

Эти напряжения возникают между культевой вкладкой и тканями опорного зуба. Максимальное напряжение σ_{max} наблюдается у верхушки культевой вкладки и может привести к ее расцементировке и отколу стенки зуба.

При подготовке первого опорного зуба под культевую вкладку нужно стремиться к уменьшению диаметра сечения этой вкладки. Также необходимо больше оставлять диаметр стенки корня при подготовке корневого канала под культевую вкладку.

При использовании полулабильной системы фиксации M_u изгибающий момент полностью исключается в зоне соединения замкового крепления, но достигает своих максимальных значений в середине участка фронтальной группы зубов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедеко И.Ю., Перегудов А.Б., Хапилина Т.Э. *Замковые крепления зубных протезов*. М.: Молодая гвардия; 2001.
2. Гинали Н.В. *Патогенетические механизмы нарушения амортизирующей функции периодонта в биомеханических системах зуб-челюсть и их практическое значение*: Дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2000.
3. Стрганов Г.И. *Теоретические и клинические предпосылки использования корней многокорневых зубов в качестве опоры различных конструкций зубных протезов*: Дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь; 2002.
4. Ремизова А.А. *Ортопедические методы лечения в стоматологии. Основы бюгельного протезирования: Пособие для врачей*. М.: Человек; 2012.
5. Вульфес Х. Ошибки при изготовлении бюгельных протезов. *Зубной техник*. 2006; 1: 28–31.
6. Козлов С.В., Ремизова А.А., Гончаров С.О. Особенности эндодонтической подготовки опорных зубов под комбинированные протезы с расчетом на прочность, конструктивные схемы соединения. *Эндодонтия Today*. 2012; 3: 57–62.

7. Макеева И.М., Жохова Н.С. Ошибки эндодонтического лечения и пути их устранения. В кн.: *ЦНИИ стоматологии – 40 лет. История развития и перспективы: Материалы юбилейной сессии ЦНИИС*. М.; 2002: 76–8.
8. Боровский Е.В. Ошибки эндодонтического лечения зубов. *Клиническая эндодонтия*. 2003, 3: 44–7.

Поступила 05.06.14

REFERENCES

1. Lebedenko I.Yu., Peregudov A.B., Hapilina T.E. *Castle fixing dentures. [Zamkovye krepneniya zubnyh protezov]*. Moscow: Molodaya gvardiya; 2001. (in Russian)
2. Ginali N.V. *Pathogenetic Mechanisms of Damping Function Disorders of the Periodontium in Biomechanical Systems Tooth-Jaw and Their Practical Significance*: Diss. Moscow; 2000. (in Russian)
3. Stroganov G.I. *Theoretical and clinical background of multirooted tooth roots use as a support of various designs of dentures*: Diss. ... Stavropol'; 2002. (in Russian)
4. Remizova A.A. *Orthopedic Treatments in Dentistry. Basics Clasp Prosthetics. Manual for Physicians. [Ortopedicheskie metody lecheniya v stomatologii. Osnovy buugel'nogo protezirovaniya. Posobie dlya vrachej]*. Moscow: Chelovek; 2012. (in Russian)
5. Vul'fes Kh. Errors in the manufacture of clasp dentures. *Zubnoy tekhnik*. 2006; 1: 28–31. (in Russian)
6. Kozlov S.V., Remizova A.A., Goncharov S.O. Features endodontic preparation of the abutment teeth for combined dentures with the expectation of strength, structural schemes of connection. *Endodontiya Today*. 2012; 3: 57–62. (in Russian)
7. Makeeva I.M., Zhohova N.S. Errors of endodontic treatment and ways to overcome them. In: *Central Research Institute of Dentistry – 40 years. History of development and prospects: Materials of the anniversary session CRID [CNII stomatologii – 40 let. Istoriya razvitiya i perspektivy: Materialy yubileynoy sessii CNIIS]*. Moscow; 2002: 76–8. (in Russian)
8. Borovskiy E.V. Errors of endodontic treatment of teeth. *Klinicheskaya endodontiya*. 2003; 3: 44–7. (in Russian)

Received 05.06.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615.46.03:616.314-089.28-022:579.862.1].076

Рогожников А.Г.¹, Рогожников Г.И.¹, Порозова С.Е.², Коробов В.П.³, Лемкина Л.М.³, Шулятникова О.А.¹, Гуров А.А.², Морозов И.А.⁴

МИКРОБНЫЕ ПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ATCC 29887 НА ПОВЕРХНОСТИ ДИОКСИДА ЦИРКОНИЯ

¹ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, г. Пермь; ²ФГБОУ ВПО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», 614990, г. Пермь; ³ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО ФАНО, 614081, г. Пермь; ⁴ФГБУН «Институт механики сплошных сред» УрО РАН, 614013, г. Пермь

Исследовано воздействие образования и роста биопленок Staphylococcus epidermidis ATCC 29887 на поверхность диоксида циркония, стабилизированного оксидом иттрия и оксидом церия. Установлена выраженная зависимость жизнеспособности биомассы пленок от вида стабилизирующей добавки. С помощью методов спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР-спектроскопия), атомно-силовой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии показано, что биопленки не влияют на фазовый состав поверхности, но способствуют изменению ее структурных элементов.

Ключевые слова: диоксид циркония; оксид иттрия; диоксид церия; фазовый состав; поверхность, биопленка; биомасса; жизнеспособность биопленок; эпидермальный стафилококк; имплантаты; зубные протезы.

Для корреспонденции: Шулятникова Оксана Александровна, anasko06@mail.ru

For correspondence: Shulyatnikova Oksana Aleksandrovna, anasko06@mail.ru

Rogozhnikov A.G.¹, Rogozhnikov G.I.¹, Prozorova S.E.², Korobov V.P.³, Lemkina L.M.³, Shulyatnikova O.A.¹, Gurov A.A.², Morozov I.A.⁴

MICROBIAL FILMS STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS ATCC 29887 ON THE SURFACE OF ZIRCONIUM DIOXIDE. EXPERIMENTAL STUDY

¹ Acad. E.A. Wagner Perm state medical Academy, Ministry of health of Russia, 614990, Perm; ² Perm national research Polytechnic University, 614990, Perm, Russia; ³ Institute of ecology and genetics of microorganisms, Federal Agency of scientific organizations, 614081, Perm, Russia; ⁴ Institute of continuous media mechanics Ural branch of the RAS, 614013, Perm

Impact of education and growth of biofilms of Staphylococcus epidermidis ATSS 29887 on a surface of dioxide of the zirconium stabilized by oxides of yttrium and cerium is investigated. The expressed dependence of viability of biomass of films on a type of a stabilizing additive is established. By methods of spectroscopy of combinational dispersion of light, nuclear and power microscopy and scanning electronic microscopy it is shown that biofilms don't influence phase structure of a surface, but promote change of its structural elements.

Key words: zirconium dioxide; yttrium oxide; cerium dioxide; phase structure; surface; biofilm; biomass; viability biofilms; Staphylococcus epidermidis; implants; dentures.

Введение

Материалы, используемые в ортопедической стоматологии для изготовления имплантатов, должны обладать не только комплексом физико-механических характеристик, но и параметрами биоинертности к тканям пациента и его сапрофитной микрофлоре. Так, ротовая полость является местом жизнедеятельности разнообразных микроорганизмов [1], в том числе патогенных, способных формировать на поверхностях конструкционных материалов особые многослойные биологические структуры, представляющие собой специфические сообщества микроорганизмов – бактериальные пленки [2]. Такие пленочные структуры не только изолируют вводимый чужеродный материал от тканей организма, но и могут вызывать патологические процессы [3, 4], которые приводят к развитию осложнений и хронизации воспалительных заболеваний при установке имплантационных систем и зубных протезов. Активными образователями биопленок являются коагулазонегативные стафилококки вида *Staphylococcus epidermidis*, представители которого известны как наиболее частые возбудители нозокомиального сепсиса и инфекций, ассоциированных с полимерными и металлическими имплантируемыми устройствами [5].

На современном этапе развития ортопедической стоматологии в качестве материала для изготовления имплантационных систем и зубных протезов широко используется диоксид циркония. Однако в литературе до сих пор отсутствуют данные (помимо результатов физико-механических испытаний) о влиянии различных стабилизирующих добавок в композитах циркония на эксплуатационные характеристики изделий из этого материала и атакуемости их поверхностей сапрофитной бактериальной микрофлорой.

Цель работы – изучение образования и роста пленок *Staphylococcus epidermidis* ATCC 29887 на поверхности диоксида циркония, стабилизированного оксидами иттрия и церия.

Материал и методы

Образцы керамики для исследований получали на кафедре «Материалы, технологии и конструирование машин» Пермского национального исследовательского политехнического университета. Использовали нанопорошки диоксида циркония, стабилизированного 3 мол.% оксида иттрия (далее $ZrO_2-3Y_2O_3$), производства фирмы «TOSOH» (Япония) и диоксида циркония, стабилизированного 15 мол.% диоксида церия (далее $ZrO_2-15CeO_2$), полученного в лабораторных условиях по золь-гель технологии с введением полимерных добавок [6]. Порошки компактировали методом полусухого

прессования при давлении 200 МПа и спекали при изотермической выдержке при 1350°C. Получены образцы $d = 7$ мм и $h = 1$ мм.

Фазовый состав образцов исследовали методом спектроскопии комбинационного рассеяния света (КР-спектроскопии). КР-спектры получали на многофункциональном спектрометре комбинационного рассеяния света SENTERRA “Bruker” при длине волны излучающего лазера 532 нм и интенсивности излучения 5 мВ. Микроструктуру материалов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на аналитическом автоэмиссионном растровом электронном микроскопе ULTRA 55 (“Karl Zeiss”, Германия). Шероховатость образцов изучали на атомно-силовом микроскопе Dimension Icon (“VEECO”, США) в полуконтактном режиме работы прибора. Радиус острия зонда – 10 нм.

Для исследований роста пленок *S. epidermidis* образцы диоксида циркония автоклавиrowали в индивидуальных стеклянных завинчивающихся флаконах при 121°C в течение 60 мин. В стерильные флаконы с образцами вносили по 2 мл питательной среды LB (контроль) или по 2 мл инокулама бактерий *S. epidermidis* ATCC 29887 в среде LB, содержащей 10^7 КОЕ/мл. Флаконы помещали в термостат (37°C) на 24 или 48 ч. По истечении выбранного срока инкубации планктонную культуру удаляли, таблетки переносили в стерильные флаконы, дважды аккуратно промывали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,2).

Детекцию образовавшихся в процессе инкубации биопленок осуществляли двумя методами. Биомассу пленок определяли путем их окрашивания 0,1% раствором генциановым фиолетовым с последующей экстракцией связанного красителя 96% этанолом в течение 12 ч и измерением оптической плотности (OD) спиртового экстракта на спектрофотометре PD-303 (Япония) при длине волны 570 нм. Количество жизнеспособных клеток в биопленках определяли по уровню восстановления водорастворимого тетразолия в системе Cell Proliferation Assay (“Promega”, США) при 490 нм, который оценивали по прописи фирмы-производителя. Все исследования проведены трехкратно [7]. Для повышения корректности сравнения полученных экспериментальных данных их выражали в условных единицах (усл. ед.), отражавших отношение OD растворов генцианового фиолетового или формазана (восстановленного тетразолия) на 1 см^2 поверхности таблеток обоих составов. Результаты, характеризующие неспецифическую сорбцию генцианового фиолетового и формазана образцами модифицированных циркониевых таблеток, вычитали из данных, полученных при определении динамики роста биопленок.

Результаты и обсуждение

Исследование процессов формирования бактериальных пленок на поверхности диоксида циркония, стабилизированного $ZrO_2-3Y_2O_3$ и $ZrO_2-15CeO_2$, пока-

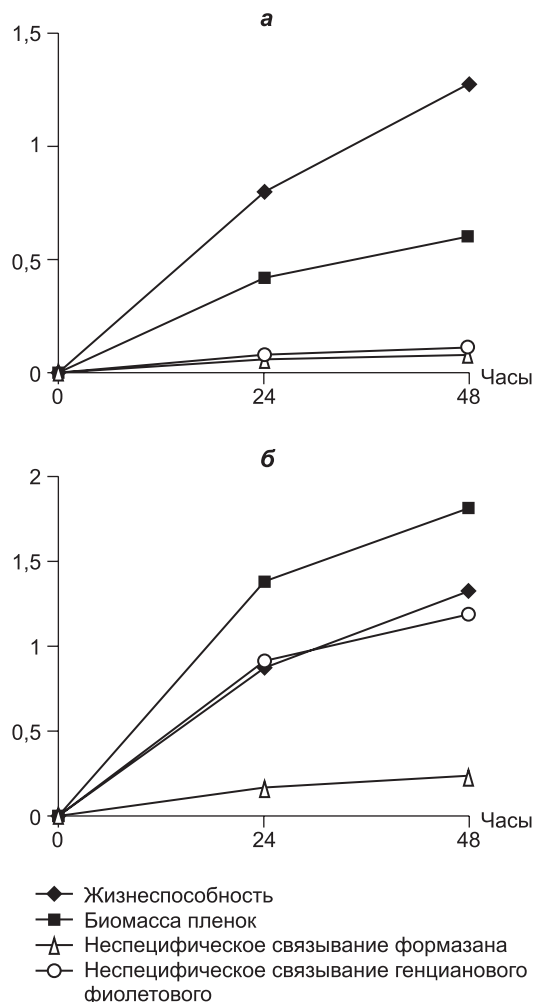


Рис. 1. Динамика роста биопленок *S. epidermidis* ATCC 29 887 на таблетках диоксида циркония, стабилизированного $ZrO_2-15CeO_2$ (а) и $ZrO_2-3Y_2O_3$ (б).

зало выраженную зависимость биологических характеристик этих процессов от вида используемых добавок. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Таблетки из $ZrO_2-15CeO_2$, как показывают экспериментальные данные, обладают значительно менее выраженной неспецифической сорбцией использованных для детекции биологических свойств бактериальных пленок специальных красителей – генцианового фиолетового и тетразолия. Образующиеся на этом типе таблеток бактериальные пленки обладают в оба срока наблюдения и значительно меньшей биомассой, и жизнеспособностью по сравнению с пленками на таблетках диоксида циркония, стабилизированного $ZrO_2-3Y_2O_3$.

На рис. 2 представлены СЭМ-изображения образцов $ZrO_2-15CeO_2$ до и после инкубации биопленок. На рис. 2, б четко фиксируется спиралевидная структура агломератов, образующих поверхность материала. Обычно такая структура на образцах диоксида циркония, стабилизированного $ZrO_2-15CeO_2$, хорошо выделяется при относительно свободной укладке агломератов наночастиц, например в условиях гелевого литья образцов [8], но значительно хуже видна при получении образцов методом полусухого прессования. Спиралевидная структура указывает на иерархи-

ческое строение спекшихся агломератов и материала в целом. Появление такой структуры, возможно, имеет значение для формирования бактериальных пленок и при отсутствии деструкции поверхности такого материала.

На рис. 3 показаны СЭМ-изображения поверхности образцов $ZrO_2-3Y_2O_3$ после инкубации биопленок. Агломераты бактерий, сформированные на этом материале, характеризуются меньшими размерами и округлой формы. Видимые изменения в самих агломератах после возникновения биопленок отсутствуют, однако на снимках зафиксированы образования квадратной (преимущественно) или треугольной формы размером 200–250 нм. Образования почти прозрачные или очень тонкие, но в них можно выделить полосчатую структуру типа структур Лизеганга (рис. 3, б). Наличие таких образований позволяет предполагать взаимодействие микробной пленки с материалом и его растворение-пересадение в ходе этого взаимодействия. Возможно, выявленные образования возникают в местах прикрепления отдельных микроорганизмов к поверхности.

На рис. 4 представлены КР-спектры поверхности образцов до и после инкубации биопленок. Спектры последних не отличаются от спектров исходных образцов, что позволяет сделать вывод о неизменности кристаллического

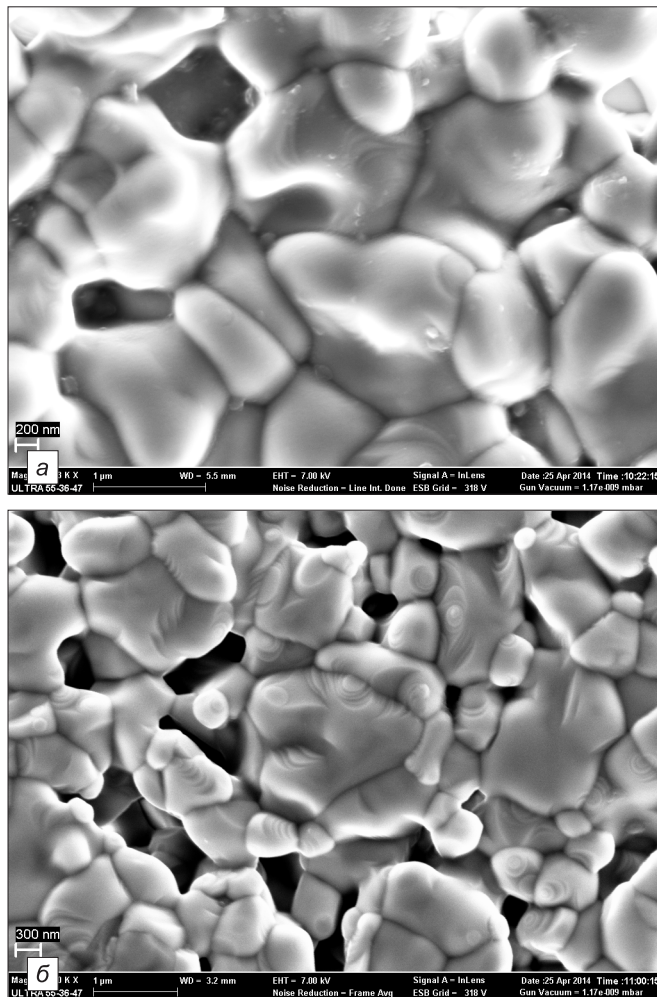


Рис. 2. СЭМ-изображения поверхности образцов $ZrO_2-15CeO_2$ до (а) и после (б) инкубации биопленок. Ув. 15 000 и 20 000.

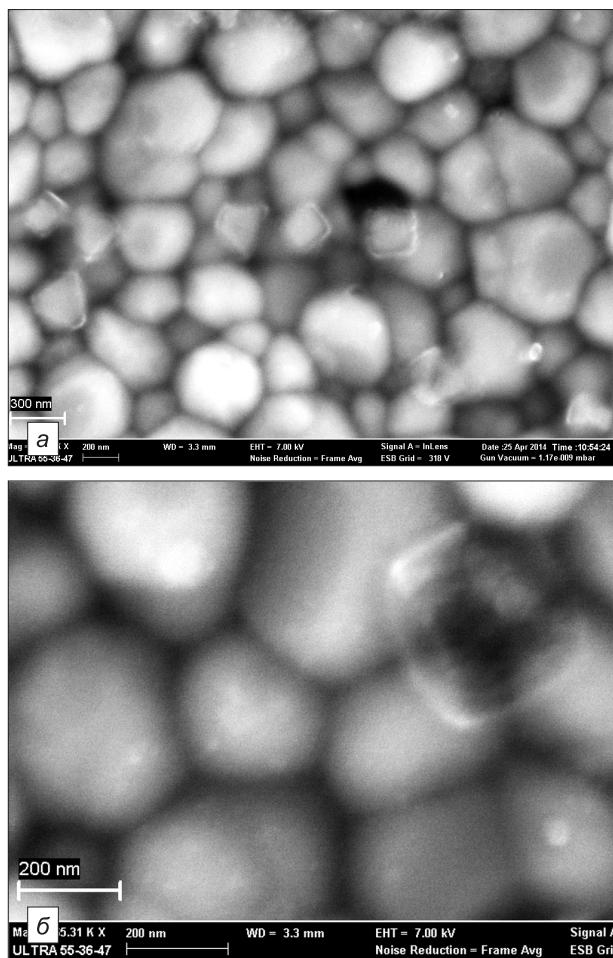


Рис. 3. СЭМ-изображения поверхности образцов $ZrO_2-3Y_2O_3$ после инкубации биопленок. Ув. 34 000 и 65 000.

состава поверхности, в частности не зафиксировано появление моноклинной модификации диоксида циркония, так называемая расстабилизация поверхности материала.

Данные о шероховатости поверхности исходных образцов приведены на рис. 5. Образцы состава $ZrO_2-15CeO_2$ отличаются большей шероховатостью, однако разница очень незначительна и не оказывает какого-либо влияния на взаимодействие микробной пленки с поверхностью.

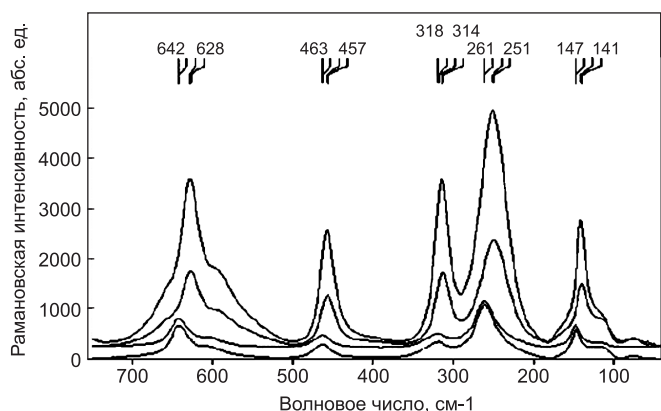


Рис. 4. КР-спектры поверхности образцов $ZrO_2-15CeO_2$ (1, 2) и $ZrO_2-3Y_2O_3$ (3, 4) до (1, 3) и после (2, 4) инкубации биопленок.

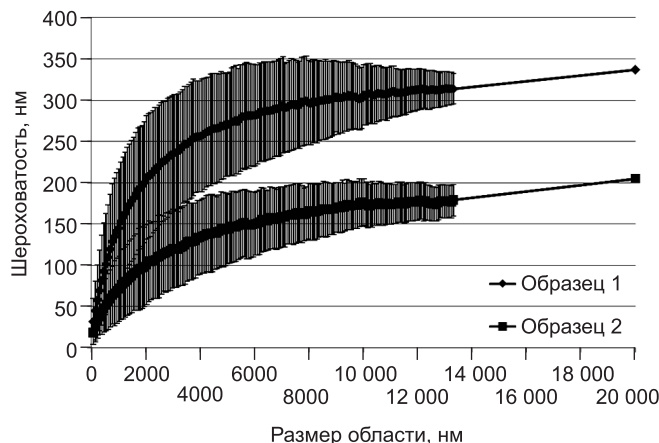


Рис. 5. Зависимость средней шероховатости поверхности образцов составов $ZrO_2-15CeO_2$ (1) и $ZrO_2-3Y_2O_3$ (2) от размеров области измерения.

Таким образом, исследование стабилизированных $ZrO_2-3Y_2O_3$ и $ZrO_2-15CeO_2$ образцов диоксида циркония до и после инкубации биопленки показало, что поверхность образцов состава $ZrO_2-15CeO_2$, по-видимому, подвержена меньшей атакуемости бактериальными клетками и как следствие образованию и росту на ней биопленок *S. epidermidis* ATCC 29887. При этом формирующаяся биопленка микроорганизмов, по-видимому, способствует самоорганизации элементов поверхности с образованием спиралевидных структур. Проведенные ранее исследования [9] показали, что под воздействием агрессивных сред (кислых и щелочных растворов) происходит незначительное растворение $ZrO_2-15CeO_2$, что может способствовать снижению интенсивности образования биопленок на поверхности, так как $ZrO_2-15CeO_2$ известен как биологически активный материал [10]. В отличие от обнаруженных закономерностей формирования бактериальных пленок на поверхностях $ZrO_2-15CeO_2$, биопленки на поверхностях образцов $ZrO_2-3Y_2O_3$ имеют более высокую биомассу и жизнеспособность.

Заключение

Исследование процессов формирования биопленок коагулазонегативных стафилококков *Staphylococcus epidermidis* ATCC 29887 на поверхности диоксида циркония, стабилизированного оксидом иттрия и диоксидом церия, показало выраженную зависимость биологических характеристик этих процессов от вида стабилизирующей добавки. Биопленки на поверхности диоксида циркония, стабилизированного диоксидом церия, обладают значительно меньшей биомассой и жизнеспособностью их клеточных элементов по сравнению с пленками на поверхности диоксида циркония, стабилизированного оксидом иттрия. Таким образом, проведенные экспериментальные исследования воздействия микробных пленок *S. epidermidis* ATCC 29887 на поверхность диоксида циркония, стабилизированного диоксидом церия, свидетельствуют о целесообразности соответствующих клинических испытаний.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 01-02431-а и проектов УрО РАН – «МКБ», инициативных и междисциплинарных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский В.И. *Медицинская микробиология*. М.: ГЭОТАР-МЕД; 2007.
2. Арутюнов С.Д., Царев В.Н., Ипполитов Е.В., Апресян Б.В., Трефилов А.Г. Формирование биопленки на временных зубных протезах: соотношение процессов первичной микробной адгезии, коаггрегации и колонизации. *Стоматология*. 2012; 5: 28–35.
3. Ушаков Р.В., Царев В.Н. Микрофлора полости рта и ее значение в развитии стоматологических заболеваний. *Стоматология для всех*. 1998; 3: 22–4.
4. Tarsi R., Muzzarelli R.A., Guzman C.A., Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J. Dent. Res.* 1997; 76 (2): 665–72.
5. Leonhard A., Olsson J., Dahlen G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo. *J. Dent. Res.* 1995; 74 (9): 1607–12.
6. Antsiferov V.N., Porozova S.E., Kul'met'eva V.B. Effect of water soluble polymer additives on the phase composition and size of zirconia particles during precipitation from salt solutions. *Glass Physics Chem.* 2012; 38 (3): 322–6.
7. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Полуодова Т.В. Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011; 13 (5): 156–9.
8. Порозова С.Е., Кульметьева В.Б., Зиганшин И.Р., Сметкин А.А. Формирование структуры пористой керамики из нанодисперсных порошков диоксида циркония. В кн.: Тезисы докладов VII Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация и материалы нового поколения». Иваново; 2012: 95.
9. Гуров А.А., Кульметьева В.Б., Макарова Е.Н. и др. Изучение деградации свойств керамики системы $ZrO_2-Y_2O_3-CeO_2$. В кн.: *Материалы Российской конференции (с международным участием) «Высокотемпературная химия оксидных наносистем»*: СПб.; 2013: 80.
10. Иванов В.К., Федотов Г.Н., Никулина М.В. и др. Биологическая активность нанокристаллического диоксида церия. *Доклады РАН. Серия «Химия»*. 2008; 420 (5): 628–31.

Поступила 01.07.14

REFERENCES

1. Pokrovskiy V.I. *Medical Microbiology [Meditsinskaya mikrobiologiya]*. Moscow: GEOTAR-MED; 2007. (in Russian)
2. Arutyunov S.D., Tsarov V.N., Ippolitov E.V., Апресян Б.В., Трефилов А.Г. Biofilm formation on temporary dentures: ratio of processes of primary microbial adhesion, koaggregation and colonization. *Stomatologiya*. 2012; 5: 28–35. (in Russian)
3. Ushakov R.V., Tsarev V.N. Mikroflora oral cavities and its value in development of stomatologic diseases. *Stomatologiya dlya vseh*. 1998; 3: 22–4. (in Russian)
4. Tarsi R., Muzzarelli R.A., Guzman C.A., Pruzzo C. Inhibition of *Streptococcus mutans* adsorption to hydroxyapatite by low-molecular-weight chitosans. *J. Dent. Res.* 1997; 76 (2): 665–72.
5. Leonhard A., Olsson J., Dahlen G. Bacterial colonization on titanium, hydroxyapatite, and amalgam surfaces in vivo. *J. Dent. Res.* 1995; 74 (9): 1607–12.
6. Antsiferov V.N., Porozova S.E., Kul'met'eva V.B. Effect of water soluble polymer additives on the phase composition and size of zirconia particles during precipitation from salt solutions. *Glass Physics Chem.* 2012; 38 (3): 322–6.
7. Korobov V.P., Lemkina L.M., Filatova L.B., Polyudova T.V. *Destruction of biofilms of *Stafilococcus koagulazonegatives* in cationic peptide of varneriny [Razrushenie bioplenok koagulazonegativnykh stafilokokkov kationnym peptidom varnerinom]*. News of the Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences. 2011; 13 (5): 156–9. (in Russian)
8. Porozova S.E., Kulmetyev V. B., Ziganshin I.R., Smetkin A.A. *Formation of structure of porous ceramics from nanodisperse powders of dioxide of zirconium*. In: Theses of Reports of the International Scientific Conference “Kinetics and Crystallization Mechanism. Crystallization and Materials of New Generation” [V kn.: Tezisy dokladov VII Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii “Kinetika i mekhanizm kristallizatsii. Kristallizatsiya i materialy novogo pokoleniya”]. Ivanovo; 2012: 95. (in Russian)
9. Gurov A.A., Kul'met'yeva V.B., Makarov E.N. et al. *Studying of degradation of properties of ceramics of $ZrO_2-Y_2O_3-CeO_2$ system*. In: *Materials Russian Conference (with International Participation) “High-temperature Chemistry of Oxidic Nanosystems”*. [Materialy Ross. konf. (s mezhdunar. uchastiem) “Vysokotemperaturnaya khimiya oksidnykh nanosistem”]. St. Petersburg; 2013: 80. (in Russian)
10. Ivanov V.K., Fedotov G.N., Nikulina M.V. et al. *Biological activity of nanocrystal dioxide of cerium*. *Doklady RAN. Seriya “Khimiya”*. 2008; 420 (5): 628–31. (in Russian)

Received 01.07.14