

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО КАТИОННОГО ПЕПТИДА ВАРНЕРИНА В СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ*

В.П. Коробов, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

О.А. Шулятникова, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

Л.М. Лемкина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

С.Е. Порозова, *Пермский национальный исследовательский политехнический университет*

А.Г. Рогожников, *Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера*

Рост уровня травматизма, новообразований и послеоперационных воспалительных осложнений челюстно-лицевой области определяет актуальность лечения данных пациентов. Нарушение анатомической целостности челюстно-лицевой области приводит к изменению микробиоценоза полости рта с активизацией процессов биопленкообразования на ортопедических конструкциях. В статье рассматривается вариант решения проблемы образования микробных пленок бактериями *Staphylococcus epidermidis* 33 на диоксиде титана при наномодификации его поверхности и использовании низкомолекулярного катионного пептида варнерина. Данный способ имеет перспективные возможности использования в клинической стоматологии для профилактики и лечения воспалительных послеоперационных осложнений у больных с приобретенными дефектами челюстно-лицевой области и после операции дентальной имплантации.

Ключевые слова: дефекты челюстно-лицевой области, бактериальные биопленки, низкомолекулярный катионный пептид варнерин.

Введение

Повреждения челюстно-лицевой области (ЧЛО) наблюдаются у 18% травматологических больных [6]. Одновременно с этим увеличивается и количество пациентов с новообразованиями челюстных костей. Возникающие изменения целостности челюстных костей обуславливают появление функциональных и эстетических нарушений [1, 3]. Это требует, в

свою очередь, проведения дальнейшего реабилитационного ортопедического лечения, в том числе с использованием имплантационных систем для восстановления необходимого количества зубов и улучшения ретенции конструкций челюстных протезов. Возникающие при этом послеоперационные изменения микробиоценоза ротовой полости приводят к хронизации воспалительных процессов челюстно-

* Работа выполнена в рамках государственного задания; номер госрегистрации темы 01201353249 «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды».

лицевых образований и ЛОР-органов. Так, по имеющимся в литературе данным [4], развитие воспалительных осложнений у данной категории пациентов достигает 14% от общего числа обследованных пациентов. Затруднение борьбы с осложнениями воспалительного характера челюстно-лицевой области со стороны слизистой оболочки и мягкотканного пародонта во многом объясняется наличием на костных объектах микробных биопленок, характеризующихся повышенной устойчивостью их клеточных элементов к действию антибиотических препаратов, а также факторов специфической и неспецифической противомикробной защиты организма человека и широко используемым антибиотикам, что, в свою очередь, может препятствовать остеоинтеграции дентальных имплантатов. В связи с этим на современном этапе развития стоматологии оправдан направленный поиск способов и средств противодействия образованию и функционированию микробных биопленок на поверхностях зубов и различных лечебных стоматологических конструкций [2, 5]. В исследованиях некоторых авторов для решения проблем биопленкообразования на различных конструктивных стоматологических материалах предлагалось нанесение на поверхности конструкций ионов серебра [8]. Тем не менее оптимального подхода к подавлению образования микробных пленок в ротовой полости к настоящему времени до сих пор не представлено.

Цель работы

Экспериментальный анализ возможностей подавления образования и функционирования биопленок бактерий на поверхностях диоксида титана, широко используемого в стоматологической практике в качестве конструкционного материала.

Материалы и методы исследований

Анализ возможностей ингибирования формирования микробных пленок был проведен на образцах спеченного диокси-

да титана в виде таблеток диаметром 3 мм и толщиной 2 мм. Поверхность части таблеток имела нанесенный методом золь-гель технологии наноструктурированный слой низкотемпературной формы диоксида титана – анатаза, так как известно, что именно эта кристаллическая модификация материала образуется при спекании изделий из диоксида титана и окислении поверхности титановых изделий, в частности имплантатов [7]. При анализе возможностей подавления образования зубных биопленок на данном конструкционном материале наше внимание было привлечено к низкомолекулярным катионным пептидам семейства лантибиотиков, наиболее известный из которых – низин – широко используется во всем мире в качестве эффективной пищевой добавки (E234) для предупреждения бактериальной колонизации и порчи готовых к употреблению мясо-молочных продуктов.

Ранее сотрудниками Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН из клинического материала был выделен штамм бактерий *Staphylococcus warneri* KL-1 (Патент РФ № 2200195), синтезирующих и выделяющих в окружающую среду варнерин – новый катионный пептид этого семейства, способный ингибировать развитие широкого спектра грамположительных бактерий родов стафилококков, стрептококков, коринебактерий и представляющий, тем самым, особый интерес для лечебного использования в стоматологической практике. Это позволяло предполагать, что совместное проявление антибактериальных свойств наноструктурированного диоксида титана и низкомолекулярного катионного пептида варнерина способно приводить к более выраженному ингибированию и, возможно, подавлению формирования и функционирования микробных пленок на поверхностях титановых зубных протезов и имплантируемых титановых стоматологических устройств.

При подготовке экспериментов образцы диоксида титана подвергали стерилизации автоклавированием и делили на три

группы:

1 – контрольная, в которой определяли интенсивность сорбции красителей на поверхностях металлической керамики;

2 – экспериментальная - диоксид титана с наноструктурированным поверхностным слоем и без его модификации для изучения процесса пленкообразования бактериями штамма *S. epidermidis* 33;

3 – экспериментальная - диоксид титана с наноструктурированным поверхностным слоем и без него, с изучением антибактериального эффекта низкомолекулярного катионного пептида варнерина при действии его в течение 4 часов на сформировавшиеся двухсуточные биопленки бактерий *S. epidermidis* 33.

В процессе экспериментов титановые таблетки окрашивали двумя различными способами: 1) изучение общей биомассы пленок бактерий проводили путем измерения связывания бактериальными клетками и окружающим их матриксом специфического красителя – 0,1% раствора генцианвиолета; 2) количество жизнеспособных клеток в биопленках выявляли по уровню восстановления ими водорастворимого тетразолия MTS в системе Cell Proliferation Assay («Promega», США). Результаты проведенных трехкратно экспериментов подвергли статистической обработке.

Результаты исследований

Проведенные в условиях *in vitro* экспериментальные исследования свидетельствуют о выраженных антибактериальных свойствах низкомолекулярного кати-

онного пептида варнерина и его способности ингибировать образование и функционирование биопленок стафилококков на поверхностях наноструктурированных конструкционных материалов, в частности, диоксида титана.

Результаты анализа пленкообразующих свойств бактерий *S. epidermidis* 33, полученные на экспериментальных образцах диоксида титана с различными подходами к технологической обработке их поверхностей, представлены в табл. 1 и 2. Как видно из данных табл. 1, наноструктурированное покрытие диоксида титана не оказывало влияния на связывание красителя (формаза) поверхностями контрольных таблеток в среде LB, но снижало, практически в три раза, количество живых клеток стафилококков в составе биопленок после их формирования (выращивания) в течение 48 часов.

Полученные данные указывают на то, что наноструктурирование поверхности диоксида титана приводит к значительному увеличению, практически в 3 раза, связывания красителя генцианвиолета (табл. 2).

Вместе с тем такая модификация поверхности пластин вызывала более чем трехкратное снижение биомассы формирующихся на них в течение 48 часов биопленок бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33.

Результаты представленных экспериментальных исследований позволяют сделать существенные для практической стоматологии выводы. Наноструктурирование поверхности диоксида титана резко

Таблица 1

Содержание живых клеток в двухсуточных пленках (48 ч.) *Staphylococcus epidermidis* 33 на таблетках из диоксида титана до и после воздействия низкомолекулярного катионного пептида варнерина (OD–оптическая плотность формаза)

Характеристика образцов	Сорбция красителя образцами в среде LB (контроль)	Биопленки <i>Staphylococcus epidermidis</i> 33 (OD) (48 ч.)	Биопленки <i>Staphylococcus epidermidis</i> 33 (48 ч.), обработка варнерином
Диоксид титана	0,040±0,001	5,570±0,009	0,060±0,042
Диоксид титана с наноструктурированной поверхностью	0,042±0,001 p>0,05	1,790±0,043 p<0,05	0,050±0,043 p>0,05

Биомасса пленок бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 через 48 часов их развития на образцах из диоксида титана до и после воздействия низкомолекулярным катионным пептидом варнерином

Характеристика образцов	Сорбция генционвиолета образцами в среде LB	Биопленки <i>Staphylococcus epidermidis</i> 33 (48 ч.)	Биопленки <i>Staphylococcus epidermidis</i> 33 (48 ч.), обработанные варнерином
Диоксид титана	0,100 ± 0,002	1,640 ± 0,104	0,55 ± 0,09
Диоксид титана с наноструктурированной поверхностью	0,250 ± 0,031 p < 0,005	0,700 ± 0,124 p < 0,05	0,27 ± 0,05 p < 0,05

снижает количество сорбирующихся на ней живых бактериальных клеток, следствием чего является более чем двукратное уменьшение формирующейся биомассы бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 в биопленках, образующихся при двухсуточном культивировании. Следует отметить эффективность действия варнерина как на образцах с наноструктурированным покрытием, так и без него, причем оно достоверно более выражено на поверхности диоксида титана и без ее наноструктурирования, что может быть обусловлено и большим количеством живых клеток в исходной биопленке (рисунок).

Результаты проведенных доклинических исследований указывают на возможность местного использования низкомолекулярного катионного пептида варнерина в качестве эффективного средства для профилактики и лечения воспали-

тельных осложнений мягкотканного пародонта на этапе подготовки к ортопедическому лечению, при дентальной имплантации, а также в пред- и послеоперационном периодах у пациентов с переломами и приобретенными дефектами челюстных костей (патент РФ на изобретение № 2582228 от 30.03.2016).

Таким образом, исследование и внедрение отечественной разработки низкомолекулярного катионного пептида варнерина в практическую деятельность врача-стоматолога позволит значительно снизить риск развития нозокомиальных инфекций и может способствовать решению проблем профилактики и лечения воспалительных осложнений мягкотканного пародонта в послеоперационном периоде, в том числе после операций дентальной имплантации и на подготовительных этапах к сложному протезированию.

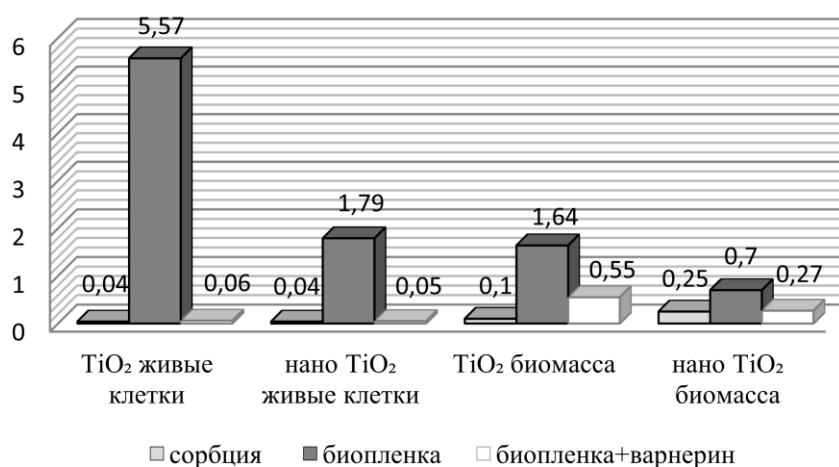


Рис. Содержание живых клеток и уровень биомассы в 48 часовых биопленках бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33 на различных образцах диоксида титана (усл. ед.)

Библиографический список

1. Арутюнов А.С., Кицул И.С., Лебедеко И.Ю., Васильев В.Г., Попова И.Н., Санодзе Д.О., Грачев Д.И. Причины возникновения челюстно-лицевых дефектов и потребности больных в ортопедической реабилитации // Российский стоматологический журнал. – 2010. – № 6. – С. 2–45.
2. Арутюнов А.С., Кравцов Д.В., Малькова А.П., Ваганова Л.К. Особенности состава биопленки на базисах протезов из полиуретана у онкологических пациентов с послеоперационными дефектами челюстей // Гармонизация лечебного и учебного процессов в ортопедической стоматологии: Сб. науч. работ Всерос. науч.-практ. конф. – М.: МГМСУ, 2009. – С. 64–69.
3. Асташина Н.Б. Перспективы комплексного подхода при лечении пациентов с дефектами челюстных костей // Уральский медицинский журнал. – 2009. – № 5 – С. 5–8.
4. Афанасьев В.В. Травматология челюстно-лицевой области. – М.: Гэотар-Медиа, 2010. – 256 с.
5. Вафин С.М., Лебедеко И.Ю. Изучение первичной адгезии микробов к полимерным материалам // Стоматолог-практик. – 2014. – № 4. – С. 20–21.
6. Копецкий И.С. Огнестрельные ранения челюстно-лицевой области мирного времени // Вестник РГМУ. – 2012. – № 1. – С. 12–15.
7. Порозова С.Е., Гуров А.А., Каменщиков О.Ю., Шулятникова О.А., Рогожников Г.И. Изучение покрытия из наноструктурированного анатаза на поверхности рутила. // Изв. вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия. Наноструктурированные материалы и функциональные покрытия. – 2018. – № 1. – С. 51–54.
8. Сухорукова И.В., Швейко А.Н., Штанский Д.В. Влияние состава и шероховатости поверхности покрытия TiCaPCON-Ag на кинетику выхода Ag в физиологический раствор // Изв. вузов. Порошковая металлургия и функциональные покрытия. – 2015. – № 3. – С. 53–61.

PROSPECTS FOR THE USE OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT CATIONIC PEPTIDE WARNERIN IN DENTAL PRACTICE

V.P. Korobov¹, O.A. Shuliatnikova², L.M. Lemkina¹, S.E. Porozova³,
A.G. Rogozhnikov²

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

² Perm State Medical University named after E.A. Wagner

³ Perm National Research Polytechnic University

The increase in the level of injuries, neoplasms and postoperative inflammatory complications of the maxillofacial region determines the relevance of the treatment of such patients. The violation of the anatomical integrity of the maxillofacial region changes the microbiocenosis of the oral cavity with the revitalization of biofilm formation processes on orthopedic structures. The article considers a solution to the problem of the formation of microbial film *Staphylococcus epidermidis* 33 on titanium dioxide in the nanomodification of its surface and the use of low-molecular-weight cationic peptide warnerin. This method has promising opportunities for the use in clinical dentistry to prevent and treat inflammatory postoperative complications among patients with acquired defects of the maxillofacial region and after dental implantation.

Keywords: defects of the maxillofacial region, microbial biofilms, low-molecular-weight cationic peptide warnerin.

Сведения об авторах

Коробов Владимир Павлович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: korobov@iegm.ru

Шулятникова Оксана Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры ортопедической стоматологии, Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера (ПГМУ), 614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26; e-mail: anasko06@mail.ru

Лемкина Лариса Марковна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: l.emkina@iegm.ru

Порозова Светлана Евгеньевна, доктор технических наук, профессор кафедры материалов, технологий и конструирования машин, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (ПНИПУ), 614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: s.w.porozova@yandex.ru

Рогожников Алексей Геннадьевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры ортопедической стоматологии, ПГМУ; e-mail: alexstomat@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 23.08.2018 г.