019.
Ushakov RV, Tsarev VN. Antimikrobnaya terapiya v stomatologii. Printsipy i algoritmy. M.: Prakticheskaya meditsina; 2019. (In Russ.).
6. Царев В.Н., Степанов А.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С., Царева Т.В. Контроль первичной адгезии микроорганизмов и формирования биопленок на стоматологических материалах, используемых для трансдентальной имплантации при зубосохраняющих операциях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018;63(9):568-574.
Carjov VN, Stepanov AG, Ippolitov EV, Podporin MS, Carjova TV. Control of the primary adhesion of microorganisms and the formation of biofilms on dental materials used for transdental implantation in tooth-preserving operations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018;63(9):568-574. (In Russ.).

Поступила 25.05.2020

Received 25.05.2020

Принята 16.06.2020

Accepted 16.06.2020